

# Eine revers-genetische Analyse des reassortierten humanen Influenza A-Virus H1N2

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

**Aline Anton**

aus Dessau

Februar 2010

Diese Arbeit wurde angefertigt am Robert Koch-Institut Berlin unter der Anleitung von PD Dr. Thorsten Wolff in der Arbeitsgruppe „Pathomechanismen von Influenzaviren“, in Zusammenarbeit mit dem Nationalen Referenzzentrum für Influenza unter der Leitung von Dr. Brunhilde Schweiger.

Gutachter: **Professor Dr. Rupert Mutzel**  
Freie Universität Berlin,  
Institut für Pflanzenphysiologie und Mikrobiologie  
Königin-Luise-Strasse 12-16  
14195 Berlin

2. Gutachter **PD Dr. Thorsten Wolff**  
Fachgebiet virale Infektionen/ respiratorische Erkrankungen  
Robert Koch-Institut Berlin  
Nordufer 20  
13353 Berlin

eingereicht: 05.02.2010

Disputation am: 30.03.2010

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>9</b>
<b>VORWORT.....</b>	<b>12</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 Influenza A-Viren.....</b>	<b>13</b>
1.1.1 Aufbau des Viruspartikels .....	13
1.1.2 Genomaufbau des Influenza A-Virus .....	18
1.1.3 Nomenklatur .....	20
1.1.4 Infektions-und Replikationszyklus der Influenza A-Viren.....	20
1.1.5 Die Rolle des Nichtstrukturproteins NS1 in der Immunabwehr .....	23
<b>1.2 Pathogenese und Klinik.....</b>	<b>24</b>
<b>1.3 Forschung und Lehre der Epidemien humaner Influenza A-Viren .....</b>	<b>25</b>
1.3.1 Antigen- <i>Drift</i> und Antigen- <i>Shift</i> .....	28
1.3.2 Die Epidemiologie humanpathogener Influenza A (H3N2)-Viren .....	29
1.3.3 Die Epidemiologie humanpathogener Influenza A (H1N1)-Viren .....	30
1.3.3.1 Neue Influenza A/Viren des Subtyps H1N1 lösten die „Schweinegrippe“ aus .....	31
1.3.4 Die Epidemiologie humanpathogener Influenza A (H1N2)-Viren .....	31
<b>1.4 Die Glykoproteine Hämagglutinin und Neuraminidase .....</b>	<b>33</b>
1.4.1 Das Hämagglutinin.....	33
1.4.2 Die Neuraminidase.....	36
<b>1.5 Oberflächenrezeptoren für Influenzaviren und Sialinsäuren.....</b>	<b>37</b>
<b>1.6 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen).....</b>	<b>40</b>
<b>1.7 Rekombination und Reverse Genetik .....</b>	<b>43</b>
1.7.1 Rekombination .....	43
1.7.2 Reverse Genetik.....	44
<b>1.8 Fragestellungen der Arbeit .....</b>	<b>45</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>46</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>46</b>

2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmittel.....	46
2.1.2	Zelllinien .....	49
2.1.3	Bakterienstämme .....	49
2.1.4	Virusstämme .....	49
2.1.5	Zellkulturmedien .....	50
2.1.6	Medien für Bakterien .....	50
2.1.7	Plasmide .....	51
2.1.8	Oligonukleotide .....	52
2.1.9	Rezeptoranaloga .....	53
2.1.10	Enzyme.....	54
2.1.11	Kits .....	54
2.1.12	Antikörper und Antiseren .....	55
2.1.13	Puffer und Lösungen.....	56
2.1.14	Geräte .....	59
<b>2.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>61</b>
2.2.1	Zellkultur.....	61
2.2.1.1	Transfektion von Zellen.....	61
2.2.1.2	Infektion von Zellen.....	62
2.2.1.3	Anlegen von Zellstocks .....	62
2.2.2	Zellbiologische Methoden .....	63
2.2.2.1	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse .....	63
2.2.2.2	Reporterstudien .....	63
2.2.3	Arbeiten mit Influenza A-Viren .....	64
2.2.3.1	Herstellung rekombinanter „wildtyp“ Viren und Reassortanten.....	64
2.2.3.2	Hämagglutinationstest (HA-Test) .....	66
2.2.3.3	Titerbestimmung durch indirekte Immunfluoreszenzanalyse .....	66
2.2.3.4	Isolation viraler RNA.....	67
2.2.3.5	Nachweis des rekombinanten Virus.....	67
2.2.3.6	Herstellung von Glycerolstocks für Influenza A-Viren.....	67
2.2.4	Molekularbiologische Methoden für die Konstruktion von Plasmiden .....	68
2.2.4.1	Reverse Transkriptions (RT)-PCR.....	68
2.2.4.2	Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel .....	70
2.2.4.3	Extraktion von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel.....	71
2.2.4.4	Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen.....	71
2.2.4.5	Ligation / Rekombination von DNA-Fragment und Vektor .....	71
2.2.4.6	Herstellung Transformations-kompetenter E. coli XL blue Bakterien.....	71
2.2.4.7	Transformation chemisch kompetenter E.coli.....	72
2.2.4.8	Plasmidpräparation von DNA im kleinen und großen Maßstab .....	72
2.2.4.9	Spektralphotometrische Analyse von Nukleinsäuren .....	73
2.2.4.10	DNA-Sequenzierung .....	73

2.2.4.11	Klonierung viraler Gensegmente in den Vektor pHW2000™ .....	74
2.2.5	Proteinanalytische Arbeiten .....	75
2.2.5.1	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese .....	75
2.2.5.2	Immunoblot .....	76
2.2.5.3	Herstellung und Analyse von Zelllysaten .....	77
2.2.6	Aufnahme multizyklischer Replikationskurven .....	77
2.2.6.1	Neutralisationsstudien .....	78
2.2.7	Plaqueneutralisationsstests (PNT) .....	78
2.2.8	Rezeptorassays / ELISA .....	79
2.2.8.1	Bestimmung der Hämagglutinin-Rezeptorbindung über Festphasen-Assays .....	80
2.2.8.2	Bestimmung der Neuraminidase-Substratspezifität .....	80
2.2.8.3	Bestimmung der Bindung viraler Oberflächenglykoproteine an NK-Rezeptoren .....	83
2.2.9	Arbeiten mit Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) .....	84
2.2.9.1	Gewinnung von NK-Zellen aus Buffy Coat .....	84
2.2.9.2	Bestimmung der Zellzahl .....	85
2.2.9.3	Infektion von Suspensionszellen K562 .....	85
2.2.9.4	NK-Assay und FACS-Färbung .....	85
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>88</b>
3.1.1	Übersicht der Aminosäureunterschiede der viralen Segmente .....	89
<b>3.2</b>	<b>Die Herstellung „rekombinanter Wildtyp“-Viren .....</b>	<b>90</b>
<b>3.3</b>	<b>Die Herstellung von Virus-Reassortanten .....</b>	<b>95</b>
3.3.1	Virus-Reassortanten des Subtyps H3N2 .....	95
3.3.2	Virus-Reassortanten des Subtyps H1N2 .....	97
<b>3.4</b>	<b>Die Replikation der Reassortanten des Subtyps H3N2 .....</b>	<b>99</b>
<b>3.5</b>	<b>Der Einfluss des Nukleoproteins auf die Replikation vRNA-ähnlicher Reporter-genkonstrukte.....</b>	<b>101</b>
<b>3.6</b>	<b>Die Replikation der Reassortanten des Subtyps H1N2 .....</b>	<b>103</b>
<b>3.7</b>	<b>Zeitliche Expressionsanalyse von Virusproteinen der Wildtyp- und rekombinanten H1N2-Viren und der „Elternstämme“ .....</b>	<b>110</b>
<b>3.8</b>	<b>Studien zur Rezeptoraffinität des Hämagglutinins und der Substratspezifität der Neuraminidase</b>	<b>111</b>
3.8.1	Rezeptoraffinität des HA von H1N1, H3N2 und H1N2-Viren (ab 1999) .....	111
3.8.2	Vergleich der Substratspezifität der Influenza A-Virus Neuraminidasen N1 und N2 .....	114
<b>3.9</b>	<b>Neutralisationsstudien mit H1-Antisera .....</b>	<b>116</b>
3.9.1	Plaqueneutralisationsstudien mit zwei verschiedenen H1-Antisera .....	116
3.9.2	Replikationskurve unter Einfluss des H1-Patientenserums .....	119

<b>3.10 Die Erkennung Influenza A-Virus infizierter Zellen durch reaktive Komponenten des Immunsystems, die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und deren Rezeptoren .....</b>	<b>122</b>
3.10.1 Die spezifische Lyse Influenza A-Virus infizierter Zellen durch NK-Zellen .....	122
3.10.2 Die Erkennung und Wechselwirkung des Influenza A-Virus Hämagglutinins durch die NK-Rezeptoren NKp44 und NKp46.....	128
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>131</b>
<b>4.1 Die Herstellung von drei revers-genetischen Systemen aus den parentalen Referenzstämmen zur Gewinnung „rekombinanter Wildtyp“-Viren.....</b>	<b>132</b>
<b>4.2 Das Einkreuzen der A/NewCaledonia-Polymerase-segmente und des NP-Segments in den Stamm A/Panama (H3N2) verändert dessen Replikationseigenschaften.....</b>	<b>132</b>
<b>4.3 Die Nukleoproteine der Stämme A/Moscow und A/Panama (H3N2) reduzieren die Aktivität des H1N1-Polymerasekomplexes des Stammes A/NewCaledonia .....</b>	<b>135</b>
<b>4.4 Die Replikationseigenschaften von Wildtyp- und rekombinanten Viren des Subtyps H1N2 unterscheiden sich aufgrund genetischer Mutationen .....</b>	<b>136</b>
<b>4.5 Der Austausch des NA- oder M-Segments oder des Virushintergrundes verändert die Replikationseigenschaften des rekombinanten „Referenzvirus“ rNC4-P7-M (H1N2) .....</b>	<b>137</b>
<b>4.6 Die schwächere Expression der viralen Proteine PB1, NP, M1 und NS1 des rekombinanten „Referenzvirus“ rNC4-P7-M (H1N2) korreliert mit dessen verzögerter Replikation im Vergleich zum Wildtyp H1N2-Virus .....</b>	<b>142</b>
<b>4.7 Die Bindungsaffinität des Hämagglutinins und die Substratspezifität der Neuraminidase der getesteten H1N1- und H1N2-Viren unterscheiden sich gegenüber den (künstlichen) Rezeptoren 3'SLN, 6'SLN und 6'SL nicht signifikant .....</b>	<b>143</b>
<b>4.8 Die Mutationen innerhalb der Glykoproteine HA und NA der Wildtyp-H1N2-Viren nahmen im epidemiologischen Verlauf der Zirkulation auf antigener Ebene zu .....</b>	<b>144</b>
<b>4.9 Humanes anti-H1-Immenserum diskriminiert zwischen Wildtyp und rekombinanten H1N2-Viren</b>	<b>146</b>
<b>4.10 Wildtyp H1N2-Virus-infizierte Zellen werden durch die schwächere Bindung des Hämagglutinins an den aktivierenden Rezeptor natürlicher Killerzellen NKp44 weniger stark lysiert.....</b>	<b>148</b>
<b>4.11 Ausblick.....</b>	<b>152</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>153</b>

<b>ABSTRACT.....</b>	<b>155</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>157</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>172</b>
<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>173</b>
<b>EIDESTÄTTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>174</b>

***Für meine Familie***

*Reality is contradictory. And it's paradoxical. If there's any one word - if you had to pick one word to describe that nature of the universe - I think that word would be paradox. That's true at the subatomic level, right through sociological, psychological, philosophical levels on up to cosmic levels. (Tom Robbins)*

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AP-1	<i>Activator protein 1</i> , Transkriptionsfaktor
AS	Aminosäure
C	Cytosin
CDC	<i>Centers of Disease Control and Prevention</i>
cDNA	<i>Copy DNA</i>
cRNA	Komplementäre RNA zu vRNA
C-terminal	Carboxyterminal
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsRNA	Doppelsträngige RNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ffu	<i>Fluorescence forming units</i>
G	Guanin
Gfp	<i>Green fluorescent protein</i>
HA	Hämagglutinin
IAV	Influenza A-Virus
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IRF-3	Interferon regulatory factor 3
Kb	Kilobasen

kDA	Kilodalton
M1	Matrix Protein 1
M2	Matrix Protein 2
M	molar
Nt	Nukleotide
N-terminal	aminoterminal
m <sup>7</sup> GTP	C7-methyliertes Guanosintriphosphat
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> , Faktor für die Anzahl der Viruspartikeln pro infizierter Zelle
mRNA	Messenger RNA
NA	Neuraminidase
NCR	<i>Non coding region</i>
n.d.	Nicht bestimmt oder nicht erfasst
NEP	Nukleares Export Protein
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i> , Transkriptionsfaktor
NLS	Nuclear localisation signal; Kernlokalisierungssignal
NRZ	Nationales Referenzzentrum für Influenz
NS	Nichtstrukturprotein
OD	Optische Dichte
PA	Azides Polymeraseprotein
PAA	<i>Polyacrylic acid</i> , Polyacrylsäure, Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PB1	Basisches Polymeraseprotein 1
PB2	Basisches Polymeraseprotein 2
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>

<i>Pfu</i>	<i>Plaque-forming units</i>
p.i.	<i>Post infection, Zeitpunkt nach der Infektion</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoproteinkomplex
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
SA	<i>Sialic acid, Sialinsäure</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
T	Thymin
TNG	Trans Golgi Netzwerk
U	<i>unit</i>
U	Uracil
ün	Über Nacht
vRNA	Virale genomische RNA
vRNP	Viraler Ribonukleoproteinkomplex
<i>WHO</i>	<i>World Health Organisation</i>
WT	Wildtyp

### **Aminosäuren**

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

## **Vorwort**

Vor nunmehr 92 Jahren verursachte eines der epidemiologisch bedeutendsten viralen Pathogene einen der schwersten Krankheitsausbrüche der Menschheitsgeschichte: das Influenzavirus. Die Erkrankung wird durch Viren hervorgerufen, deren kontinuierliche und schnelle antigene Veränderungen zu einer der großen Herausforderungen des *Public Health* in unserer Zeit gehören. Die Influenza (oder Virus-Grippe) wird dabei durch verschiedene parallel zirkulierende Stämme der Influenza A- und B-Viren hervorgerufen.

Seit 1977 wurden innerhalb des weltweiten *Surveillance*-Systems der WHO hauptsächlich Influenza A-Viren der Subtypen H1N1 und H3N2 isoliert. Virologische Analysen identifizierten in der Influenzasaison 2000/2001 ein neues H1N2-Hybridvirus (Gregory, Bennett et al. 2002; Paget, Meerhoff et al. 2002; Xu, Smith et al. 2002), das aus den beiden „Elternstämmen“ entstanden war. Obwohl Viren des Subtyps H1N2 bereits im Jahr 1989 beschrieben wurden, war es ihnen nicht gelungen sich über ihr Entstehungsgebiet in China hinaus zu verbreiten. Für die vermutlich etwa um das Jahr 2000 neu entstandenen H1N2-Viren konnte dagegen eine globale Verbreitung und Zirkulation in über 41 Ländern nachgewiesen werden. Die damalige Frage, ob es diesen Viren gelingen würde, kontinuierlich als H1-Viren zu zirkulieren, kann mittlerweile mit Nein beantwortet werden. Letztmalig aus Menschen isoliert wurden sie im Jahr 2003. Aus diesem Geschehen heraus ergaben sich die zentralen Fragen dieser Arbeit: Unter der Voraussetzung, dass ein solches Ereignis nicht dem Zufall, sondern der spezifischen Komposition der Viren geschuldet ist: Welche Eigenschaften der H1N2-Viren beeinflussten ihre weltweite Verbreitung positiv? Lassen die Erkenntnisse Rückschlüsse zu, die erklären warum diese Viren heute nicht mehr zirkulieren? Weiterhin soll die Analyse neuartiger Influenzaviren dazu beitragen, Pathogenitätsfaktoren zu identifizieren und neue Erkenntnisse über deren Entwicklung zu gewinnen.

# 1 Einleitung

## 1.1 Influenza A-Viren

Influenza A-Viren werden der Familie der Orthomyxoviren (Orthomyxoviridae) zugeordnet. Diese Virusfamilie umfasst weiterhin die Influenza B- und C-Viren, als auch das Thogotovirus und das Isavirus. Orthomyxoviren sind eine der drei Virusfamilien (weiterhin: *Bunyaviridae*, *Arenaviridae*), deren Vertreter ein segmentiertes, einzelsträngiges RNA-Genom in negativer Orientierung besitzen. Für die Synthese der mRNA und für die Genomreplikation wird ein spezielles virales Enzym, eine RNA-abhängige RNA-Polymerase, benötigt.

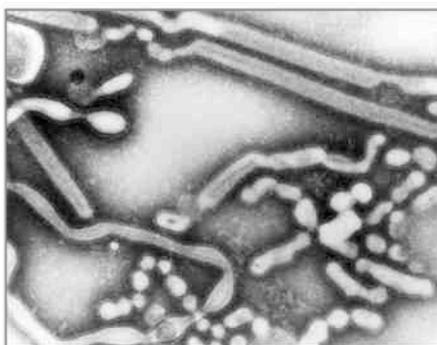


Bild 1.1: **Transmissions-elektronenmikroskopische Aufnahme einer frühen Passage von Influenza A-Viren in sphärischer und filamentöser Form.** (Quelle: CDC, Centers for Disease Control and Prevention)

Das segmentierte Genom ist die Ursache einer weiteren Besonderheit, die zur Entstehung von H1N2 Viren führte: die Möglichkeit der **Reassortierung** von Gensegmenten. Bei Doppelinfektion einer Zelle mit zwei verschiedenen Virus-Subtypen kann es während der Replikation und Morphogenese zur Vermischung der RNA-Moleküle kommen, so dass **Reassortanten** entstehen. Durch die Neukombination der RNA-Segmente der „Elternviren“ können die „Nachkommenviren“ neue Eigenschaften erhalten. Wird durch Reassortierung eines oder beide der Oberflächenmoleküle, Hämagglutinin oder Neuraminidase, ausgetauscht und entsteht dadurch ein neuer Virus-Subtyp, bezeichnet man dieses Ereignis als *Antigen-Shift*. Einen weiteren Mechanismus, der Mutationen in den beiden Glykoproteinen Hämagglutinin und Neuraminidase auf der Oberfläche des Influenza A Virus beschreibt, nennt man *Antigen-Drift*. Die Bedeutung dieser beiden Begriffe ist im Unterkapitel 1.4.3 näher erläutert.

### 1.1.1 Aufbau des Viruspartikels

Influenza A Viren besitzen membranumhüllte, sphärische oder filamentöse Strukturen mit einem Durchmesser von 80 bis 120 nm (Bild 1.1). Im Inneren der Lipiddoppelmembran, abstammend von der Wirtszelle, befindet sich das virale Genom. Es besteht aus acht einzelsträn-

## Einleitung

gigen RNA-Segmenten in negativer Orientierung, die *per definitionem* komplementär zur mRNA sind (Baltimore 1971) (Bild 1.2). Jedes der acht RNA-Segmente ist mit viralen Nukleoproteinen und den drei Polymeraseproteinen komplexiert. Sie bilden zusammen Ribonukleoproteinkomplexe (RNPs).

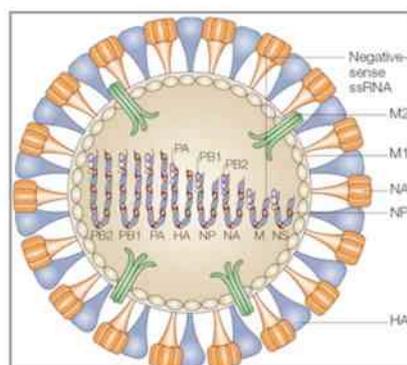


Bild 1.2: **Schematische Abbildung eines Influenza A-Viruspartikels.** Die Glykoproteine Hämagglutinin (HA), Neuraminidase (NA) und das Matrixprotein M2 (Ionenkanal) sind in der Virushülle verankert. Das Matrixprotein M1 kleidet die Virushülle von Innen aus und ist verbunden mit den viralen Ribonukleoproteinkomplexen (RNPs). Sie bestehen aus der viralen RNA, die segmentiert vorliegt und jeweils mit dem Polymerasekomplex- den basischen Polymeraseproteinen 1 und 2 (PB1, PB2) und dem sauren Polymeraseprotein (PA)- sowie Nukleoproteinen (NP) assoziiert ist. Das achte Segment NS kodiert für das Nichtstrukturprotein (NS1) und das nukleare Exportprotein (NEP). NS1 wird in der infizierten Zelle exprimiert und ist nicht im Virion enthalten, das NEP liegt in der Virushülle vor. Bildquelle: (Horimoto and Kawaoka 2005)

Auf der Oberfläche des Viruspartikels sind drei Proteine in die Membran integriert. Die beiden Glykoproteine **Hämagglutinin** (HA) und **Neuraminidase** (NA), sowie das M2-Ionenkanalprotein (M2). Das HA-Glykoprotein vermittelt zwei wesentliche Schritte des Infektionsprozesses. Zunächst bewirkt es die Bindung des Virus an Sialinsäurekonjugate von Oberflächenproteinen. Zweitens führt es zur Fusion der Virushülle mit der Endosomenmembran, nachdem das Virus von der Zelle endosomal aufgenommen wurde. Dieser Prozess ermöglicht die Freisetzung des Virusgenoms in das Zytoplasma. Das NA-Glykoprotein erfüllt eine gegenteilige Funktion. Es vermittelt durch Abspaltung der Sialinsäuren (auch N-Acetylneuraminsäuren) die Freisetzung neuer Viruspartikel und ist daher unabdingbar für deren effektive Verbreitung. Die Neuraminidasefunktion ist das Ziel der beiden derzeit als Medikament verfügbaren Neuraminidasehemmer Oseltamivir (Tamiflu®) und Zanamivir (Relenza®). Den beiden Glykoproteinen ist ein gesonderter Abschnitt (1.4) gewidmet, der sie umfangreicher beschreibt.

**Das Matrixprotein M1** kleidet die Virushülle im Inneren aus, stabilisiert das Virion (Gregoriades and Frangione 1981) und ist gleichzeitig sowohl mit dem zytoplasmatischen Teil der Glykoproteine als auch mit dem RNP-Komplex (Wakefield and Brownlee 1989) verbunden. Es hat damit eine Brückenfunktion zwischen Membran und Kernkomponenten des Virus, die sich auch in der Struktur des M1-Proteins widerspiegelt. Es besteht aus zwei globulären Domänen, die durch

eine Protease-sensitive Region miteinander verbunden sind (Arzt, Baudin et al. 2001). Das M1-Protein bildet entlang der Membraninnenseite des Virus ein Homooligomer (Zhao, Ekstrom et al. 1998), wobei positive und negative Ladungen in entgegengesetzter Richtung liegen (Nayak, Hui et al. 2004; Schmitt and Lamb 2005). Es besitzt die Fähigkeit, an Lipidmembranen zu binden und interagiert neben dem RNP auch mit dem Nuklearen Export Protein (NEP) und dem zytoplasmatischen Teil des M2-Ionenkanals (Chen, Leser et al. 2008).

**Das Matrixprotein M2** des Influenza A Virus bildet in Form eines Tetramers einen Protonenselektiven Ionenkanal aus (Pinto, Holsinger et al. 1992). Die einzelnen Monomere (je 97 AS) sind über Disulfidbrücken verbunden (Holsinger and Lamb 1991). Durch den Ionenkanal gelangen Protonen aus dem Endosom (niedriger pH-Wert) in das Innere des Virus. Die pH-Wert-Änderung führt daraufhin zur Dissoziation der Ribonukleoproteinkomplexe vom Matrixprotein und der Freisetzung des viralen Genoms ins Zellinnere (*uncoating*) (Wharton, Belshe et al. 1994). Das Transmembranmotif des M2 (HxxxW) hat dabei eine entscheidende Funktion: Histidin-37 verleiht dem Protein die hohe Protonenselektivität, während Tryptophan-41 als eine Art öffnendes und schließendes „Tor“ des Kanals fungiert (Tang, Zaitseva et al. 2002).

Der M2-Protonenkanal kann durch Adamantane (Amantadin bzw. das Methyl-Derivat Rimantadin) inhibiert werden. Diese antiviral wirkenden Stoffe (Virustatika) waren die ersten Medikamente, die gegen Influenza A-Viren eingesetzt wurden. Sie wirken nicht gegen Influenza B-Viren. Vermutlich als Folge des massiven Gebrauchs bei domestiziertem Geflügel bildeten sich vor allem bei aviären Viren schnell Resistenzen aus. Desweiteren sind diese Medikamente in einigen Ländern nicht verschreibungspflichtig und wurden auch während der SARS-Epidemie im Jahr 2005 häufig eingesetzt. Epidemiologische Studien der letzten Jahre, vor allem in der Saison 2005/2006, zeigen einen starken Anstieg der Adamantan-resistenten global zirkulierenden Viren, vor allem der H3N2-Stämme auf bis zu 92 %. Dieser Trend hält seitdem an. Aufgrund dieses Anstieges wurde von Seiten des CDC während der Saison 2005/2006 abgeraten diese Wirkstoffgruppe als humanes Medikament weiter einzusetzen (Bright, Medina et al. 2005; Bright, Shay et al. 2006; Nelson, Simonsen et al. 2009)). Resistenzen gegen Adamantane entwickeln sich ausschließlich im Transmembranteil des M2-Moleküls, beispielsweise durch die Mutationen L26H, A30T, S31N und G34E.

**Der virale Polymerasekomplex** von Influenza A-Viren ist ein im Zellkern aktiver Komplex aus drei Untereinheiten, den basischen Polymeraseproteinen 1 und 2 (PB1, PB2) sowie dem sauren Polymeraseprotein (PA) (Braam, Ulmanen et al. 1983). Die heterotrimere Polymerase katalysiert die Transkription viraler genomischer RNA (vRNA) in mRNA und cRNA als Intermediat

(Gonzalez and Ortin 1999). Die drei Proteine bilden zusammen eine kompakte Struktur aus. PB1 ist über seine C- und N-terminalen Domänen mit PA und PB2 verbunden (Digard, Blok et al. 1989; Gonzalez, Zurcher et al. 1996; Ohtsu, Honda et al. 2002). PB1 und PA gelangen als Dimer gebunden an vRNA in den Zellkern und binden dort zur Bildung eines funktionalen Komplexes an PB2, welches unabhängig in den Kern importiert wird (Fodor and Smith 2004; Deng, Sharps et al. 2005). Die RNA-Polymerase interagiert im Zellkern mit der hyperphosphorylierten carboxyterminalen Domäne (CTD) der großen Untereinheit der (aktiv transkribierenden) zellulären RNA-Polymerase II (Engelhardt, Smith et al. 2005). **PB2** ist an der Initiation der Transkription viraler RNAs beteiligt, indem es an das m<sup>7</sup>GTP 5'-Ende von Wirts-prä-mRNAs bindet (Ulmanen, Broni et al. 1981; Blaas, Patzelt et al. 1982). **PB1**, die RNA-abhängige RNA-Polymerase bindet die terminalen Enden von vRNA (Li, Ramirez et al. 1998; Gonzalez and Ortin 1999) und cRNA (Gonzalez and Ortin 1999) für die Initiation der Transkription und Replikation. Die katalytische Domäne der Endonukleaseaktivität des Polymerasekomplexes, die sich in den terminalen 209 Aminosäureresten von PA befindet (Dias, Bouvier et al. 2009; Yuan, Bartlam et al. 2009), schneidet die neu synthetisierten zellulären mRNAs des Wirtes nach 10 bis 13 Nukleotiden. Die dadurch entstehenden kappentragenden RNA-Oligonukleotide vom 5'-Ende werden für die Initiierung der viralen Transkription benutzt („*Cap-snatching*“-Mechanismus) (Plotch, Bouloy et al. 1981). PB1 katalysiert die sequentielle Anlagerung von Nukleotiden während der Transkription (Kettenverlängerung) (Braam, Ulmanen et al. 1983). Dabei wird die Polymerase II-Elongation der zellulären mRNA inhibiert (Chan, Vreede et al. 2006).

Das **PA**-Protein kann Proteolyse gegenüber viralen und zellulären Proteinen induzieren. Essentiell für die proteolytische Aktivität von PA sind die Aminosäuren S624 und T157 (Sanz-Ezquerro, de la Luna et al. 1995; Perales, Sanz-Ezquerro et al. 2000; Hara, Shiota et al. 2001; Hara, Schmidt et al. 2006). PA ist weiterhin während der Replikation der Genomsegmente für die Generierung von vRNA aus antigenomischen Plusstrang cRNA-Matrizen notwendig (Naffakh, Massin et al. 2001).

**PB2** spielt eine entscheidende Rolle in der molekularen Interaktion mit NP und zellulären Proteinen. Als entscheidend für die effiziente Replikation der Viren in ihren Wirtszellen, wurde die Aminosäure 627 des PB2-Proteins, beziehungsweise der Austausch E627K von Glutaminsäure (E) in aviären zu Lysin (K) in humanen Virusstämmen beschrieben (Clements, Subbarao et al. 1992; Subbarao, London et al. 1993). Aviäre RNP-Komplexe können in humanen Zellen reduzierte Transkriptions- und Replikationsaktivität und reduzierte Bindung von NP an PB1-PB2-PA beziehungsweise nur PB2 zeigen (Labadie, Dos Santos Afonso et al. 2007). Der Polymorphis-

mus wurde auch spezifisch im Zusammenhang mit erhöhter Pathogenität und Replikationseffizienz aviärer Viren in Säugerzellen beobachtet (Hatta, Gao et al. 2001; Fouchier, Schneeberger et al. 2004; Shinya, Hamm et al. 2004). Ebenso zeigte das 1918-Pandemievirus in PB2 an Position 627 Lysin (Taubenberger, Reid et al. 2005). Die Aminosäure 627 determiniert die verminderte Replikationseffizienz aviärer IAV bei 33°C (Temperatur des oberen menschlichen Respirationstraktes), im Vergleich dazu beträgt die Temperatur des Respirationstraktes bei Vögeln ca. 41°C (Massin, van der Werf et al. 2001).

Ein weiteres Protein des Influenza A Virus, das **PB1-F2**, wird durch das Polymerase-Gensegment 2 kodiert und ist nicht essentiell. Das PB1-F2-Protein ist das zuletzt beschriebene Influenzavirusprotein (Chen, Calvo et al. 2001)). Es wird von einem alternativen (+1)-Leserahmen des PB1 kodiert und meist in 87 (A/PuertoRico/8/34) oder 90 Aminosäuren (möglich 79-101 aa) translatiert. Das Protein wird je nach Zelltyp variabel exprimiert und fehlt in einigen Isolaten vollständig. In virusinfizierten Zellen ist das Protein in Mitochondrien und dem Zellkern lokalisiert (Chen, Calvo et al. 2001; Yamada, Chounan et al. 2004; Mazur, Anhlan et al. 2008). PB1-F2 moduliert die Immunantwort der Wirtszelle durch Induktion von Apoptose, vor allem in Immunzellen (Chen, Calvo et al. 2001). Trotz des fehlenden Einfluss von PB1-F2 auf die Replikation des Virus in Zellkultur konnte *in vivo* eine verminderte Pathogenität von PB1-F2-*knockout* Viren im Vergleich zum WT beobachtet werden (Zamarin, Ortigoza et al. 2006; Mazur, Anhlan et al. 2008).

Das Nukleoprotein **NP** des Influenza A Virus ist ein strukturelles Einzelstrang- (ss) RNA-bindendes Protein. NP-Moleküle sind assoziiert an genomische RNA (Pons, Schulze et al. 1969; Baudin, Bach et al. 1994). Ihre Bindung ist eine Voraussetzung dafür, dass die viralen Gene von der Polymerase erkannt werden. Das NP-Protein bindet an eine Vielzahl viraler Makromoleküle inklusive RNA, zwei Untereinheiten der viralen RNA-Polymerase (PB1, PB2) (Biswas, Boutz et al. 1998; Medcalf, Poole et al. 1999), das M1-Matrixprotein (Zvonarjev and Ghendon 1980; Martin and Helenius 1991) und bildet Homo-Oligomere aus (Pons, Schulze et al. 1969; Ruigrok and Baudin 1995). Es bindet ebenso an zahlreiche zelluläre Polypeptide wie Aktin (Digard, Elton et al. 1999), Komponenten des zellulären Kernimport- und Kernexportapparates (O'Neill, Jaskunas et al. 1995; O'Neill and Palese 1995; Elton, Simpson-Holley et al. 2001) und die DEAD-Box-Helikase (BAT1/UAP56) (Momose, Basler et al. 2001) und wirkt somit als ein Adapterprotein zwischen Virus und Wirtszelle.

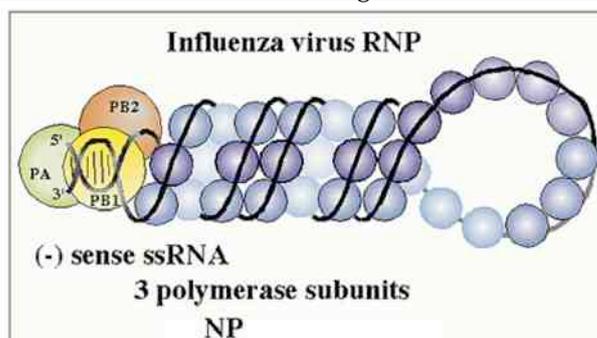


Bild 1.3: **Schematische Darstellung eines Influenza Virus RNPs.** Blaue Kugeln stellen die NP-Moleküle assoziiert mit vRNA (schwarz) dar. Die 3'- und 5'-Enden sind zueinander komplementäre Bereiche und lagern sich zu sog. Pfannenstielstrukturen („pan handles“) zusammen, die Bindungsstellen der Polymeraseproteine bilden. Bildquelle: (Portela and Digard 2002)

NP ist wesentlicher Bestandteil des **RNP-Komplexes**. Innerhalb dieses Komplexes (Bild 1.3) liegt die RNA der acht Segmente bis auf die 5'- und 3'-Enden gebunden an NP vor. An zueinander partiell komplementären Enden binden die drei Polymeraseproteine und bilden sogenannte Pfannenstielstrukturen („pan handles“) aus (Hsu, Parvin et al. 1987). NP vermittelt den Kerntransport der RNP-Komplexe (O'Neill, Jaskunas et al. 1995; Cros, Garcia-Sastre et al. 2005). Es wurden bislang drei verschiedene Kernlokalisierungssignale (NLS) beschrieben (Neumann, Castrucci et al. 1997; Wang, Palese et al. 1997; Weber, Kochs et al. 1998; Bullido, Gomez-Puertas et al. 2000; Cros, Garcia-Sastre et al. 2005). NP bindet durch einen Energie-abhängigen Prozeß am NLS an Importin- $\alpha$ , welches Importin- $\beta$  zu einem trimeren Komplex der an der Kernpore rekrutiert.

### 1.1.2 Genomaufbau des Influenza A-Virus

Das segmentierte RNA-Genom des Influenza A-Virus hat eine Größe von etwa 13.600 Basen. Jedes der acht Segmente (Bild 1.4) kodiert für ein (PB2, PA, HA, NA, NP) beziehungsweise zwei (PB1, M, NS) Proteine. Der kodierende Teil jedes Segments ist von nichtkodierenden Bereichen am 3'-Ende und 5'-Ende flankiert. Bei Influenza A-Viren sind die ersten 12 Nukleotide am 3'-Ende und die ersten 13 Nukleotide am 5'-Ende konserviert und teilweise zueinander komplementär (Desselberger, Racaniello et al. 1980). Sie fungieren als Promotorstrukturen für die Transkription und Replikation durch die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase (Flick, Neumann et al. 1996). Vorwiegend am 3'-Ende der Segmente findet man pro Viruspartikel etwa 50 Polymerasekomplexe aus PB1, PB2 und PA. An Position vier des 3'-vRNA-Promotors findet man eine natürliche Variation (Bild 1.5). Die Polymeraseproteine haben Cytosin (C), alle anderen Segmente Uracil (U) (Robertson 1979). Der „C4-Promotor“ führt zur Hochregulierung der Replikation, während die Transkription gleichzeitig auf ein niedriges Level reguliert wird (Lee and Seong 1998).

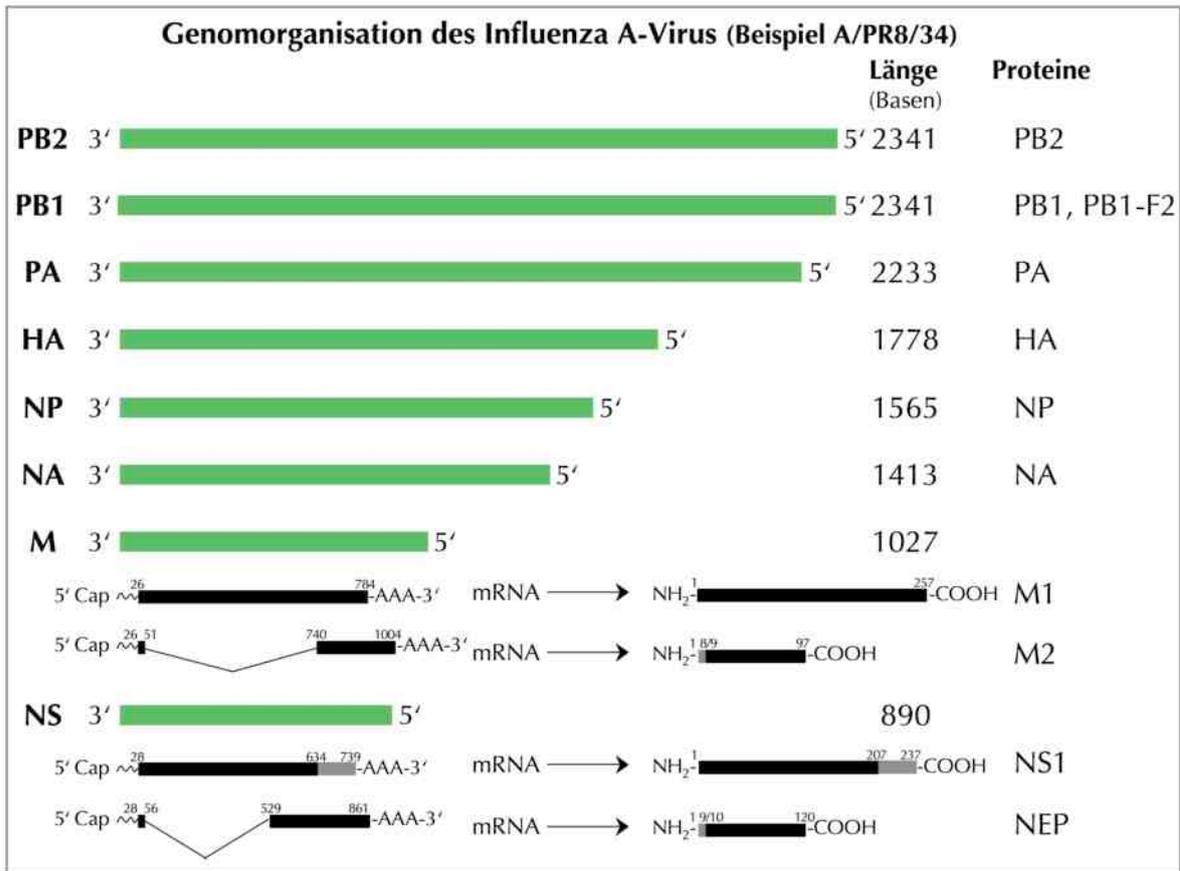


Bild 1.4: Die Genomorganisation eines Influenza A-Virus am Beispiel des Virus A/PR8/34 (H1N1).

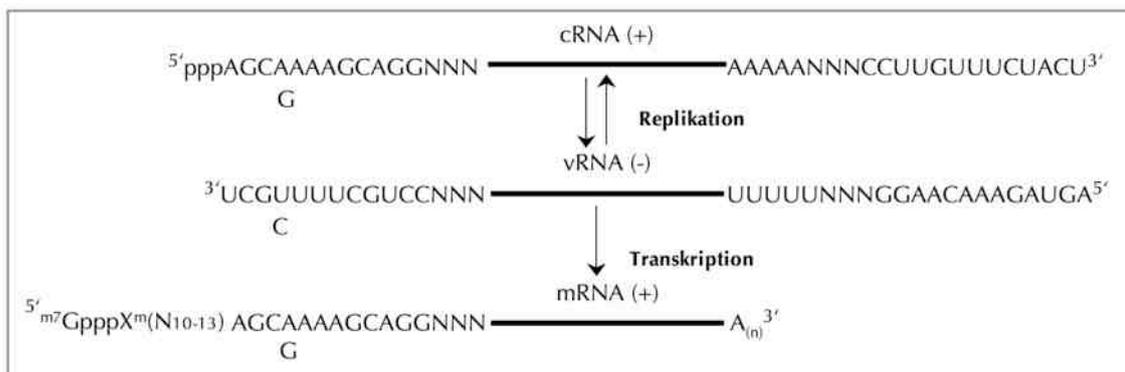


Bild 1.5: Die drei Formen der Influenza A-Virus RNA während der Replikation. In der Mitte ist die virale Negativstrang-RNA mit nichtkodierenden Sequenzen an den 3'- und 5'-Enden und den daran anschließenden Segment-spezifischen Nucleotiden (NNN) abgebildet. Das Polyadenylierungssignal befindet sich am 5'-Ende in Form eines Poly (U). Oben gezeigt ist die cRNA (+) als komplementäre Kopie der vRNA (-) und der Variation an Position 4 der 3'-NCR. Unten sieht man die mRNA mit Kappenstruktur und 10-13 5'-Nucleotiden der Wirtszell-mRNA. Abbildung nach P. Palese und M. Shaw in Fields, Chapter 47: *Orthomyxoviridae*.

### 1.1.3 Nomenklatur

Influenza A-Viren (Genus) werden der Familie der *Orthomyxoviridae* zugeordnet. Sie werden hinsichtlich der Antigenität ihrer Oberflächenglykoproteine HA und NA weiter in Subtypen unterteilt. Unterschieden werden derzeit 16 Hämagglutinine (H1-H16) und neun Neuraminidasen (N1-N9). Die genaue Bezeichnung eines Influenza A-Virus beinhaltet: den ursprünglichen Wirt (außer bei humanen Viren), eine geografische Einordnung des Isolationsortes, die Isolierungsnummer des Virus, das Jahr der Isolation und gefolgt davon in Klammern die antigenetische Einordnung in HA- und NA-Subtypen. Beispielsweise beschreibt A/duck/Vietnam/1111/02 (H5N1) ein Influenza A Virus des Subtyps H5N1, isoliert mit der Nummer 1111 im Jahr 2002 aus einer Ente in Vietnam. A/Panama/2007/99 (H3N2) beschreibt ein humanpathogenes Virus des Subtyps H3N2, isoliert 1999 in Panama mit der Nummer 2007. Für Influenza B und C Viren wurden bislang keine Subtypen beschrieben.

### 1.1.4 Infektions-und Replikationszyklus der Influenza A-Viren

Der Infektionszyklus beginnt mit der Adsorption des Hämagglutinins an endständige Sialinsäuren (Neuraminsäuren) auf der Oberfläche der Wirtszelle. Die Aufnahme des Virus in die Zelle findet durch Rezeptor-vermittelte Endozytose statt (Matlin, Reggio et al. 1981). Der niedrige pH-Wert der „späten“ Endosomen bewirkt eine Konformationsänderung im Hämagglutinin und führt so zur Exposition der hydrophoben „Fusionsdomäne“ der N-terminalen HA2-Untereinheit (Bullough, Hughson et al. 1994). Durch Anheftung der Domäne an die Zellmembran und weitere Umlagerungen kommt es zur Ausbildung von Fusionsporen und der Verschmelzung der viralen Membran mit der Endosomenmembran (Skehel and Wiley 2000; Floyd, Ragains et al. 2008). Zeitgleich strömen über die M2-Ionenkanäle Protonen in das Innere des Virus. Durch die Verringerung des pH-Wertes löst sich die Bindung von RNP-Komplexen mit dem Matrixprotein und das virale Genom wird in Form der RNP-Komplexe ins Zytoplasma freigesetzt (Helenius 1992).

Über die Kernlokalisationssequenzen der Nukleoproteine und Polymerasen werden die Ribonukleoproteinkomplexe innerhalb weniger Minuten in den Zellkern aufgenommen (Whittaker, Bui et al. 1996; Wang, Palese et al. 1997). Dort erfolgt eine initiale Transkription der vRNPs in 5'-kappentragende und 3'-polyadenylierte mRNAs (Hay, Lomniczi et al. 1977). Diese mRNAs entstehen durch endonukleolytisches Schneiden von Wirtszell-mRNAs durch PA und der Verwendung dieser kurzen kappentragenden 5'-Enden als Primer für die virale RNA-Synthese (Plotch, Bouloy et al. 1981; Dias, Bouvier et al. 2009; Yuan, Bartlam et al. 2009). Die Polyadenylierung der viralen mRNA-Transkripte entsteht durch repetitives Ablesen einer kurzen po-



## Einleitung

---

In frühen Stadien der Virusreplikation werden vor allem NP und NS1 transkribiert und translatiert, in späten Stadien vermehrt HA, NA und M1 (Smith and Hay 1982; Shapiro, Gurney et al. 1987). NP reguliert die Replikation des viralen Genoms, während NS1 die antivirale Interferon-Antwort der Wirtszelle inhibiert (Garcia-Sastre, Egorov et al. 1998). Das A/NS1-Protein bindet außerdem an 5'-NCRs viraler mRNAs und den Translationsinitiationsfaktor eIF4GI und führt so zu einer verstärkten Translation viraler mRNAs (Park and Katze 1995; Aragon, de la Luna et al. 2000; Burgui, Aragon et al. 2003). Diese Funktion wird unterstützt durch Inhibition von Spleißen und Polyadenylierung zellulärer (prä)-mRNAs sowie deren Kernexport (Fortes, Beloso et al. 1994; Nemeroff, Barabino et al. 1998; Chen, Li et al. 1999). Das spät exprimierte M1-Protein inhibiert die virale Transkription und ist am Kernexport der viralen RNP-Komplexe sowie am Zusammenbau der Viruspartikel beteiligt, was seine späte Expression erfordert (Martin and Helenius 1991; Watanabe, Handa et al. 1996; Perez and Donis 1998).

Die neu synthetisierten vRNPs sammeln sich im Kern an und werden anschließend ins Zytoplasma transportiert. An diesem Prozeß sind M1 und das Nukleare Export Protein NEP aktiv beteiligt. M1 assoziiert dabei mit NP und der RNA (Ye, Liu et al. 1999; Baudin, Petit et al. 2001). Um die vRNPs aus dem Kern zu schleusen werden zelluläre Proteine benötigt. So bindet NEP an M1 (Yasuda, Nakada et al. 1993; Akarsu, Burmeister et al. 2003), den zellulären Exportrezeptor Crm1 (Neumann, Hughes et al. 2000) und weitere zelluläre Nukleoporine. Im ER werden die viralen Membranproteine gefaltet, HA und NA werden glykosyliert und die Proteine bilden funktionelle Trimere (HA) beziehungsweise Tetramere (NA und M2) (Doms, Lamb et al. 1993). Die Cysteinreste von HA und M2 werden anschließend im *cis*-Golgi-Netzwerk palmitoyliert (Sugrue, Belshe et al. 1990; Veit and Schmidt 1993). Liegt im HA eine multibasische Spaltstelle vor (wie in einigen H5- oder H7-Stämmen), so wird das HA0-Vorläuferprotein durch die Subtilisin-ähnliche Protease Furin im *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) in die HA1- und HA2-Untereinheiten gespalten (Stieneke-Grober, Vey et al. 1992). Das HA der niedrigpathogenen Subtypen besitzt eine monobasische Spaltstelle und wird nach Freisetzung des Virions außerhalb der Zelle durch exogene Proteasen wie Clara oder Plasmin in der Lunge gespalten (Kido, Murakami et al. 1999). *In vitro* erfolgt die Spaltung durch Zugabe von Trypsin in das Nährmedium der Zellen.

Virionen der Nachkommengeneration werden in polarisierten Zellen assembliert (Boulan and Sabatini 1978; Schmitt and Lamb 2005). Durch apikale „Richtungssignale“, die in den Transmembrandomänen identifiziert wurden (Kundu, Avalos et al. 1996; Lin, Naim et al. 1998; Barman and Nayak 2000), werden HA, NA und M2 zur apikalen Membranseite transportiert. Dort akkumulieren HA- und NA-Proteine in sogenannten „*Lipid raft microdomains*“ (sphingolipid-

und cholesterolreich), wohingegen sich M2-Proteine an der Peripherie dieser Domänen ansiedeln (Leser and Lamb 2005). Neben den RNP-M1-Komplexen erreichen freie Matrixproteine die apikale Membranseite möglicherweise rekrutiert durch die Transmembranproteine oder entlang des Zytoskeletts.

Die vRNPs werden dann „gerichtet“ (*specific/ selective incorporation*) oder „zufällig“ (*random incorporation*) in virale Partikel überführt. Die Abschnürung erfolgt höchstwahrscheinlich durch die Anreicherung von M1-Proteinen am inneren Rand der Lipiddoppelmembran. Die Viruspartikel schnüren sich anschließend durch basale Fusion der Membran von der Zelle ab (Gomez-Puertas, Albo et al. 2000; Latham and Galarza 2001).

Die Freisetzung der Partikel ist für die weitere Infektiosität der Viren entscheidend. Um diesen Prozeß zu gewährleisten, werden Sialinsäuren (HA-Rezeptor) von Membranglykolipiden und Membranglykoproteinen durch die Aktivität der Neuraminidase, sowohl auf zellulärer, als auch viraler Seite entfernt (Barman and Nayak 2000; Nayak, Hui et al. 2004). Dadurch wird die Anheftung an der bereits infizierten Zelle verhindert. Der Einsatz von Neuraminidaseinhibitoren als Influenza-Medikament kann so die Ausbreitung der Viruspartikel vermindern und die Krankheitsphase verkürzen.

### 1.1.5 Die Rolle des Nichtstrukturproteins NS1 in der Immunabwehr

**NS1** supprimiert auf verschiedene Weise die Virus-induzierte, zelluläre Immunantwort. Ausgelöst durch die Infektion mit Influenza A-Viren werden innerhalb der Zelle sehr schnell Signalkaskaden ausgelöst, die zur Etablierung eines antiviralen Status führen sollen. Dies geschieht in erster Linie durch die Synthese und Sekretion von Typ-I-Interferon (IFN  $\alpha/\beta$ ). Interferon aktiviert 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase (RNA-Abbau über RNase L), die Proteinkinase R (PKR) (inhibiert eIF2 $\alpha$ ) und stimuliert die Expression von Mx-Proteinen (hemmen Transkription viraler mRNAs (Garcia, Meurs et al. 2007; Silverman 2007; Zhang and Samuel 2007; Wolff, Zielecki et al. 2008). Ein weiterer Schutzmechanismus der Wirtszelle ist die Erkennung von 5'-Triphosphatresten viraler RNAs oder dsRNA durch interne Rezeptoren wie RIG-I (*Retinoic-acid-inducible gene 1*) und MDA5 (*Melanoma differentiation-associated gene 5*). Die sensorischen Proteine leiten das Signal zur Interferonsynthese an die Transkriptionsfaktoren IRF-3, NF- $\kappa$ B und AP-1 weiter.

Die Fähigkeit des NS1-Dimers dsRNA (Hatada and Fukuda 1992; Qian, Chien et al. 1995) beziehungsweise Einzelstrang-RNA mit einer 5'-Triphosphatgruppe zu binden und mit RIG-I zu interagieren unterbricht die Signalkaskade und somit die Synthese von IFN  $\alpha/\beta$  (Kato, Takeuchi et al. 2006; Pichlmair, Schulz et al. 2006; Mibayashi, Martinez-Sobrido et al. 2007; Opitz, Re-

jaibi et al. 2007). Desweiteren inhibiert NS1 durch Interaktion mit einer TRIM25-Domäne die RIG I-CARD-Ubiquitinylierung (Gack, Albrecht et al. 2009; Ludwig and Wolff 2009). Auch PKR wird durch dsRNA und 5' Triphosphat-haltigen Strukturen aktiviert (Nallagatla, Hwang et al. 2007). Durch die Maskierung dieser viralen Strukturen durch NS1 wird die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  und damit die Blockade der Translation viraler (und zellulärer) Transkripte verhindert. Durch die zusätzliche Komplexbildung mit PKR inhibiert das NS1-Protein gleichzeitig dessen Aktivierung (Lu, Wambach et al. 1995; Tan and Katze 1998; Bergmann, Garcia-Sastre et al. 2000).

### 1.2 Pathogenese und Klinik

Die Übertragung von Influenza A- oder B-Viren erfolgt bei Menschen und Säugetieren meist über Tröpfcheninfektionen (Alford, Kasel et al. 1966). Die Infektion beginnt mit der Bindung des Hämagglutinins über Sialinsäurerezeptoren (Weis, Brown et al. 1988) an die Zellen der Mund-, Nasen- und Rachenschleimhaut und breitet sich von dort weiter aus. Die Inkubationszeit beträgt normalerweise ein bis drei Tage. Typische Symptome sind das plötzliche Auftreten von Kopf-, Muskel- und Gliederschmerzen, Kältegefühl, Schüttelfrost und Husten. Es kommt oft zu hohem Fieber (bis 41°C), Appetitlosigkeit und allgemeinem Schwächegefühl. Diese Phase dauert in etwa drei Tage und bei Eliminierung des Virus klingt das Fieber innerhalb von sechs Tagen ab. Husten kann bis zu mehreren Wochen anhalten. Bei schwerwiegenden Krankheitsverläufen dauern die Symptome bis zu zwei Wochen an. Im Patienten kommt es dabei zu zeitweilig schweren Veränderungen mit Entzündungsreaktionen von Larynx, Luftröhre, Speiseröhre und Bronchien (Horner and Gray 1973; Little, Hall et al. 1978). In den schleimproduzierenden Schichten und im Flimmerepithel kommt es zu Zellzerstörungen. Es bildet sich eine verdickte, hyalinisierte Basalschicht in Verbindung mit submucösen, ödematösen Anschwellungen aus. Diese Bereiche werden von neutrophilen und mononukleären Zellen infiltriert. Bei Ausbildung einer primären viralen interstitiellen Lungenentzündung gelangen Viren auf die Zellen des Lungenparenchyms (Yeldandi and Colby 1994). Infolgedessen werden Anschwellungen der Alveolarwände und Zerstörung des Epithels beobachtet. Als Folge kann es zu Blutungen und Rissen in den Alveolar- und Bronchiolenwänden mit Einwanderung mononucleärer Zellen kommen. Lungenentzündungen können auch sekundär durch bakterielle Überinfektion (vor allem durch *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* und *Haemophilus influenzae*) entstehen (Sethi 2002). Die bakteriell ausgeschiedenen Proteasen führen in einem solchen Fall zu einer Pathogenitätssteigerung der Influenzaviren.

Die schwersten Verlaufsformen sind der perakute Todesfall und primäre Influenzapneumonien. Auch Myokarditiden und Enzephalitiden treten auf. Zu Komplikationen kommt es häufig im Zusammenhang mit Grunderkrankungen wie Herz-Lungen- und Stoffwechselerkrankungen sowie bei älteren und immunsupprimierten Personen. Lebensbedrohend wirken sich dabei besonders bakterielle Superinfektionen und die Entwicklung von Pneumonien aus (Sprenger, Mulder et al. 1993; Simonsen, Clarke et al. 1997).

### 1.3 Forschung und Lehre der Epidemien humaner Influenza A-Viren

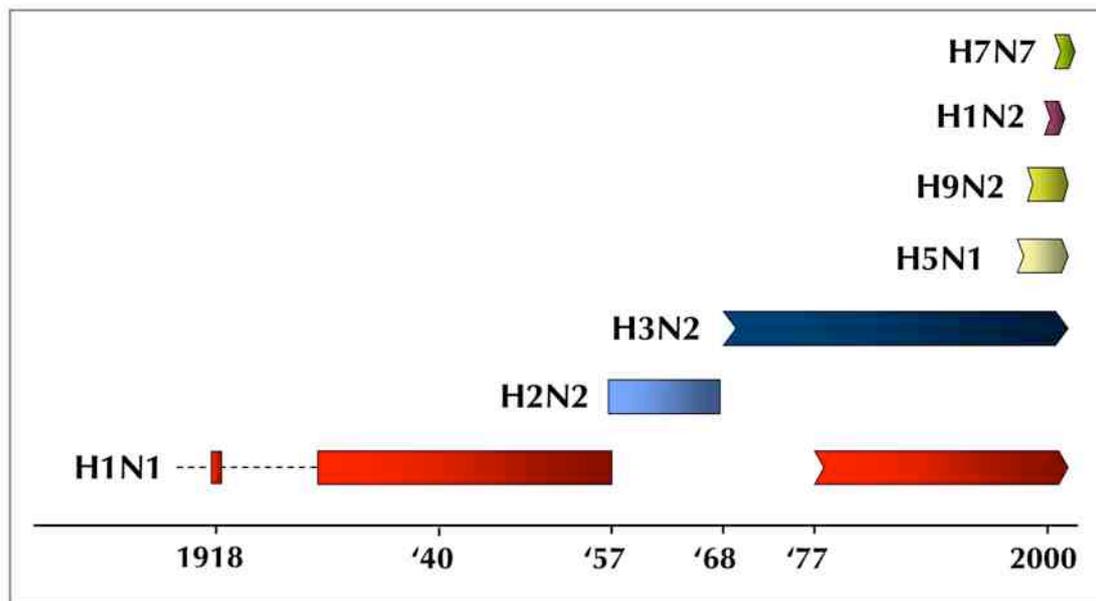


Bild 1.7: Übersicht über nachgewiesene Infektionen des Menschen durch Influenza A-Viren im 21. Jahrhundert. Die Übertragung von Influenza A-Viren der Subtypen H5N1, H9N2 und H7N7 auf den Menschen betraf nur Einzelfälle.

Influenzaviren sind weltweit verbreitet. Neben den Influenza B-Viren zirkulieren seit 1977 parallel zwei Subtypen der Influenza A-Viren (IAV), H1N1 und H3N2. Viren des Typs A treten in Form von saisonalen Epidemien und seltenen Pandemien auf. In den letzten 100 Jahren gab es drei große Pandemien. Im Juni 2009 rief die WHO als Folge der weltweiten Zirkulation eines „neuen H1N1“-Virus, einer Reassortante aus porcinen, aviären und humanen Segmentlinien, ebenfalls eine Pandemie aus. Als pandemisch bezeichnet man Ausbrüche mit sehr weiter geografischer Verbreitung (meist über mehrere Kontinente), sowie Krankheitsausbrüche bei großen Teilen der betroffenen Bevölkerung (20-40 %). Sie sind oft mit hohen Mortalitätsraten verbunden, was jedoch kein zwingendes Kriterium für das Ausrufen einer Pandemie ist. Saisonale Epidemien werden in den gemäßigten Breitengraden zwischen nördlicher und südlicher Hemisphäre der Erde unterschieden. Tropische Gebiete der Erde gelten als ein ständiges

Übertragungsgebiet (Rambaut, Pybus et al. 2008). Bild 1.7 gibt einen historischen Überblick über nachgewiesene Infektionen von Menschen durch Influenza A-Viren.

Phylogenetisch betrachtet sind Influenzaviren aviären Ursprungs, ihr natürliches Reservoir sind wild lebende Wasservögel. Die heutzutage in Menschen bzw. in Säugern zirkulierenden IAV entstammen einem ursprünglich aviären Genpool (Webster, Bean et al. 1992). Die Pandemie von 1918 wurde ausgelöst, indem ein ursprünglich aviäres Influenza A-Virus des Subtyps H1N1 auf einen Menschen übertragen wurden. Es existieren bislang verschiedene Theorien wie sich das Virus, das die „Spanische Grippe“ auslöste, als humanpathogenes Virus etablierte. Möglich erscheint die Reassortierung in Schweinen oder die direkte Übertragung von Viren aviären Ursprungs unter Beibehaltung aller Segmente, durch Punktmutationen (Taubenberger, Reid et al. 2005; Antonovics, Hood et al. 2006; Vana and Westover 2008).

Influenzainfektionen des Menschen traten jedoch schon vor 1918, beispielsweise in den Jahren 1847, 1889/90 und 1900 (Epidemien im Raum Chicago, USA) auf (Evans and Heckard 1918). Das Auftreten des Stammes H1N1 ab 1918 („Spanische Grippe“) zeichnete sich durch eine besonders hohe Pathogenität des Virus aus, die seit der Entschlüsselung des Genoms bis heute Gegenstand intensiver Forschung ist (Reid, Fanning et al. 1999; Taubenberger, Reid et al. 2005; Tumpey, Basler et al. 2005; Tumpey, Garcia-Sastre et al. 2005). Die „Spanische Grippe“ markierte einen Startpunkt der Evolution der heute bekannten humanpathogenen Influenza A-Viren, die in dieser Form bis 1957 zirkulierten. Durch Rekombination mit den Segmenten HA, NA und PB1 eines aviären H2N2-Virus, entstanden die humanen IAV des Subtyps H2N2, dessen Verbreitung sich als Pandemie von 1957 („Asiatische Grippe“) manifestierte. Weitere Reassortierung von aviärem HA und PB1 eines H3-Virus mit sechs Segmenten des H2N2-Virus im Jahr 1968 führt zur Verdrängung von H2N2 durch H3N2-Viren. Diese Veränderung hatte eine weitere Pandemie („Hong Kong-Grippe“) zur Folge. Solche H3N2-Viren zirkulieren bis heute und dominierten zahlreiche saisonale Epidemien, sie erwarben jedoch innerhalb verschiedener Linien (*clades*) zahlreiche Veränderungen, vor allem im HA und NA. Parallel dazu zirkulieren seit 1977 H1N1-Viren, die genetisch den Stämmen vor 1958 entsprechen. Das Wiederauftreten dieses Stammes löste 1977 die „Russische Grippe“ aus. Man vermutet, dass dieser Stamm in kryokonservierter Form überdauerte (Scholtissek, Rohde et al. 1978; Kawaoka, Krauss et al. 1989). H3N2- und H1N1-Viren zirkulieren bis heute parallel in der Bevölkerung. Ihre Antigene bilden zusammen mit denen der Influenza B-Viren die Komponenten für die trivalenten Grippe-Impfstoffe.

## Einleitung

Influenza A Viren weisen hohe Mutationsraten auf. Antigene Bereiche liegen im Hämagglutinin und der Neuraminidase vor. Die HA1-Domäne des Hämagglutinins unterliegt aufgrund der höchsten Epitopdichte dem größten positiven Selektionsdruck (Ghedin, Sengamalay et al. 2005). H3-HA-Proteine entwickelten sich seit ihrer Einführung in die humanpathogene Linie seit 1968 mit einer Mutationsrate von  $4 \times 10^{-3}$  Substitutionen pro Nukleotid pro Jahr. In der HA1-Domäne liegt die Mutationsrate sogar bei  $5 \times 10^{-3}$  (Webster, Bean et al. 1992). Die hohe Mutationsrate der antigenen Epitope ist die Ursache für die ständig notwendige Aktualisierung der Impfstoffkomponente. In H1-HA-Proteinen ist diese Mutationsrate sehr viel geringer (Rambaut, Pybus et al. 2008). Evolution und dynamische Entwicklung der IAV sind von vielen Faktoren abhängig. Sie folgen dem komplexen Zusammenspiel aus hohen Mutationsraten, vor allem in den antigenen Bereichen der Glykoproteine und ständig auftretenden Reassortierungsereignissen innerhalb eines Subtyps, auch der internen Gensegmente. Ein weit verbreiteter Genpool, die natürliche Selektion immun-evasiver HA- und NA-Varianten und die funktionelle Interaktion zwischen den Gensegmenten und der Dynamik globaler Epidemien üben ebenso ihren Einfluss aus. Neben den antigenen Eigenschaften hängt die Persistenz innerhalb des Wirtes Mensch für das Virus weiterhin von seinen Replikationseigenschaften, der Transmissionsfähigkeit und –häufigkeit ab. Ein Selektionsdruck auf die Viren wird weiterhin durch Immunität und Impfstatus der Bevölkerung ausgeübt (Rambaut, Pybus et al. 2008). Tabelle 1.1 zeigt die wechselnde Dominanz der saisonalen Epidemien von A/H3N2-, A/H1- oder Typ B Influenzaviren seit 1989/90 in Deutschland.

Tabelle 1.1: Vorkommen der Virustypen und Subtypen (in Prozent) seit der Saison 1989/90 in Deutschland (Biere and Schweiger 2008)

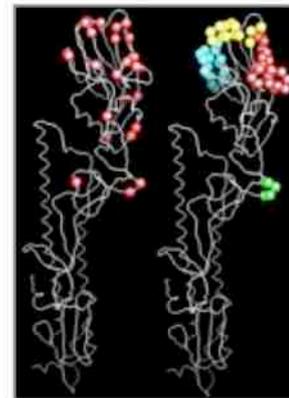
Saison	Influenza Typ/Subtyp			
	A/H1N1	A/H3N2	A/H1N2	B
1989/90	n.d.	82	n.d.	18
1990/91	15	n.d.	n.d.	85
1991/92	31	69	n.d.	n.d.
1992/93	n.d.	16	n.d.	84
1993/94	n.d.	100	n.d.	n.d.
1994/95	2	19	n.d.	79
1995/96	42	55	n.d.	3
1996/97	6	39	n.d.	55
1997/98	7	92	n.d.	1
1998/99	n.d.	67	n.d.	33
1999/00	1	98,8	n.d.	0,2
2000/01	95,2	0,3	n.d.	4,5
2001/02	0,1	46,6	0,3	53
2002/03	0,1	85,9	0,1	13,9
2003/04	n.d.	99	n.d.	1
2004/05	26	54	n.d.	20
2005/06	10	20	n.d.	70
2006/07	13,6	84,9	n.d.	1,5

### 1.3.1 Antigen-*Drift* und Antigen-*Shift*

Influenza A-Viren unterliegen durch Mutationen einzelner Virusproteine ständigen Veränderungen. Dadurch gelingt es ihnen der Immunantwort ihrer Wirte kontinuierlich auszuweichen. Anders als den meisten respiratorischen Viren sind Influenzaviren zwei Mechanismen eigen, die beständig neue Virusvarianten produzieren: Antigen-*Drift* und Antigen-*Shift*.

Antigen-*Drift* tritt durch Punktmutationen in den Glykoproteinen Hämagglutinin und Neuraminidase der Influenza A- und B-Viren auf. Sie führen zu kleineren schrittweisen, antigenen Veränderungen in HA und NA. Die Anzahl der Mutationen entsteht durch die hohe Fehlerrate der RNA-abhängigen RNA Polymerase. Mit einer Häufigkeit von ca. eins zu 100.000 werden falsche Basen in die RNA-Stränge inkorporiert. Diese Mutationen sind über das gesamte Genom verteilt. Bei Influenza A-Viren von Säugern resultieren die „*Drift*-Varianten“ aus positiver Selektion durch neutralisierende Antikörper. Diese Viren können aufgrund von Mutationen (vorwiegend in antigenen Epitopen) nicht mehr von Antikörpern gegen „Elternstämme“ neutralisiert werden.

Antigen-*Drift* des Hämagglutinins: Schon einzelne Mutationen im HA können zu antigenen Veränderungen führen (Wiley, Wilson et al. 1981; Wilson, Skehel et al. 1981; Wiley and Skehel 1987). Betrachtet man die drei-dimensionale Darstellung des H3-HA, erkennt man, dass Mutationen seit 1968 nahezu alle Bereiche der Glykoproteinoberfläche betreffen (Bild 1.8).



**Bild 1.8: Positive Selektion und antigene Epitope.** Kristallstruktur eines H3N2-HA-Monomers. Links positiv-selektierte Varianten, Aminosäuren rot unterlegt. Rechts: relevante antigene Bereiche A (rot), B (gelb), C (grün), D (blau). Quelle: (Wiley, Wilson et al. 1981; Stewart,

Antigen-*Drift* des NA: Driftvarianten sind auch durch Aminosäureaustausche der Neuraminidase bekannt (Tulip, Varghese et al. 1992). Bislang wurden für die Neuraminidase zwei bis drei antigene Bereiche identifiziert (Air and Laver 1989; Air, Laver et al. 1989). Sie sind auf der Oberfläche des Tetramers exponiert und flankieren sialinsäurebindende Bereiche (Tulip, Varghese et al. 1992).

Als Antigen-*Shifts* bezeichnet man den Austausch von HA- und NA-Gensegmenten und der damit verbundenen Entstehung neuer Subtypen. Die neuen Virussubtypen unterscheiden sich immunologisch meist (nicht immer, ein Beispiel dafür ist der Subtyp H1N2 (Xu, Smith et al. 2002) deutlich von vorhergehend zirkulierenden Stämmen. Dieser Umstand kann, wenn neuartige Viren immunologisch naive Wirte infizieren zu hoher Morbidität und Mortalität führen. Drei der vier Influenzapandemien des letzten Jahrhunderts (Kapitel 1.3.1) resultieren aus antigenen *Shifts*. Die Zirkulation neuer Virussubtypen, entstanden durch Reassortierung von In-

fluenza A-Viren unterschiedlichen Subtyps, die eine Zelle infizierten, wird als *Shift* bezeichnet. Die Pandemiegefahr ist besonders hoch, wenn der Genpool eines Virus unterschiedlichen Wirten entstammt, sich zum Beispiel Segmente humaner, aviärer und auch porciner Viren rekombinieren. Die Pandemien von 1957 und 1968 und 2009 sind Beispiele dafür. Die direkte Übertragung neuer Viren auf einen Wirt bezeichnet man ebenfalls als *Shift*, beispielsweise die Übertragung des „1918“-Virus (H1N1) auf die menschliche Bevölkerung.

### 1.3.2 Die Epidemiologie humanpathogener Influenza A (H3N2)-Viren

Die Auswirkungen der Antigen-*Drift* sind besonders für H3N2 Viren gut untersucht. Die antigene Evolution dieses Subtyps verläuft dabei punktuierter als die genetische Evolution. Das bedeutet, dass genetische Veränderungen manchmal einen überproportional großen antigenen Effekt zeigen (Smith, Lapedes et al. 2004). Die natürliche Selektion dieser Viren manifestiert sich alle zwei bis fünf Jahre durch erhöhte Mortalitätsraten (nördliche Hemisphäre) (Nelson and Holmes 2007). Reassortierung innerhalb der verschiedenen H3N2-Linien ist ein wichtiger evolutionärer Mechanismus (Schweiger, Bruns et al. 2006). H3N2-Viren weisen eine hohe Heterogenität hinsichtlich ihrer Genkompositionen auf. Sie werden in phylogenetischen Stammbaumanalysen den drei verschiedenen Linien (*clades*) A, B und C zugeordnet, die innerhalb einer Population ko-zirkulieren und persistieren. Bild 1.9 zeigt als Beispiel die genetische Verwandtschaft der HA1-Domäne des HA-Gens von A/H3N2-Viren zwischen 1998 und 2003.

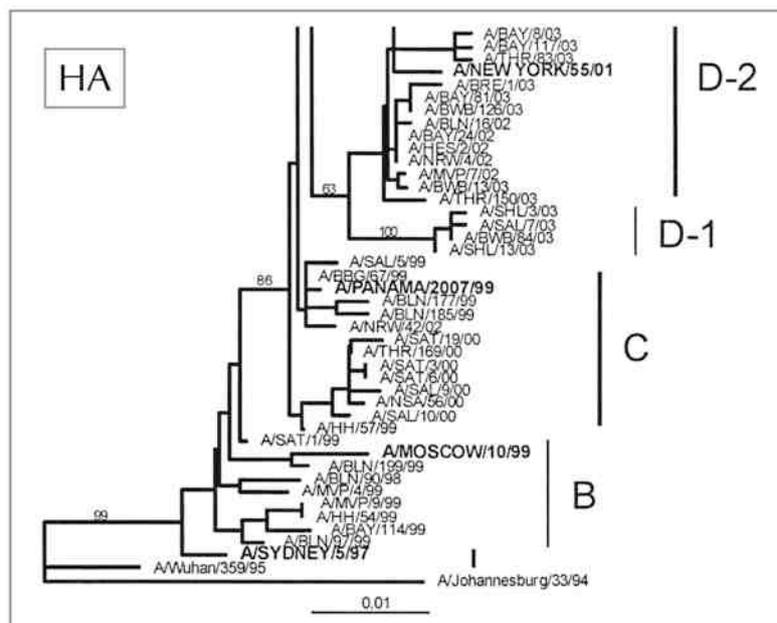


Bild 1.9: Phylogenetische Analyse der HA1-Domäne des HA-Gens von Influenza A-Viren, die zwischen 1998 und 2003 zirkulierten (Ausschnitt). Die Referenzstämme, u.a. A/Moscow/10/99 und A/Panama/2007/99 sind fett gedruckt. Die „bootstrap“-Werte sind angezeigt für die Gruppen (*main clades*) A-D. Horizontale Linien indizieren die prozentualen Sequenzunterschiede basierend auf Nukleotiden. Quelle: (Schweiger, Bruns et al. 2006)

Dabei kommt es häufig zu Reassortierungen zwischen verschiedenen Linien, als Folge kommt es zu einer beschleunigten Antigen-*Drift* (Holmes, Ghedin et al. 2005). Die HA-Proteine der H3N2-Viren akquirierten innerhalb von 30 Jahren im Zeitraum 1969 bis 1999 von ursprünglich nur zwei insgesamt sieben Glykosylierungsstellen und im Zeitraum 1999-2003 weitere zwei (AS 122-124 und 133-135 im HA1). Im Zeitraum 1999-2003 wiesen diese Viren eine verminderte Bindungsaffinität zum Rezeptor 6'SLN auf und agglutinierten nur vermindert Hühner-Erythrozyten (Owen, Yamada et al. 2007; Vigerust, Ulett et al. 2007). Durch die antigenen Veränderungen stieg auch der Selektionsdruck der Viren gegenüber neutralisierenden Antikörpern. Eine Studie, die global die Zirkulation saisonal auftretender Influenza A (H3N2)-Viren untersuchte, identifizierte anhand antigenetischer und genetischer Analysen des Hämagglutinins von 13.000 Influenza A-Viren des Subtyps H3N2 die Region Ost-/ Südostasien als ständigen Ursprung weltweit zirkulierender H3N2-Viren. Sie verbreiten sich von dort über Ozeanien nach Nordamerika und Europa und später nach Südamerika. Diese Verbreitung folgt kontinuierlich einer Art „Einbahnstraße“. Viren, die das ständige Verbreitungsgebiet verlassen, durchlaufen kaum weitere, andauernde antigene Veränderungen. Sollte sich dieses Modell durch weitere Studien bestätigen, wäre es für die jährliche Vorhersage der passenden Vakzin-Stamm-Selektion und damit der Einschränkung der Morbidität und Mortalität hilfreich (Russell, Jones et al. 2008).

### 1.3.3 Die Epidemiologie humanpathogener Influenza A (H1N1)-Viren

Auch die Evolution von H1N1-Viren scheint durch intra-Subtyp Reassortierungen maßgeblich beeinflusst zu werden (Nelson, Viboud et al. 2008). Seit Beginn ihrer Zirkulation haben sich H1N1-Viren kontinuierlich verändert. Sequenzen von Isolaten liegen aus den Jahren 1918-1957, dann erst wieder ab 1977 bis heute vor. Auffällig in der phylogenetischen Analyse sind jedoch zwei Reassortierungsereignisse von Virusisolaten aus den Jahren 1947 und 1951. In beiden Jahren entstanden Viren, die hohe Morbidität und Mortalität auslösten und so Pandemieviren ähnelten, ohne jedoch durch Reassortierung neue Gensegmente anderer Subtypen zu enthalten. Man beobachtete, dass die HA1-Region der 1947er Epidemie-Isolate sich deutlich von denen von 1943-1945 unterschied. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass sich die neuen Viren nicht direkt aus den zuvor dominanten Stämmen entwickelten. Vielmehr entstanden sie aus einer zuvor zirkulierenden, nicht detektierten Untergruppe (*subclade*). H1N1-Viren der Epidemie 1947 beinhalten die PB1-, NA- und M-Gensegmente von Viren aus den Jahren der 1943-1945 gepaart mit neuartigen PB2-, PA-, HA-, NP- und NS-Gensegmenten, die aus einer zuvor nicht detektierten Linie stammten. Die veränderte Virulenz geht demzufolge entweder auf neue antigene Eigenschaften des HA oder Veränderungen in PB2, PA, NP, NS zurück, die zu erhöhter Virulenz und Transmissionsfähigkeit geführt haben. Ein ähnliches Beispiel für die

Bedeutung der intra-Subtyp Reassortierung ist die Entstehung der Epidemieviren von 1951. Sie entstanden aus den HA und PB2-Segmenten von zuvor dominanten Viren, die mit sechs weiteren Gensegmenten von Viren der 1940er Jahre kombiniert waren. Dieser evolutionsgeschichtliche Sprung führte trotz nur geringer *Drift* des HA zu einer schweren Epidemie, die möglicherweise durch erhöhte Replikations- und Transmissionsfähigkeit bedingt war (Nelson, Viboud et al. 2008).

### 1.3.3.1 Neue Influenza A/Viren des Subtyps H1N1 lösten die „Schweinegrippe“ aus

Im Jahr 2009 verbreitete sich jüngst ein neuartiges Pandemievirus des Subtyps H1N1, das sowohl Segmente aus porcinen, aviären, als auch humanenpathogenen Viren enthält (Smith, Vijaykrishna et al. 2009; Wang and Palese 2009). Es wird deshalb als Triple-Reassortante bezeichnet und ist trotz seiner Zirkulation und weltweiten Verbreitung zwischen Menschen unter dem Namen „Schweinegrippe“ bekannt, da es aus Vorläuferviren entstanden ist, die vorwiegend im Schwein zirkulierten. Das Virus verbreitete sich seit März/ April 2009 von Mexiko aus innerhalb weniger Wochen weltweit in über 30 Länder. Aufgrund dieser schnellen Übertragung stieg die Pandemiewarnstufe der *WHO* und es wurde im 11. Juni 2009 eine durch das neue Virus verursachte Pandemie ausgerufen (Warnstufe 6). Genetische Untersuchungen zeigen den hohen Verwandtschaftsgrad zu Virusisolaten, die in den Jahren zuvor in Schweinen zirkulierten und sporadisch auf Menschen übertragen wurden (Newman, Reisdorf et al. 2008; Shinde, Bridges et al. 2009). Das Virus ist ein Beispiel für die Gefahr, dass im Wirtsorganismus Schwein durch Vermischung genetischer Elemente des Influenza A-Virus Reassortanten mit pandemischem Potential entstehen können. Die Segmente des reassortierten Virus werden im einzelnen folgenden Linien zugeordnet: PB1 (H3N2, *human*); PB2, PA (H1N1, *avian*); NA, M (H1N1, *Eurasian 'avian-like' swine*); HA, NP, NS (H1N1, *classical swine*). Als Spezies-spezifisch z.B. Schweine-Influenzaviren bezeichnet man Viruslinien, die über einen Zeitraum von >10 Jahren vor Übertragung auf eine andere Spezies (z.B. Mensch) vorwiegend innerhalb dieser Spezies zirkulierten.

### 1.3.4 Die Epidemiologie humanpathogener Influenza A (H1N2)-Viren

Die Influenzasaison 2001/02 zeigte die Besonderheit eines weltweit zirkulierenden, durch inter-Subtyp Reassortierung entstandenen Virus des Subtyps **H1N2** (Paget, Meerhoff et al. 2002; WHO 2002). Das antigene Profil der H1N2-Viren, die in den Jahren 2001-2003 identifiziert wurden, blieb aufgrund der nur kurzen Zirkulation weitgehend unverändert. Das **HA**-Gen ähnelte dem des Impfstammes **A/NewCaledonia/20/99**, weshalb sie antigenetisch den H1-Viren zugeordnet wurden. Die anderen sieben Segmente stammen von H3N2-Viren, die in dieser

Zeit zirkulierten. **Sechs Segmente** zeigen die größte Homologie zu **A/Moscow/10/99** (H3N2)-ähnlichen Viren, das **M-Segment** entspricht in der Sequenz einem **A/Panama/2007/99** (H3N2)-ähnlichen Virus. Die H1N2-Reassortante ist demzufolge rein humanen Ursprungs und ähnelt in allen Segmenten sehr den in dieser Zeit zirkulierenden Impfstämmen. Obwohl H1N2-Reassortanten also in ihrer genetischen Komposition neue Viren darstellten, war die Wirtsseite nicht immunologisch naiv und das pandemische Potential damit stark eingeschränkt (Gregory, Bennett et al. 2002; Xu, Lindstrom et al. 2004; Chen, La et al. 2006).

Rekombinante Viren mit Gensegmenten von H1N1- und H3N2-Viren waren bereits seit 1978 sporadisch identifiziert worden. Sie konnten sich jedoch nicht dauerhaft etablieren und hatten dementsprechend keine große epidemiologische Bedeutung. Nachweislich zirkulierten zwischen 1978 und 1980 in einigen Ländern H1N1-Viren, die Polymerase- und NP-Segmente eines H3N2-Virus enthielten (Young and Palese 1979; Nakajima, Cox et al. 1981). Ab 1980 setzten sich H1N1-Viren durch, die keine H3N2-Segmente mehr enthielten. Einen einzelnen Nachweis eines H1N2-Virus gab es im Jahr 1983 in Japan (Nishikawa and Sugiyama 1983). Zwischen Dezember 1988 und März 1989 wurden in China einzelne H1N2-Viren nachgewiesen, die jedoch dieses Verbreitungsgebiet nicht verließen und sich nicht als H1-Viren durchsetzten (Guo, Xu et al. 1992; Li, Zhao et al. 1992). Auch in diesen Viren stammte nur das HA-Segment aus H1N1-Viren, während alle anderen Segmente ursprünglich H3N2-Viren entstammten. Die H1N2-Viren der Jahre 2001-2003 wurden dagegen in 41 Ländern in Afrika, Amerika, Asien und Europa nachgewiesen. Die größten Influenzaausbrüche durch H1N2-Viren wurden in Israel, Ägypten, dem Vereinigten Königreich (U.K.) und Irland detektiert (Paget, Meerhoff et al. 2002; Goddard, Joseph et al. 2004).

Man vermutet, dass die Entstehung von H1N2 aufgrund ihrer genetischen und antigenischen Homogenität auf ein einzelnes Reassortierungsereignis zurückgeht (Xu, Smith et al. 2002). Ungefähr die Hälfte aller Aminosäureaustausche im H1-HA zwischen A/Beijing/262/95-ähnliche und A/NewCaledonia/20/99-ähnliche Viren liegen in Bereichen, die Rezeptorbindung vermitteln und beeinflussen könnten. Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, dass Veränderungen im H1 HA das Ersetzen des H3 HA erst ermöglicht haben (Lin, Gregory et al. 2004).

In Deutschland wurden im März 2002 vom NRZ-Influenza im Bundesland Sachsen drei Fälle von Influenza diagnostiziert, die auf den Subtyp H1N2 zurückzuführen waren. Ihr antigenes Profil glich den damals zirkulierenden H1N2-Isolaten. HA entsprach den zirkulierenden H1-Viren, im NA wurden vier Mutationen im Vergleich zu A/Moscow/10/99 nachgewiesen, von denen zwei bereits durch Stämme der Saison 1999/00 bekannt waren (Biere and Schweiger

2008). Weitere Daten zur phylogenetischen Entwicklung des H1 HA von H1N1- und H1N2-Viren liegen aus Frankreich vor. Sie zeigen, dass sich die Segmente durch charakteristische Aminosäureaustausche im HA der H1N2-Isolate unterscheiden lassen (Al Faress, Cartet et al. 2005). Dies sind: A215T (A218T); A190T (A193T); V166A (V169A) und D273G. Diese Angaben decken sich mit Analysen aus einer Arbeit von Gregory und Kollegen (Gregory, Bennett et al. 2002), die in Klammern angegeben sind. Als weitere Mutation wurde in Isolaten aus Frankreich die Mutation T90A beschrieben, die zu einer weiteren Glykosylierungsstelle nahe des antigenen Bereichs „Cb“ führt (Al Faress, Cartet et al. 2005). Diese Mutationen verdeutlichen das Potential des H1N2-Subtyps sich bei anhaltender Zirkulation unabhängig von H1N1 antigenetisch weiter zu entwickeln.

Als Einzelfall wurde 2007 eine weitere H1N2-Reassortante (aus dem Jahr 2003) beschrieben. Sie geht auf die Rekombination des NA-Segments eines H1N2-Virus mit sieben weiteren Segmenten des Subtyps H1N1 zurück (Al Faress, Ferraris et al. 2008).

### **1.4 Die Glykoproteine Hämagglutinin und Neuraminidase**

#### **1.4.1 Das Hämagglutinin**

Glykoproteine sind Polypeptide mit kovalent gebundenen Mono- oder Oligosacchariden. Dabei ist der Zucker O-glykosidisch mit der Hydroxylgruppe von Serin oder Threonin (O-Glykane) oder N-glykosidisch mit der Aminogruppe von Asparagin-Resten (N-Glykane) verbunden (Rademacher, Parekh et al. 1988). Die Oberflächenglykoproteine der Influenzaviren (HA und NA) sind entscheidend für die Infektion der Wirtszelle und die spätere Abspaltung von der Zelle. Die minimale N-Glykosylierungssequenz eines Proteins ist Asparagin-X-Serin/Threonin (X ist eine beliebige AS ausser Prolin). Normalerweise sind jedoch nicht alle potentiellen Glykosylierungsstellen eines Proteins glykosyliert (Kornfeld and Kornfeld 1985). Der Aufbau der Glykosylierung beginnt an der zytoplasmatischen Seite der ER-Membran und „flippt“ dann in das Lumen des ER, wo weitere Zuckermoleküle (Mannose, Glucose) angehängt werden. Katalysiert durch Oligoacetyltransferase wird das Oligosaccharid auf die Polypeptidkette, (Aminogruppe der Asparaginseitenkette) übertragen sobald das Asparagin in das ER-Lumen hervortritt. Diese Verknüpfung erfolgt über N-Acetylglucosamin. Die N-Glykosylierung wird im Golgi-Apparat beendet (Helenius and Aebi 2001). Hämagglutinin gehört zum komplexen Typ N-glykosidisch gebundener Glykoproteine (neben Hybrid und High-Mannose) (Schachter 2000) und kommt in natürlicher Form nur als trimerer Proteinkomplex vor. Die Aggregation der HA-Monomere er-

## Einleitung

folgt ebenfalls im Golgi-Apparat. Innerhalb des Virions ist das HA C-terminal in der Membran verankert, das entgegengesetzte hydrophile Ende ragt als „Spike“ aus der Zelloberfläche. Um eine Wirtszelle zu infizieren, muß das Vorläuferprotein HA0 in seine Untereinheiten HA1 und HA2 gespalten werden. Beide Untereinheiten bleiben dabei über eine Disulfidbrücke verbunden.

Obwohl die Sequenzidentität auf Aminosäureebene weniger als 50 % betragen kann, ist die Struktur und Funktion der 16 verschiedenen Hämagglutinine hochkonserviert. Die Struktur eines HA-Monomers und eines H1- bzw. H3-Trimers ist im Bild 1.10 ersichtlich. Der globuläre Kopfteil des HA1 enthält die Rezeptorbindungsstelle und die antigenen Bereiche Ca2, Sb, Sa, Ca1 und Cb (für H1) (Skehel and Wiley 2000). Die antigenen Bereiche der H3-Moleküle werden als A-D bezeichnet und sind in Bild 1.8 (1.3.1) dargestellt. Der längliche Stamm des HA2 zeigt die charakteristischen  $\alpha$ -Helices A und B. HA2 bildet außerdem die Transmembrandomäne und das Fusionspeptid.

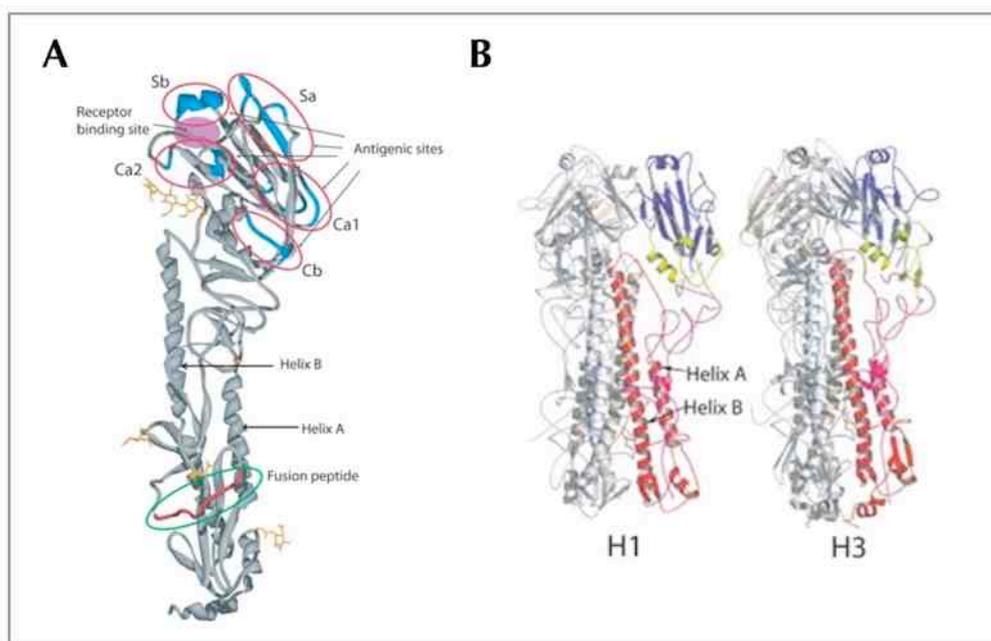


Bild 1.10: **Die Proteinstruktur des HA-Monomers und der H1- und H3-Trimeren.** **A** Die Struktur des H1 Hämagglutinin-Monomers und Darstellung der fünf antigenen Bereichen Ca2, Sb, Sa, Ca1 und Cb, die peripher um die Rezeptorbindungsstelle (violett) liegen. Das Fusionspeptid ist rot gekennzeichnet. Deutlich erkennbar sind die beiden  $\alpha$ -Helices im „Stiel“-Bereich. **B** Die Struktur der Trimeren der Hämagglutinine H1 und H3. Copyright © 2007 Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer Business. Fields Virology, Fifth Edition, by David E. Knipe, Peter m. Howley, Diane E. Griffin, Malcom A. Martin, etc.

Der vom HA vermittelte Fusionsprozeß erfordert eine pH-Wert-abhängige Konformationsänderung (Bild 1.10). Die Erniedrigung des pH-Werts führt dazu, dass Membrananker und Fusionspeptid nach außen exponiert werden, Membranfusion vermitteln und eine Fusionspore entsteht, durch die RNPs ins Zytoplasma gelangen. Der zytoplasmatische Teil des HA enthält drei

palmitoylierte Zysteine. Diese Modifikation hat Einfluss auf effektive Replikation und die Assoziation des HAs in „*Lipid raft microdomains*“ (Zurcher, Luo et al. 1994; Melkonian, Ostermeyer et al. 1999).

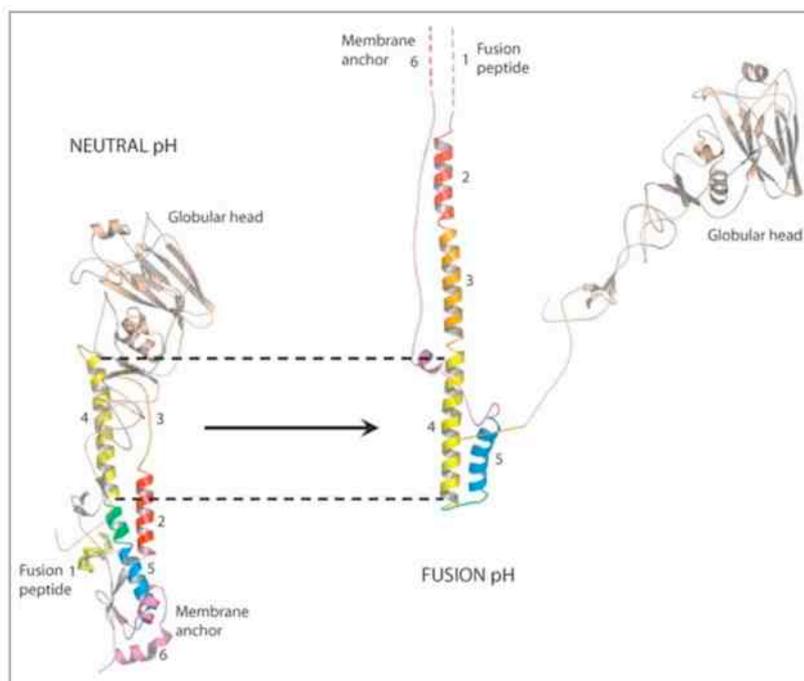


Bild 1.10: **Die pH-abhängige Konformationsänderung des HA.** Um die Fusionsaktivität auszulösen, ist eine Spaltung des HA0-Vorläuferproteins in HA1 und HA2 notwendig. Die beiden Untereinheiten bleiben über Disulfidbrücken verbunden. Die Spaltung führt zu einer Konformationsänderung des HA mit Exposition des Fusionspeptids am N-Terminus der HA2-Untereinheit (Stegmann 2000). Copyright © 2007 Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer Business. Fields Virology, Fifth Edition, by David E. Knipe, Peter m. Howley, Diane E. Griffin, Malcom A. Martin, etc.

Die Fusionsfähigkeit des Hämagglutinins hängt von der Spaltung durch zelluläre Proteasen ab (Klenk, Rott et al. 1975; Lazarowitz and Choppin 1975). Die Art der posttranslationalen Spaltung des HA und die Beschaffenheit der Spaltstelle sind daher wichtige Pathogenitätsfaktoren. Man unterscheidet zwischen monobasischen (eine basische AS, meist Arginin) und multibasischen Spaltstellen. Monobasische Spaltstellen, die in den meisten humanen Viren wie H1, H2 und H3 vorkommen, erfordern die Spaltung durch spezifische, nur im Respirationstrakt vorkommende Proteasen wie Clara (Kido, Yokogoshi et al. 1992), Mini-Plasmin (Kido, Murakami et al. 1999) oder Serinproteasen wie TMPRSS2 und HAT (Bottcher, Matrosovich et al. 2006). Die Trypsase Clara wird nur von sogenannten Clara-Zellen, sekretorisch aktiven Epithelzellen in respiratorischen Bronchiolen freigesetzt. Mini-Plasmin (aus den Vorläuferstufen Plasmin oder Plasminogen) wird von Epithelzellen der Segmentbronchien sekretiert. Die Typ II Transmembran-Serinproteasen TMPRSS2 und HAT wurden als mögliche Kandidaten proteolytischer Aktivierung von Influenza A-Viren identifiziert. Die Prozessierung des HA durch diese Proteasen erfolgt erst nach der Freisetzung der Viren aus der Zelle. Erkannt wird die Sequenzfolge

Glutamin/Glutaminsäure-X-Arginin vor der monobasischen Spaltstelle. Bestimmte Bakterien, z.B. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* und *Haemophilus influenzae* sezernieren HA-aktivierende Proteasen. Bei Koinfektion mit diesen Bakterien können Inflenzaviren besonders schwer verlaufende Infektionen verursachen (Tashiro, Ciborowski et al. 1987).

Die Spaltstelle hochpathogener Influenza A-Viren (wie H5 oder H7) besitzt Insertionen von basischen Aminosäuren. Sie kann daher durch Proteasen wie Furin (vorkommend in Golgi-Vesikeln) oder andere subtilisinähnliche Proteasen wie PC6 gespalten werden (Klenk, Garten et al. 1984; Stieneke-Grober, Vey et al. 1992). Subtilisinähnliche Proteasen kommen ubiquitär in vielen Gewebstypen vor. Sie erkennen bevorzugt die Aminosäurefolge Arginin-X-Arginin/Lysin-Arginin vor der Spaltstelle. Das HA liegt in den Viruspartikeln dann bereits prozessiert vor, was die systemische Ausbreitung der Infektion stark begünstigt und zur hohen Pathogenität der Viren beiträgt.

### 1.4.2 Die Neuraminidase

Die Neuraminidase ist ein tetrameres Glykoprotein. Sein N-Terminus orientiert sich zum Inneren des Virus (Lumen des ER oder Cytoplasma) und es ist ein Typ II-integrales Membranprotein (Colman 1994). Alle neun Neuraminidasesubtypen haben ein hochkonserviertes, kurzes zytoplasmatisches Ende und sind durch eine hydrophobe Transmembranregion verankert. Daran schließt sich die globuläre Kopfreion an. Sie hat die Struktur eines Homotetramers. Jedes Monomer besteht aus sechs  $\beta$ -Faltblattregionen aus wiederum je vier  $\beta$ -Faltblättern, die eine Art „Propeller“ bilden. Die fünf bis acht potentiellen Glykosylierungsstellen sind durch Zuckerreste besetzt. An der Interaktion mit dem Liganden Sialinsäure sind neun konservierte Aminosäurereste beteiligt (Burmeister, Ruigrok et al. 1992).

Schon in der frühen Infektionsphase spielt die Neuraminidaseaktivität eine Rolle (Matrosovich, Matrosovich et al. 2004). Ähnlich wie Hämagglutinin wirken auch Neuraminidasemoleküle antigen und Varianten werden durch neutralisierende Antikörper selektiert (Xu, Cox et al. 1996). Anders als gegen Hämagglutinin wirken sie nicht gegen die Rezeptorbindung, verhindern jedoch in gewissem Maße die Ausbreitung der Viren. Durch Immunisierungen mit NA-Präparationen in Experimenten konnte ein relativer Schutz gegen das Pathogen erreicht werden (Kilbourne, Pokorny et al. 2004). Einige Neuraminidasesubtypen haben möglicherweise Einfluss auf Wirtstropismus und Pathogenität (Takahashi, Suzuki et al. 2001). Einige N2-Neuraminidasen besitzen durch eine fehlende Kohlenhydratkette an Position 146 die Fähigkeit Plasminogen zu sequestrieren, einen Vorläufer des Plasmin. Diese Fähigkeit erleichtert die gewebsunabhängige Spaltung des HA (Goto and Kawaoka 1998).

Die Freisetzung der Viruspartikel von der Wirtszelloberfläche ist ein aktiver Prozeß. Um zu verhindern, dass sich neugebildete Viren mit dem HA an den Sialinsäuren (Neuraminsäuren) der Wirtszelle verankern, werden sie durch die enzymatische Aktivität der Neuraminidase entfernt. Durch die NA-Aktivität werden außerdem Sialinsäuren vom Kohlenhydratgerüst der viralen Glykoproteine selbst entfernt. Dadurch wird die Selbstaggregation der Viren eingeschränkt. Eingeschränkte oder fehlende Aktivität der Neuraminidase, beispielsweise durch Neuraminidaseinhibitoren wie Oseltamivir oder Zanamivir führt zur Verklumpung und massiver Aggregation der Viren an der Zelloberfläche (Palese and Compans 1976; Luo, Nobusawa et al. 1999). Die gegenteilige Funktion von Hämagglutinin und Neuraminidase durch Erkennung des gleichen Liganden (Sialinsäure) erfordert eine funktionelle Balance beider Proteinfunktionen. Eine Störung dieses Gleichgewichts führt meist zu einer Attenuierung des Virus (Wagner, Wolff et al. 2000; Wagner, Matrosovich et al. 2002; Gulati, Wu et al. 2005).

Ähnlich wie Hämagglutinin unterscheiden auch Neuraminidasen zwischen  $\alpha$ 2,3- und  $\alpha$ 2,6-verknüpften Sialinsäuren (Baum and Paulson 1991). Aviäre NAs schneiden nur  $\alpha$ 2,3-verknüpften Sialinsäuren, während humane NAs ebenfalls bevorzugt  $\alpha$ 2,3-SAs schneiden, aber auch die Fähigkeit zur Spaltung  $\alpha$ 2,6-verknüpften Sialinsäuren erworben haben. Diese Substratspezifität wird durch die Aminosäure an Position 275 bestimmt (Katinger, Mochalova et al. 2004; Mochalova, Korchagina et al. 2005; Mochalova, Kurova et al. 2007).

### 1.5 Oberflächenrezeptoren für Influenzaviren und Sialinsäuren

Sialinsäuren sind eine Gruppe von sauren Aminoszuckern, deren Grundgerüst aus neun Kohlenstoffatomen besteht. Die C2-Position ist carboxyliert, und die C5-Position trägt eine Aminogruppe. Wenn diese Gruppe acetyliert ist, dann entsteht N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), der häufigste Vertreter von etwa 50 natürlich vorkommenden Sialinsäuren. Sie sind Bestandteile von Glykokonjugaten wie Glykoproteinen und kommen in Vertebraten auf O-Glykanen oder N-Glykanen (siehe 1.4.1) vor. Sie werden im Golgi-Apparat von Sialyltransferasen auf Glykokonjugate übertragen (Harduin-Lepers, Mollicone et al. 2005). Sialinsäuren liegen  $\alpha$ 2,3-,  $\alpha$ 2,6- oder  $\alpha$ 2,8-gebunden an Galaktose (bei O-Glykanen auch gebunden an N-Acetylgalaktosamin) vor (Blix, Lindberg et al. 1956). Aufgrund ihrer endständigen Position an den Glykanketten, sind sie prädestiniert für die Interaktion mit anderen Molekülen. Bedeutend für die Strukturvielfalt von Glykokonjugaten und damit ihre biologische Funktion sind Ladung, saurer Charakter und räumliche Ausdehnung. Sie dienen der Maskierung von Strukturen oder werden von Ihnen

## Einleitung

Bindungspartnern, beispielsweise Viren und Bakterien, zur spezifischen Erkennung genutzt. (Kelm and Schauer 1997; Schauer, de Freese et al. 1997).

Influenzaviren binden an endständige N-Acetylneuraminsäuren (Sialinsäuren) auf der Oberfläche ihrer Wirtszellen und leiten somit die Infektion ein. Das Hämagglutinin ist aufgrund der spezifisch sterischen Verlinkung von Sialinsäure und Zuckerrest an bestimmte Wirte angepasst. Zwei der bevorzugten Rezeptoren des Hämagglutinins,  $\alpha 2,3$ - oder  $\alpha 2,6$ -gebundene Sialinsäuren (SA), sind in Bild 1.11 dargestellt.

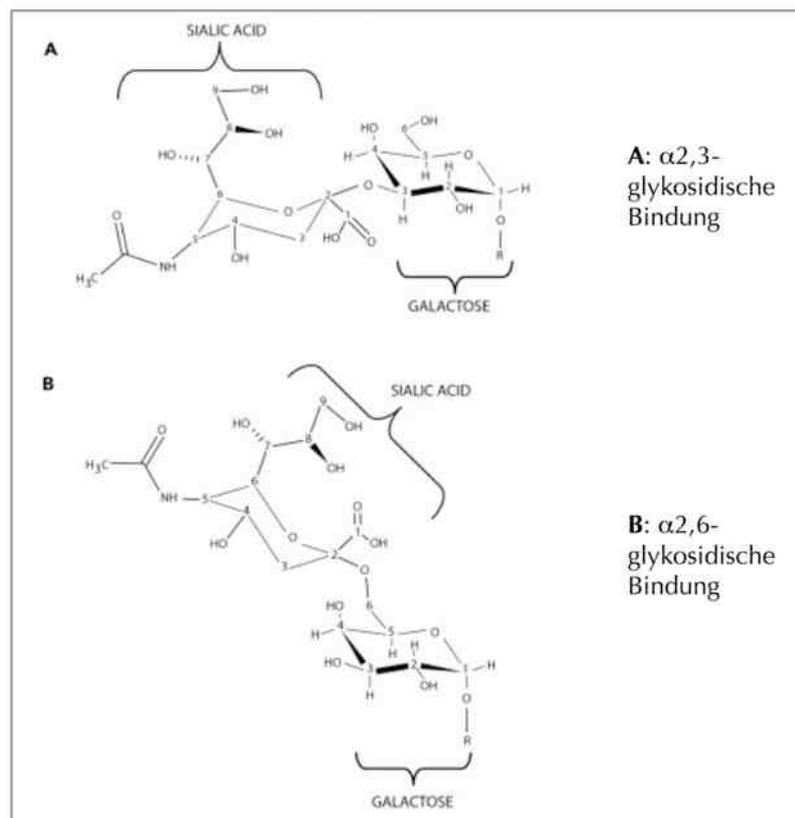


Bild 1.11: **Sialinsäuren sind an das nicht-reduzierende Ende von Oligosacchariden in  $\alpha 2,3$ - oder  $\alpha 2,6$ -Stellung gebunden.** **A:** Das C2-Atom der  $\alpha 2,3$ -Sialinsäure (aviärer Rezeptor) ist verbunden mit dem C3-Atoms des Zuckers (Galaktose). **B:** Die Sialinsäure ist  $\alpha 2,6$ -verbunden (humaner Rezeptor). Das C2-Atom der Sialinsäure ist verbunden mit der C6-Position des Zuckers (Galaktose). Copyright © 2007 Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer Business. Fields Virology, Fifth Edition, by David E. Knipe, Peter M. Howley, Diane E. Griffin, Malcom A. Martin.

Aviäre Influenzaviren binden bevorzugt an  $\alpha 2,3$ -SA, humane dagegen favorisieren  $\alpha 2,6$ -SA (Rogers and Paulson 1983; Connor, Kawaoka et al. 1994). Wirtsorganismen, die beide Ausprägungen auf ihrer Zelloberfläche haben, können sowohl von Viren die bevorzugt an  $\alpha 2,3$ -SA binden (aviäre Viren) oder aber normalerweise  $\alpha 2,6$ -SA als Erkennungsrezeptor nutzen (humanpathogenen Viren) infiziert werden. Innerhalb solcher Organismen, beispielsweise Schweinen, kommt es deshalb häufiger zu Reassortierungen zwischen Viren ursprünglich verschiedener Spezies. Man bezeichnet sie daher als „*Mixing vessels*“. Die Gefahr der Bildung von

Reassortanten ist aufgrund dieser fehlenden Restriktion gegenüber aviären oder humanpathogenen Viren erhöht (Kida, Ito et al. 1994; Suzuki 2005). Durch Passage der Influenzaviren in einem bestimmten Wirt können sie durch Mutationen der Rezeptorbindungsstelle an den Wirt adaptieren (Gambaryan, Robertson et al. 1999; Mochalova, Gambaryan et al. 2003). Rezeptorbindungsspezifität und Wirtsspezifität stehen in einem direkten Zusammenhang. Die Rezeptorbindung wird durch die Aminosäuren bestimmt, die innerhalb der „Rezeptorbindungstasche“ im HA exprimiert werden. Für H3-Viren (und H2) sind die Aminosäuren 226 und 228 besonders wichtig. Der Austausch von Leucin zu Glutamin an Position 226 und Glyzin an Position 228 verändert die Bindungsfähigkeit eines Virus von  $\alpha$ 2,6- zu  $\alpha$ 2,3-SA (Ito, Suzuki et al. 1997). Auch die Aminosäure Serin an Position 205 (im antigenen Bereich D des H3) führt zur Bindung des HA von  $\alpha$ 2,3- zu  $\alpha$ 2,6-SA (Suzuki, Kato et al. 1989). Für H1-Viren sind Asparaginsäure (D) aus humanen und porcinen Isolaten oder Glutaminsäure (E) aus aviären Isolaten an Position 190 entscheidend für die Bindung an  $\alpha$ 2,3- oder  $\alpha$ 2,6-SA (Nobusawa, Ishihara et al. 2000; Stevens, Blixt et al. 2006). Weiterhin beeinflussen die Aminosäuren 136, 195 und 225 die Rezeptorbindungsspezifität und -affinität. Außerdem entscheidend für die Bindung des HA ist die Anzahl der Glykosylierungsstellen (Gambaryan, Marinina et al. 1998; Matrosovich, Zhou et al. 1999). Um effizient replizieren zu können, benötigt das Virus eine funktionelle Balance zwischen HA und NA. So führen vermehrte Glykosylierungsstellen zu schwächerer Rezeptoraffinität des HA, schützen aber gleichzeitig vor der Erkennung durch neutralisierende Antikörper (Klenk, Wagner et al. 2002; Wagner, Heuer et al. 2002). Auch Mutationen im NA können die Balance zwischen Rezeptoraffinität des HA und gegenteiliger Enzymaktivität des NA verschieben. Somit bleibt durch erhöhte NA-Aktivität die Replikationsfähigkeit der Viren trotz schwächerer Bindung des HA an den Rezeptor konstant (Wagner, Wolff et al. 2000; Wagner, Matrosovich et al. 2002; Abe, Takashita et al. 2004).

Grundsätzlich zeigen nicht Ei-adaptierte, aus MDCK- oder Vero-Zellen isolierte, humane Influenzaviren ihre stärkste Bindung an 6'SLN. Vergleicht man die Bindung von H1- und H3-Viren von 6'SLN zu 6'SL, so binden alle derzeit zirkulierenden Viren stärker an 6'SLN. Dieses Bindungsverhalten zeigten schon ältere H1-Viren. Neuere H3-Viren (nach 1992) erwarben diese Eigenschaft durch Mutationen der Rezeptorbindungsstellen, ältere H3-Viren unterschieden sich in ihrer Bindung an 6'SLN zu 6'SL nicht (Matrosovich, Gambaryan et al. 1993; Gambaryan, Piskarev et al. 1995; Gambaryan, Tuzikov et al. 1997; Mochalova, Gambaryan et al. 2003).

## 1.6 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

NK-Zellen können selektiv virusinfizierte Zellen und Tumorzellen, sowie Bakterien, Protozoen und Pilze erkennen und eliminieren (Barao and Ascensao 1998) (Bild 1.12). Durch Freisetzung zytoplasmatischer Granula, die Granzyme, Serinesterasen oder Perforin (porenbildende Proteine) enthalten, werden Pathogene über verschiedene Wege eliminiert, deren weitere Verbreitung und daraus resultierende Gewebsschäden verhindert (Wei, Gamero et al. 1998).

Die natürlichen Killerzellen im menschlichen Organismus entwickeln sich aus peripheren myeloiden Stammzellen des Knochenmarks. Sie zählen in der Gruppe der Leukozyten zu den großen granulären Lymphozyten. Immunologische Kennzeichen der Zellen sind das Oberflächenantigen CD56 bei gleichzeitigem Fehlen des T-Zell-Markers CD3 (Robertson and Ritz 1990). Sie werden weiterhin entsprechend der Anzahl ihrer CD56- und CD16-Moleküle unterteilt. 90 % der NK-Zellen besitzen eine hohe Dichte an CD16 bei gleichzeitig geringer Expression von CD56 ( $CD56^{dim}/CD16^{bright}$ ) und wirken vorwiegend zytotoxisch. Dagegen haben Zellen mit hoher Dichte an CD56 ( $CD56^{bright}/CD16^{dim}$ ) vornehmlich immunregulatorische Funktionen durch Zytokinsekretion (Lanier, Le et al. 1986; Cooper, Fehniger et al. 2001).

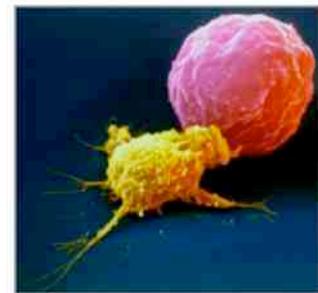


Bild 1.12: NK-Zelle (gelb) beim Angriff auf eine (infizierte) Zelle. Foto: Prof. Rupert Handgretinger

Bei der Erkennung und Lyse sind zwei verschiedene Mechanismen bekannt, die sich sowohl durch die Rezeptoren, als auch in der darauf folgenden Signalweiterleitung unterscheiden. So können Zielzellen durch die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (*Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity, ADCC*) eliminiert werden. Die NK-Zelle wird durch Aktivierung des CD16-Markers (FcγRIII) aktiv, der den Fc-Teil von gebundenem IgG auf der Zielzelle erkennt. Dafür ist vorherige Sensibilisierung und klonale Expansion von B-Zellen sowie deren Antikörpersekretion nötig (Katz, Mitsuyasu et al. 1987; Vivier, Tomasello et al. 2008). Davon unterscheidet sich die Identifizierung von Zielzellen ohne vorherige Sensibilisierung und Antikörperbildung (natürliche Zytotoxizität) (Cantoni, Bottino et al. 1999; Mandelboim, Malik et al. 1999; Pende, Parolini et al. 1999; Sivori, Pende et al. 1999). NK-Zellen erkennen virusinfizierte Zellen als Teil der Antikörper-unabhängigen, zellvermittelte Zytotoxizität (angeborenen Immunität). Im Zusammenhang mit Influenza A-Viren wurden in den letzten Jahren NK-Zellrezeptoren identifiziert, die exprimierte Glykoproteine auf der Influenza-infizierten Zelle binden und dadurch die Lyse der infizierten Zelle einleiten. Wie essentiell diese Rezeptoren sind, zeigt eine Studie, bei der das fehlende Homolog des NK-Zellrezeptors NKp46, NCR1, im Zusammenhang mit einer In-

## Einleitung

fluenzainfektion in Mäusen letal war (Gazit, Gruda et al. 2006). Eine ausgewählte Übersicht der inhibitorischen, kostimulatorischen und aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren zeigt Tabelle 2 (Lanier 2008).

Tabelle 1.2: Eine Übersicht über humane Rezeptoren natürlicher Killerzellen

Rezeptor	Struktur	Ligand
3 Familien inhibitorischer Rezeptoren: KIR ( <i>killer cell-Ig-like receptors</i> ) LIR ( <i>leukocyte Ig-like receptors</i> ) C-Typ Lektin-Rezeptoren	Ig Ig C-Typ	meist MHC I nicht MHC I z.B. CEACAM1, 2B4
aktivierende Rezeptoren CD16 NKG2D NKG2C / CD94 Nkp30 Nkp44 Nkp46	C-Typ C-Typ Ig Ig Ig	Fc-Teil des IgG MICA/B, ULBPs HLA-E unbekannt, evtl. Tumorantigene virale Hämagglutinine virale Hämagglutinine
kostimulatorischer Rezeptor 2B4	Ig	CD48

Die Lyse der Zielzelle wird durch die Balance zwischen inhibitorischen und aktivierenden Rezeptoren entschieden. Das Expressionslevel und die Verteilung der Rezeptoren spielen dabei eine wichtige Rolle (Bild 1.13).

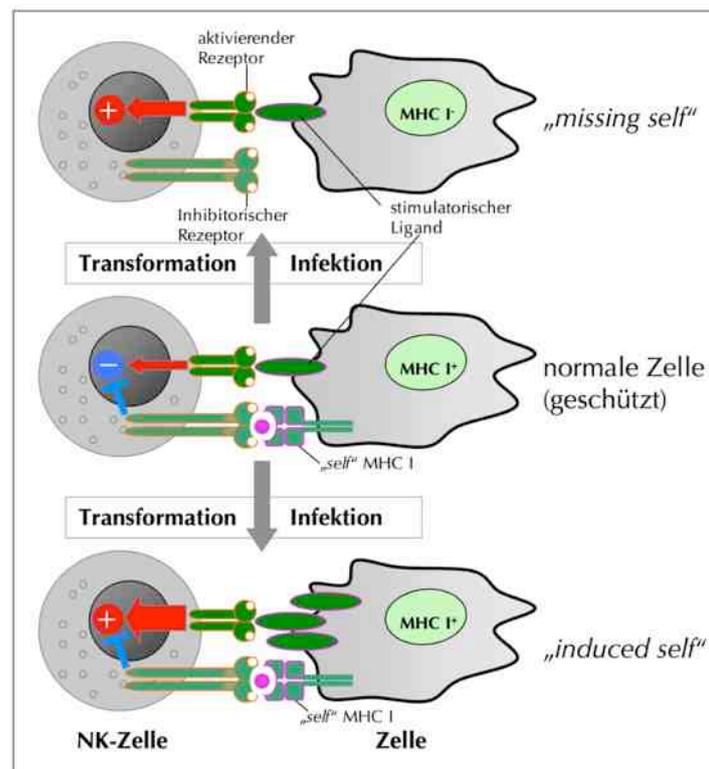


Bild 1.13: Die Erkennung von infizierten oder transformierten Zellen durch NK-Zellen, „missing self“-Hypothese. Oben: Ein aktivierender Rezeptor auf der NK-Zelle erkennt das Antigen auf der Zielzelle, die Zelle wird angegriffen. Mitte: Ein inhibitorischer Rezeptor der NK-Zelle erkennt MHC I auf der Zielzelle, die Zelle ist geschützt. Unten: Ein inhibitorischer Rezeptor der NK-Zelle wird trotz MHC I auf der Zielzelle durch co-stimulatorische Rezeptoren inhibiert, die Zelle wird angegriffen.

## Einleitung

---

Als wesentlicher inhibitorischer Rezeptor wirkt MHC I. In infizierten Zellen kommt es durch den „*Host cell shut off*“ häufig zu einer verminderten Expression von MHC-I-Molekülen auf der Wirtszelloberfläche. Dieses Merkmal ist für Immunzellen von besonderer Bedeutung. Zudem besitzen einige Viren (z.B. Cytomegaloviren) spezielle Mechanismen, die Expression der MHC-I-Moleküle auf der Zelloberfläche zu unterbinden, um damit die Erkennung durch zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu verhindern. NK-Zellen wiederum erkennen bevorzugt Zellen, die verminderte MHC-I-Konzentrationen auf ihrer Oberfläche aufweisen (Long 1999; Lopez-Botet and Bellon 1999; Bottino, Moretta et al. 2004).

Eine besondere Bedeutung gegenüber Influenza A-infizierten Zellen haben die aktivierenden Killerzell-Rezeptoren. Schon in einer Studie aus dem Jahr 1984 konnte gezeigt werden, dass Influenza A-Virusinfektionen eine natürliche zellvermittelte Zytotoxizität auslösen können. Die spezifische Lyse durch NK-Zellen stieg dabei um 20-50 % an, wenn Lymphozyten mit den gereinigten viralen Glykoproteinen HA oder NA (oder beiden) in Verbindung traten (Arora, Houde et al. 1984).

Zwei Veröffentlichungen aus dem Jahr 2001 identifizierten unter den aktivierenden NK-Rezeptoren zwei nichthomologe Rezeptoren der Ig-Superfamilie, die mit viralem Hämagglutinin interagieren. Zunächst wurde NKp46 als wesentlicher aktivierender Rezeptor der natürlichen Cytotoxizität vermutet (Sivori, Pende et al. 1999). Er ist spezifisch für nicht-MHC I-Liganden. Als zelluläre Liganden wurden durch direkte Interaktion mit NKp46-Ig-Fusionsprotein Influenza A-Virus-Hämagglutinin und die Hämagglutinin-Neuraminidase des Parainfluenzavirus identifiziert. Eine Subklasse von NK-Zellen benötigt demzufolge zur Lyse von Zellen, die virales Glykoprotein auf ihrer Oberfläche exprimieren, die Erkennung durch NKp46. Der NK-Rezeptor erkennt und bindet die viralen Glykoproteine auf der Wirtszelloberfläche über die Sialinsäuren auf der Oberfläche des NK-Rezeptors. Dieser Prozeß findet unabhängig von reduzierter MHC I-Expression auf der Oberfläche der Zielzelle statt (Mandelboim, Lieberman et al. 2001).

Auch der aktivierende NK-Rezeptor NKp44, nicht jedoch NKp30 erkennt das virale Hämagglutinin (Arnon, Lev et al. 2001). Die Bindung an HA erfolgt ebenso wie bei NKp46 über die Sialinsäuren auf der Oberfläche des Rezeptors. So bindet Hämagglutinin humaner Viren an  $\alpha$ 2,6-verlinkte Sialinsäuren, während HAs aviärer Stämme  $\alpha$ 2,3-verlinkte Sialinsäuren bevorzugt erkennen. Auch durch die Erkennung des Rezeptors NKp44 findet die erhöhte Lyse Influenza A-Virus-infizierter Zellen durch spezifische NK-Subklassen statt (Arnon, Lev et al. 2001; Ho, Hershkovitz et al. 2008).

Der Rezeptor NKp44 bindet meist auf einem höheren Level an Hämagglutinin als NKp46, was möglicherweise auf mehr Zuckerreste auf dem NKp44-Rezeptor zurückzuführen ist. Über Mutationsstudien wurde die Bindung des Rezeptors NKp46 an Hämagglutinin näher untersucht. Die primäre Bindungsstelle des HA liegt demnach in der zweiten Domäne des NKp46-Rezeptors, wobei Threonin 225 direkt an der Bindung beteiligt ist (Arnon, Achdout et al. 2004).

## 1.7 Rekombination und Reverse Genetik

### 1.7.1 Rekombination

Als rekombinant werden Viren bezeichnet, die genetisches Material aus mehr als einer Quelle enthalten. Im Gegensatz zu Polioviren findet man bei Influenzaviren praktisch keine „Hybridsegmente“, d.h. Segmente die durch Rekombination einzelner Segmentteile der viralen RNA des Virus entstehen. Natürliche Rekombination erfolgt jedoch nur bei kozirkulierenden Stämmen durch Reassortierung. Infizieren zwei oder mehr Viren unterschiedlicher Herkunft eine Zelle, besteht die Möglichkeit, dass genetisches Material in der Zelle vermischt wird und rekombinante Nachkommenviren entstehen. Auch Insertionen in einzelne Segmente, zum Beispiel HA können Nachkommen zu neuen phänotypischen Eigenschaften verhelfen, die Selektionsvorteile verleihen können (Khatchikian, Orlich et al. 1989; Orlich, Gottwald et al. 1994; Suarez, Senne et al. 2004). In ähnlicher Weise können sich Deletionen auswirken (Mitnaul, Matrosovich et al. 2000). Wie umfassende Genomanalysen zeigen (siehe Kapitel Epidemiologie), ereignen sich Rekombinationen kozirkulierender Viren eines Subtyps häufig. Die inter-Subtyp Reassortierung, wie die Entstehung des H1N2-Virus ist dagegen selten.

Da *in vitro* Gewinnung von Influenzaviren mit Hilfe von Methoden der reversen Genetik ebenfalls genetisches Material mehrerer Quellen (Plasmide) verwendet, werden diese Viren, auch wenn sie die acht Segmente ursprünglich eines Stammes

(oder mehrerer) enthalten als rekombinant bezeichnet. Viren mit kombiniertem genetischen Material ursprünglich verschiedener Stämme sind Reassortanten.

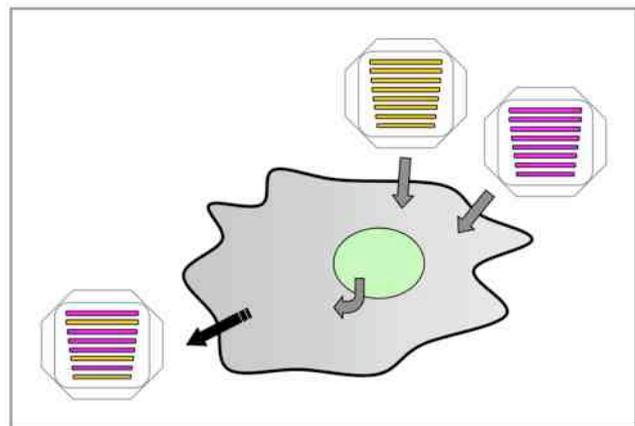


Bild 1.14: **Rekombination von Influenza A-Viren.** Infizieren Viren mit genetischem Material zweier Quellen eine Zelle, so können sich Nachkommenviren mit einem neuen genetischen Phänotyp etablieren.

### 1.7.2 Reverse Genetik

Der Begriff Reverse Genetik beschreibt in der molekularen Virologie die Herstellung bzw. Gewinnung von Viren, die ein Genom abgeleitet aus klonierter cDNA besitzen (Neumann, Whitt et al. 2002). Die genomische Negativstrang RNA der Orthomyxoviren ist anders als bei Plusstrang-RNA Viren *per se* nicht infektiös, da Proteine nicht direkt von der RNA translatiert werden können. Um molekulare Mechanismen, Replikation und Pathogenität der Influenzaviren genauer untersuchen zu können, war das Bestreben sehr groß, diese Viren mit Hilfe artifizierlicher Systeme herzustellen. Problematisch war anfangs die Generierung von acht vRNA-Segmenten und den vier viralen Proteinen des Polymerasekomplex und NP. Weiterhin müssen diese Komponenten des Virus im Zellkern vorliegen, da das Virus im Kern repliziert. Um Influenzaviren in Zellkultur herzustellen, benötigt man neben translatierten Proteinen die Möglichkeit virale genomische RNA zu transkribieren. Dazu muß das Genom mit NP-Proteinen komplexiert sein. Anfangs verwendete man dazu synthetische RNA (abgelesen aus cDNA), gereinigte Proteine (Polymeraseproteine und NP) und Helferviren (Luytjes, Krystal et al. 1989; Enami, Luytjes et al. 1990). Diese Systeme waren wertvolle Anfänge der heute etablierten Systeme, die es ermöglichen Influenzaviren rein Plasmid-gestützt herzustellen. Die ersten Systeme verwendeten noch 12 Plasmide (Fodor, Devenish et al. 1999; Neumann, Watanabe et al. 1999). Eine Weiterentwicklung stellte das System von Hoffmann *et al.* (Hoffmann, Neumann et al. 2000; Hoffmann and Webster 2000; Hoffmann, Stech et al. 2001) dar, dass auf acht Plasmiden beruht und in dieser Arbeit verwendet wurde. Diese Anwendung der Reversen Genetik zur Herstellung von Influenzaviren verwendet den Klonierungsvektor pHW2000. Durch Transfektion der den acht Segmenten entsprechenden Plasmide in 293T-Zellen generiert man initial Virus, dass später auf MDCK II-Zellen vermehrt wird. Die klonierte cDNA wird im Vektor von zwei Promotoren (und den entsprechenden Terminationssignalen) flankiert. 5' befindet sich ein viraler Polymerase II-Promotor zur Transkription von mRNA. Der Sequenz nachgeschaltet ist ein zweiter, ribosomaler Polymerase I-Promotor zur Synthese von genomischer viraler RNA in negativer Orientierung (Bild 1.15 (Jackson, Cadman et al. 2002)). Durch die Klonierung der cDNAs einzelner Segmente ist es möglich, gezielt Mutationen einzufügen und deren Funktion innerhalb der gewonnenen Viren zu untersuchen. Das System findet mittlerweile auch Anwendung in der Gewinnung rekombinanter Influenza B- (Hoffmann, Mahmood et al. 2002; Jackson, Cadman et al. 2002) und C-Viren (Neumann, Fujii et al. 2005).

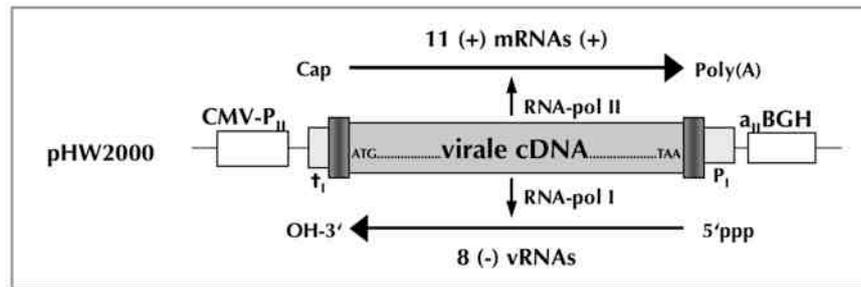


Bild 1.15: **Schematische Darstellung des Vektors pHW2000 mit klonierter cDNA.** Über den viralen CMV-Polymerase I-Promotor wird mRNA transkribiert. Anhand des ribosomalen Polymerase II-Promotors wird vRNA synthetisiert.

## 1.8 Fragestellungen der Arbeit

Viren des Subtyps H1N2 entwickelten sich um das Jahr 2000 durch Reassortierung aus den beiden zirkulierenden Subtypen H1N1 und H3N2. Diesem seltenen Ereignis folgte erstmals die weltweite Verbreitung dieses Subtyps, der in einigen Regionen während der Saison 2001/02 als dominantes H1-Virus zirkulierte (Xu, Smith et al. 2002).

Epidemiologischen Betrachtungen zufolge traf das Virus nicht auf eine immunologisch naive Bevölkerungsgruppe und auch der eingesetzte Impfstoff war wirksam gegen dieses reassortierte Pathogen.

Dennoch ergaben sich auf Forschungsebene zwei zentrale Fragestellungen dieser Arbeit: Wo- durch gelang es dem Virus, über sein Entstehungsgebiet hinaus zu zirkulieren? Welche Eigen- schaften unterscheiden das Virus von den „Elternviren“ der Subtypen H1N1 und H3N2? Wel- che Bedeutung haben dabei die H1N2-typischen Mutationen und die genetische Komposition aus drei Stämmen? Ergeben sich aus diesem Zusammenhang weiterhin Rückschlüsse, warum die Viren nicht dauerhaft zirkulierten? Gewählt wurde für diese Experimente der Ansatz der reversen Genetik. Dazu sollten zunächst für die drei parentalen Stämme, aus denen das H1N2- Virus entstanden war, revers genetische Systeme und die entsprechenden Viren erzeugt wer- den. Später sollte abgeleitet davon die „Rekonstruktion“ eines H1N2-Virus aus den drei paren- talen Stämmen und weiterer Virusreassortanten erfolgen. Die Eigenschaften der Reassortanten sollten so vergleichend zu den entsprechenden Wildtyp-Viren in Bezug auf Vermehrungsfähig- keit und Reaktivität mit Antisera und NK-Zellen charakterisiert werden. Ziel war es weiterhin mit Hilfe virologischer Methoden, das epidemiologisch seltene Ereignis der Entstehung von inter-Subtyp-Reassortanten aus Segmenten rein humanen Ursprungs nachzuvollziehen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmittel

ABTS-Puffer	Roche, Mannheim
ABTS <i>tablets</i>	Roche, Mannheim
ABTS-Stop Solution	KPL Europe, Guildford (UK)
Acrylamidlösung 30% (Acrylamid/Bis-Acrylamid = 30:0,8)	Roth, Karlsruhe
Agarose NEEQ Ultraqualität	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad, München
Ampicillin	Roche, Mannheim
Avicell RC-581	FMC International, Wallingstown, Little Island (IRL)
Bacto-Agar	Becton-Dickinson, Heidelberg
Borsäure	Roth, Karlsruhe
$\beta$ -Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Bio-Max, MR-Film	Kodak, Rochester (USA)
Bovines Albumin (BA) Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA) 30 %	PAA Laboratories, Linz (A)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ )	Merck, Darmstadt
CFSE/ CFDA, SE (Carboxyfluorescein Diacetate, Succinimidyl Ester)	Molecular Probes, Leiden (NL)
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Ciprofloxacin	MP Biomedicals, Eschwege
DABCO (1,4-Diazabicyclo-[2,2,2]-oktan)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DEAE-Dextran	Pharmacia, Freiburg
Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Roth, Karlsruhe
D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco/Invitrogen™, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Steinheim

## Material

---

DNA, 6 x Ladepuffer	Fermentas, St.Leon-Rot
dNTPs (Desoxynukleotidtriphosphate)	Roche, Mannheim
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd 10 %, (Methanol-frei)	Worthington, PA
Formaldehyd 37 %	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom, Cambridge (UK)
Glukose ( $\alpha$ -D-Glukose-Monohydrat)	Roth, Karlsruhe
Glutamin (L-Gln)	MP Biomedicals, Eschwege
Glykogen	Roche, Mannheim
Glyzerol	Roth, Karlsruhe
Glyzin	Roche, Mannheim
Hefeextrakt	Becton-Dickinson, Heidelberg
HEPES	Roth, Karlsruhe
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -Thiogalaktopyranosid)	Biomol, Karlsruhe
Isopropanol (2-Propanol)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Calbiochem, Bad Soden
Kristallviolett	Fluka, Heidelberg
Lipofektamine™ 2000	Gibco/Invitrogen™, Karlsruhe
LSM 1077 <i>Lymphocyte Separation Medium</i>	PAA Laboratories, Pasching (A)
Magermilchpulver	Oxoid, Wesel
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe
Mass Ruler™ DNA Ladder (High+Low Range)	Fermentas, St. Leon-Rot
MEM (Minimal Essential Medium)	Gibco/Invitrogen™, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Mowiol 4-88	Calbiochem, Bad Soden
Natriumacetat (NaAc)	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe

## Material

---

Natriumdesoxycholat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Roth, Karlsruhe
Natriumvanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nitrozellulose- Transfer-Membran (Protran)	Schleicher & Schuell, Dassel
NP-40	Fluka, Heidelberg
Opti-MEM I	Gibco/Invitrogen™, Karlsruhe
Oseltamivir	Roche, Basel (CH)
Parafilm	American National Can (USA)
Pefabloc	Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Gibco/Invitrogen™, Karlsruhe
Phenol	Roth, Karlsruhe
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protein-Molekulargewichtsstandard	Fermentas, St. Leon-Rot
Rotiphenol	Roth, Karlsruhe
(Phenol/Chloroform/Amylalkohol [25:24:1])	
Rotiphoresegel (Acrylamid/Bisacrylamid [29:1])	Roth, Karlsruhe
RPMI-Medium (Roswell Park Memorial Institute)	Gibco/Invitrogen™, Karlsruhe
Saccharose /Sucrose	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva, Heidelberg
Streptavidin-POD- <i>Conjugate</i>	Roche, Mannheim
SuperSignal WestDura Extended	Pierce/ Perbio Science, Bonn
Duration Substrate	
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Serva, Heidelberg
Tetrazyklin	Gibco/Invitrogen™, Karlsruhe
Toyopearl-DEAE 650	Tosoh (J)
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin/EDTA	Gibco/Invitrogen™, Karlsruhe
Trypsin (TPCK-behandelt)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypton	Difco, Heidelberg
Tween-20	Roth, Karlsruhe

## Material

---

X-Gal (5-Chlor-4-Brom-3-indolyl- $\beta$ -D-Galactosid)	Roche, Mannheim
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe
Zellkulturflaschen	TPP, Trasadingen (CH) und Nunc/Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Zellkulturschalen	Greiner, Solingen
Zellkulturplatten für NK-Assays	Corning® Ultra-Low Attachment Surface, Corning Incorporated-Life Science, Lowell, MA (USA)
96-Kalotten Mikrotiterplatten schwarz / weiß	Nunc (DK)
96-Kalotten Mikrotiterplatten transparent	Greiner, Solingen

### 2.1.2 Zelllinien

293T Zellen	humane embryonale Nierenzelllinie, transformiert mit dem großen T-Antigen des SV-40 Virus (ATCC CCL-34)
K562 Zellen	Suspensionszellen, humane myeloide Erythroleukämiezelllinie; Quelle: S. Schneider-Schaulies, Universität Würzburg
MDCK II Zellen	„Madin-Darby Canine Kidney“, Epithelzelllinie aus der Niere des Hundes (ATCC CRL-1573)

### 2.1.3 Bakterienstämme

Escherichia coli, Stamm XL1-Blue	<i>recA1 end A1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' pro AB lacI qZAM15 Tn10 (Tetr)]</i>
----------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------

### 2.1.4 Virusstämme

<b>Influenza:</b>	Nationales Referenzzentrum (NRZ) Influenza, Robert Koch-Institut, Berlin und eigene Anzucht
- A/NewCaledonia/20/99 (H1N1)	
- A/Moscow/10/99 (H3N2)	
- A/Panama/2007/99 (H3N2)	
- A/Sachsen/1816/02 (H1N2)	
- A/PuertoRico/8/34 (H1N1)	P. Palese, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY

### 2.1.5 Zellkulturmedien

Je nach Anwendung wurden **MEM** (*Minimal Essential Medium*), **D-MEM** (*Dulbecco's Modified Eagles Medium*) und **RPMI**-Medium ergänzt.

<u>Ansatz für Zellkultur</u>	10 %	FKS
	2 mM	L-Glutamin
	50 µg/ml	Penicillin/Streptomycin
	10 µg/ml	Ciprofloxacin
<u>Ansatz für Transfektionen</u>	10 %	FKS
	2 mM	L-Glutamin
<u>Ansatz für Infektionen</u>	0,2 %	BSA
	2 mM	L-Glutamin
	50 µg/ml	Penicillin/Streptomycin
	10 µg/ml	Ciprofloxacin
<u>Trypsin</u>	0,25 %	EDTA
	Phenolrot	
	pH 7,2	
<u>Medium für Plaque-Überschichtung</u>	2 x	MEM
	2,5 %	<u>Avicell-Lösung (autoklaviert)</u>
		im Verhältnis 1:1; Zugabe von
	0,67 %	BSA
	2 %	DEAE-Dextran
	2 %	NaHCO <sub>3</sub>
	1 µg/ml	Trypsin (TPCK behandelt)

### 2.1.6 Medien für Bakterien

Alle Nährmedien wurden autoklaviert bzw. bei Hitzeinstabilität sterilfiltriert.

<b>LB-Medium</b>	10 g/l	Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	10 g/l	NaCl
	pH 7,2	

	Material	
<b>2 x YT-Medium</b>	16 g/l	Trypton
	10 g/l	Hefeextrakt
	10 g/l	NaCl
	pH 7,2	
<b>SOC-Medium</b>	20 g/l	Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	10 mM	NaCl
	<u>2,5 mM</u>	<u>KCl</u>
	• nach dem Autoklavieren Zugabe von 20 mM	Mg <sup>2+</sup> -Sock
<b>MgCl<sup>2</sup>-Sock</b>	1 M	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
	1 M	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
	0,4 % (w/v) Glukose	
<b>LB-Agar mit Ampicillin</b>	LB-Medium	
	<u>1,5 % (w/v) Bacto-Agar</u>	
	• Autoklavieren und Abkühlen auf unter 50 °C, Zugabe von Ampicillin 100 µg/µl, Gießen des Mediums in Petrischalen	
2.1.7 Plasmide		
pcDNA3	Gibco/Invitrogen™, Karlsruhe	
pHW2000 (2000)	erhalten von R. Webster, (Hoffmann, Neumann et al.	
p125-Luc ( <i>firefly</i> )	Vektor enthält das Luciferase-Gen aus <i>Photinus pyralis</i> mit humanem IFN-β-Promotor, erhalten von T. Fujita (Yoneyama, Suhara et al. 1996)	
pRL-TK-Luc ( <i>Renilla</i> )	Vektor enthält das Luciferase-Gen aus <i>Renilla reniformis</i> , das unter Kontrolle eines konstitutiv exprimierten Promotors steht, wird zur Standardisierung verwendet; Promega	
pEGFP-N1	Vektor enthält das Gen des <i>enhanced green fluorescent protein</i> , ein Derivat des grün-fluoreszierenden Proteins; ClonTech, Heidelberg	

## 2.1.8 Oligonukleotide

**Klonierprimer** (wurden ebenfalls als Sequenzierprimer eingesetzt) 5'→3'

Uni12a	AGC AAA AGC AGG
Uni12g	AGC GAA AGC AGG
BD-uni-HA#1	CGA AGT TGG GGG GGA GCA AAA GCA GGG G
BD-uni-HA#2	GGC CGC CGG GTT ATT AGT AGA AAC AAG GGT GTT T
BD-uni-M#1	CGA AGT TGG GGG GGA GCA AAA GCA GGT AG
BD-uni-M#2	GGC CGC CGG GTT ATT AGT AGA AAC AAG GTA G
BD-uni-NA#1	CGA AGT TGG GGG GGA GCA AAA GCA GGA GT
BD-uni-NA#2	GGC CGC CGG GTT ATT AGT AGA AAC AAG GAG T
BD-uni-NP#1	CGA AGT TGG GGG GGA GCA AAA GCA GGG TA
BD-uni-NP#2	GGC CGC CGG GTT ATT AGT AGA AAC AAG GGT ATT TTT
BD-uni-NS#1	CGA AGT TGG GGG GGA GCA AAA GCA GGG TG
BD-uni-NS#2	GGC CGC CGG GTT ATT AGT AGA AAC AAG GGT G
BD-uni-PB1#1	CGA AGT TGG GGG GGA GCG AAA GCA GGC A
BD-uni-PB1#2	GGC CGC CGG GTT ATT AGT AGA AAC AAG GCA TTT
BD-uni-PB2#1	CGA AGT TGG GGG GGA GCG AAA GCA GGT C
BD-uni-PB2#2	GGC CGC CGG GTT ATT AGT AGA AAC AAG GTC GTT T
BD-uni-PA#1	CGA AGT TGG GGG GGA GCG AAA GCA GGT AC
BD-uni-PA#2	GGC CGC CGG GTT ATT AGT AGA AAC AAG GTA CTT
<i>Bfu</i> AI-HA#1	TAT TAC CTG CTC GAG GGA GCA AAA GCA GGG G
<i>Bfu</i> AI-HA#2	ATA TAC CTG CTC TCT ATT AGT AGA AAC AAG GGT GTT TT
<i>Bsal</i> -NP#1	TAT TGG TCT CAG GGA GCA AAA GCA GGG TA
<i>Bsal</i> -NP#2	ATA TGG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GGT ATT TTT
<i>Bsal</i> -PA#1	TAT TGG TCT CAG GGA GCG AAA GCA GGT AC
<i>Bsal</i> -PA#2	ATA TGG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GTA CTT
<i>Bsm</i> BI-PB1#1	TAT TCG TCT CAG GGA GCG AAA GCA GGC A
<i>Bsm</i> BI-PB1#2	ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GCA TTT
<i>Bfu</i> AI-PB2#1	TAT TAC CTG CCT CAG GGA GCG AAA GCA GGT C
<i>Bfu</i> AI-PB2#2	unbekannt
<i>Bsm</i> BI-NA#1	unbekannt
<i>Bsm</i> BI-NA#2	unbekannt

**Sequenzierprimer 5'→3'**

pHW2000-2895f	AGC TCT CTG GCT AAC TAG AG
pHW2000-R325	AGT CGA GGC TGA TCA GC
pHW2000-R342	TGG CAA CTA GAA GGC ACA G
pHW2000-F2951	CTC ACT ATA GGG AGA CCC
HA-NewCal-int_1201-1181	CGT TAA TGG CAT TTT GTG TAC
HA-NewCal-int_451-470	GGC CCA ACC ACA CCG TAA CC
HA-NewCal-int_889-910	GCA CCA ATG GAT GAA TGT GAT G
PA-NewCal-int_274-295	GCT ACA ATG GCA TGG ACA GTT G
PA-NewCal-int_804-824	GCC TTT TTT GAA AAC AAC ACC
PA-NewCal-int_1714-1693	CCT TGA CAC TTG GCC TAT TGC
PB1-NewCal-int_427-447	GGA ACC AGC CTG CTG CCA CAG
PB1-NewCal-int_890-909	GGA AGA TGA TGA CCA ACT CC
PB1-NewCal-int_1795-1777	CCA TAT TTT TGG CTG GAC C
PB2-NewCal-int_1901-1882	GCG GCT GCA AAG GGA AGA AG
PB2-NewCal-int_461-481	CGA CAT AAA TCC TGG TCA TGC
PB1_1773-1759*	GGT TTG ATC CCA CAG C
PB1_484-503*	GGT CTA ACA GCT AAT GAA TC
PB1_902-917*	TCA CAA GAC ACA GAG C
PA_1730-1713*	CCG TTT GTC CTC ACA TAC
PA_443-462*	CTG AGA ATA CAC ACA TTG AC
PB2_598-616*	GAA GAA CTC CGA GAT TGC
PB2_1735-1718*	TTG CAG GAT TCT GAG ACC
HA_1199-1183*	GAT TGC TGC TTG AGT GC
NA_574-589*	TTG AAA AGC ATG GCT G
NP_1024-1009*	GAC TCT TGT GTG CTG G
NP_532-547*	ATG TGC TCT CTG ATG C

\* Die Primer wurden verwendet für die Stämme A/Moscow/10/99 (H3N2) und A/Panama/2007/99 (H3N2).

### 2.1.9 Rezeptoranaloga

HA-Assays:

**3'SLN:** 3' Sialyl(N-Acetyl)lactosamin), Formel: Neu5Ac  $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc

## Material

---

**6'SLN:** 6' Sialyl(N-Acetyl)lactosamin), Formel: Neu5Ac  $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc

**6'SL:** 6' Sialyllactose, Formel: Neu5Ac  $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1-4Glc

NA-Assays:

**3'SLN:** Neu5Ac  $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-spacer-BODIPY

**6'SLN:** Neu5Ac  $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-spacer-BODIPY

**6'SL:** Neu5Ac  $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1-4Glc-spacer-BODIPY

Quelle: (Mochalova, Korchagina et al. 2005)

NK-ELISA:

NKp44-Immunglobulin-Fusionsprotein

NKp46-Immunglobulin-Fusionsprotein

Auf humanen (HEK-293)-Zellen exprimierte Ig-Fusionsproteine, beide erhalten von Carsten Watzl, Institut für Immunologie, Universität Heidelberg

### 2.1.10 Enzyme

Revert Aid™ M-MuLV Fermentas, St. Leon-Rot

Reverse Transkriptase

RNasin (40 U/ $\mu$ l) Promega, Mannheim

*Pfu* Turbo DNA-Polymerase Roche, Mannheim

T4 DNA Ligase (1 U/ $\mu$ l) Roche, Mannheim

#### Restriktionsendonukleasen:

*Eco* RI, *Esp* 3I, *Hind*III, *Pst*I, *Sal*I, *Xho*I Fermentas, St. Leon-Rot

*Bsm* BI, *Bfu* AI New England Biolabs (NEB)

### 2.1.11 Kits

BigDye® Terminator 3.1 Kit Applied Biosystems, Darmstadt

Dual Luciferase Reporter Assay System Promega, Mannheim

Expand High Fidelity PCR System Roche, Mannheim

QIAprep® Miniprep Kit QIAGEN, Hilden

QIAfilter® Plasmid Maxi Kit QIAGEN, Hilden

QIAEXII Gel Extraction Kit QIAGEN, Hilden

## Material

QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
QuikChange® Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene Heidelberg
OneStep RT-PCR Kit	QIAGEN, Hilden
RNeasy® RNA Isolation Kit	QIAGEN, Hilden
NK cell Isolation Kit human	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
MACS Separation Columns (LS)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
In-Fusion™ Dry-Down PCR Cloning Kit	Clontech-Takara Bio Europe (F)

### 2.1.12 Antikörper und Antiseren

#### Primärantikörper

Bezeichnung	Hersteller	Spezies/Eigenschaft	Verdünnung
$\alpha$ -CD3 FITC	BD Biosciences, San Jose, California (USA)	Maus, monoklonal	1:50 (FACS)
$\alpha$ -CD56 PE	BD Biosciences, San Jose, California (USA)	Maus, monoklonal	1:50 (FACS)
$\alpha$ -Influenza A Nukleoprotein	AbD Serotec	Maus, monoklonal	1:1000 (WB/IF)
$\alpha$ -Influenza A Matrixprotein	AbD Serotec	Maus, monoklonal	1:50 (WB)
$\alpha$ -Influenza A PB1 ( $\nu$ K-20)	Santa Cruz Biotechnology	Ziege, polyklonal	1:400 (WB)
$\alpha$ -Influenza A NS1 (23-1)	Stefan Ludwig, Münster	Maus, monoklonal	1:1000 (WB)
$\alpha$ - $\alpha$ -Tubulin (DM1A)	Sigma, St. Louis, Missouri (USA)	Maus, monoklonal	1:10000 (WB)
$\alpha$ -Influenza A (H1N1)	Robert Koch-Institut, Berlin	Frettchen, Antiserum gegen A/NewCaledonia/20/99 (H1N1)	
$\alpha$ -Influenza A (H1N1)	Charité, Berlin	Mensch, Antiserum gewonnen aus Patient (P-60) mit nachgewiesener Influenza A (H1N1)-Infektion	

**Sekundärantikörper**

Zielspezies/Bezeichnung	Modifizierung	Spezies	Hersteller	Verdünnung
Kaninchen IgG	Meerrettich-Peroxidase (HRP)	Schwein	DakoCytomation	1:20000 (WB)
Maus IgG	Meerrettich-Peroxidase (HRP)	Kaninchen	DakoCytomation	1:20000 (WB)
Kaninchen IgG (H+L)	Alexafluor 594 (rot)	Ziege	Molecular Probes	1:1000 (IF)
Maus IgG+IgM (H+L)	Cy <sup>TM</sup> 5	Ziege	Jackson ImmunoResearch Laboratories	1:100 (FACS)
Human IgG (Fc)	Biotin (JDC-10)	Maus	Southern Biotec	1:1000 (ELISA)

2.1.13 Puffer und Lösungen

**PBS**

137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
80,9 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

**PBS<sup>++</sup>/0,2 % BSA**

PBS	
0,2 %	BSA
0,1 g/l	MgCl <sub>2</sub>
0,13 g/l	CaCl <sub>2</sub>

**TN-Puffer**

10 mM	TRIS-HCl pH 7,5
100 mM	NaCl
pH 7,5 eingestellt, steril filtriert	

**Puffer „R“**

**TN-Puffer mit:**

0,01 %	Tween 20
0,01 %	BSA
10 µM	Neuraminidase-Inhibitor (2,2-Didehydro-2,4-Didesoxy-4-amino-N-acetyl-D-Neuraminsäure)

	Material	
<b>20 % Sucrosekissen</b>	TN-Puffer	
	20 % (w/v)	Sucrose
<b>10 x TBE-Puffer</b>	0,89 M	TRIS
	0,89 m	Borsäure
	10 mM	EDTA, pH 8,0
<b>6 x DNA-Probenpuffer</b>	0,1 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,1 % /w/v)	Xylencyanol
	30 %	Glyzerol
<b>2 x SDS-Probenpuffer</b>	1,2 ml	H <sub>2</sub> O
	8,3 ml	0,5 M TRIS-HCl, pH 6,8
	6 ml	10 % SDS (w/v)
	1,5 ml	Glyzerol
	9 mg/ml	Bromphenolblau
	5 %	β-Mercaptoethanol
<b>10 % SDS Elektrophoresepuffer</b>	250 mM	TRIS
	1,92 M	Glyzin
	10 g/l	SDS
<b>Semi-Dry-Blot-Puffer</b>	48 mM	TRIS
	39 mM	Glyzin
	1,3 mM	SDS
	20 %	Methanol
<b>10 x TBST</b>	100 mM	TRIS-HCl, pH 8,0
	1,5 M	NaCl
	0,5 %	Tween 20
<b>RIPA-Puffer</b>	50 mM	TRIS
	150 mM	NaCl
	1 %	Triton-X-100 (v/v)

	Material	
	1 %	NP-40
	0,1 %	SDS
	1 %	Desoxycholat
	• steril filtriert, frisch zugeben:	
	1 mM	Na-Vanadat
	1 mM	Pefabloc
<b>FACS-Puffer</b>		PBS
	0,05 %	BSA
	0,02 %	NaN <sub>3</sub> , pH 7,4
<b>Saponin-Puffer</b>		FACS-Puffer
	0,33 %	Saponin
	filtriert mit Faltenfilter	
<b>Plaque-Färbelösung</b>	0,1 %	Kristallviolett
	10 %	Formaldehyd
<b>Mowiol</b>	2,4 g	Mowiol 4-88
	6 ml	Glyzerol
	6 ml	dH <sub>2</sub> O
	• Über Nacht quellen lassen	
	<u>12 ml TRIS (0,2 M), pH 8,5</u>	
	• Unter Rühren bei 50-60 °C lösen	
	• 15 min bei 4000 rpm zentrifugieren und den Überstand mit 10 % (w/v) DABCO versetzen	
	• Aufbewahren der Aliquots bei -20 °C	
<b>Erythrozytenlysepuffer</b>		
10 x KHCO <sub>3</sub>	1g/100ml	KHCO <sub>3</sub>
10 x NH <sub>4</sub> Cl	8,3 g/100ml	NH <sub>4</sub> Cl
	jeweils steril filtrieren;	
	- je 10 ml der 10 x-Lösung +	
	0,1 mM	EDTA, pH 8
	ad 100 ml	dH <sub>2</sub> O

2.1.14 Geräte

ABI Prism 3100 Genetic Analyser	Applied Biosystems, Darmstadt
Brutschränke	Nuaire/ Zapf, Sarstedt
Elektrophorese-Zubehör	BioRad
ELISA-Reader Spectrafluor Plus	Tecan (A)
FACS	FACSCalibur, Beckton-Dickinson
Luminometer LB96V	EG+G Berthold, Bad Wildbad
PCR Cycler	PE Applied Biosystems (Gene Amp® PCR System 9700); Biometra®
Power Pac 200 bzw. 300	BioRad
Sterilarbeitsbank Hera Safe	Thermo Fischer, Schwerte
Trans-Blot®, Semidry Transfer Cell	BioRad

Zentrifugen:

Zentrifuge RC5C (Rotoren SS-34 und GSA)	Sorvall® Instruments
Ultrazentrifuge L8-70M (Rotor SW-32)	Beckmann®
Ultrazentrifuge TL-100 (Rotor TLA-45)	Beckmann®
Biofuge pico	Hereaus
Labofuge 400R	Heraeus
Multifuge 1 S-R	Heraeus
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf

Mikroskop/ -Zubehör:

Immunfluoreszenz-Mikroskop Diaphot 300	Nikon, Düsseldorf
SPOT RT Digitalkamera	Diagnostic Instruments
Leica DM IL	Leica Microsystems, Wetzlar
Gelaufnahme / UV-System	Intas®

Software:

Mac® OS X 10	Betriebssystem
Microsoft® Office für Mac® 11.0	Word, Exel, Power Point
Lasergene 6	Sequenzauswertung
SPOT 3.5.5 für Windows	Kameraprogramm
BD Cell Quest™ Pro 5.2.1	FACS Aquisition + Analysis Software
Adobe Photoshop 7.0	Bildbearbeitung



## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

In dieser Arbeit wurden adhären wachsende, permanente Epithelzelllinien für die Gewinnung und Anzucht von Virus und analytische Arbeiten, wie die indirekte Immunfluoreszenzanalyse, Plaqueneutralisationstests und Reporter-Experimente verwendet. Die Kulturzellen wurden in neue Kulturgefäße umgesetzt (passagiert), wenn sie einen konfluenten Zellrasen im Kulturgefäß gebildet hatten. Alle Arbeiten mit Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden bei 37°C mit 5 % CO<sub>2</sub> in humider Atmosphäre gehalten.

Die Zellen wurden 2 x mit PBS gewaschen und dann mit 2 ml Trypsin/ EDTA-Lösung pro 75 cm<sup>2</sup>-Flasche im Brutschrank solange inkubiert, bis sich die Zellen vom Boden lösten. Durch Zugabe von 9-11 ml Kulturmedium wurde das Trypsin inaktiviert. Je nach Verdünnung wurden unterschiedliche Anteile der Zellsuspension in neue 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen überführt, in die zuvor ca. 12 ml des jeweiligen Kulturmediums vorgelegt wurden. Die Zellen wurden mit gekennzeichneter Passagenzahl im Brutschrank wieder zu einem konfluenten Zellrasen kultiviert und dann für ein Experiment verwendet oder neu umgesetzt. Zellen, die für die Transfektion bestimmt waren, wurden am Tag vor dem Experiment 1:2 geteilt und waren im allgemeinen innerhalb von <20 h konfluent.

#### 2.2.1.1 Transfektion von Zellen

Über die Methode der Transfektion wird DNA in eukaryotische Zellen eingebracht. In dieser Arbeit wurde hierfür das Reagenz Lipofectamine 2000™ verwendet. Es besteht aus kationischen Lipiden, die mit der zu transferierenden DNA liposomale Komplexe bilden. Wenn die Liposomen mit Membranen verschmelzen, wird die DNA in die Zelle eingeschleust. Als Positivkontrolle wurde in der Regel der Vektor pEGFP-N1 transfiziert, der das Gen für ein Derivat des grün-fluoreszierenden Proteins trägt. Erfolgreich transfizierte Zellen sind unter dem Fluoreszenzmikroskop über das fluoreszierende Protein EGFP (*Enhanced green fluorescent protein*) zu identifizieren.

Ausgehend vom Herstellerprotokoll wurden die Zellen im 12-Kalotten-Format (5 x 10<sup>5</sup> Zellen/Kalotte) wie folgt transfiziert:

Für jede Transfektion wurden maximal 4 µg Plasmid-DNA in einem Endvolumen von 25 µl Opti-MEM® aufgenommen. In einem zweiten Gefäß wurden 3 µl Lipofectamine 2000™ in einem Endvolumen von 125 µl Opti-MEM® aufgenommen und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die beiden Lösungen vermischt und für 15-20 min ebenfalls

bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurden die Zellen durch Trypsin-Behandlung vom Boden der Kulturflasche gelöst und in Kulturmedium oder PBS aufgenommen und für 3 min bei 800 rpm im Falconröhrchen pelletiert. Das Zellpellet wurde in 2,5 ml Transfektions-Medium je 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche aufgenommen. Für jeden Transfektionsansatz wurden 125-180 µl dieser Zellsuspension in jede Kalotte einer 12-Kalotten-Platte gegeben. Nach Ablauf der 20-minütigen Inkubation wurde das Transfektionsgemisch in ca. 1,2 ml Transfektions-Medium aufgenommen und mit der Zellsuspension kombiniert. Die Zellen inkubierten anschließend bei 37°C im Brutschrank. Nach 4-6 h wurden die Zellen 1 x mit PBS gewaschen und anschließend mit Infektionsmedium weiter inkubiert.

### 2.2.1.2 Infektion von Zellen

Die zu infizierenden Zellen wurden mit vorgewärmtem PBS gewaschen und dann mit einer Influenza A-Virus-Suspension infiziert, die auf eine MOI (= *Multiplicity of infection*, Anzahl der infektiösen Einheiten pro Zelle) von 0,01 oder 0,001 eingestellt war. Dazu wurden die Viren (Virus-Stocks, angezüchtet MDCK II-Zellen) in PBS/ BA/ Mg<sup>2+</sup>/ Ca<sup>2+</sup> verdünnt. Die Zellen (1 x 10<sup>6</sup> Zellen/ Kalotte) wurden mit 300 µl Virussuspension pro Kalotte einer 35 mm-Kalotten-Kulturplatte oder Zellkulturschale bzw. PBS/ BA/ Mg<sup>2+</sup>/ Ca<sup>2+</sup> bei „Schein“-Infektionen („mock“) für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurde ein Austrocknen der Zellen durch schwenken der Kulturplatten alle 15 min verhindert. Anschließend wurde die Virussuspension entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit Infektionsmedium überschichtet. Die infizierten Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 2.2.1.3 Anlegen von Zellstocks

Eukaryotische Zellen lassen sich einfrieren und dauerhaft bei -196°C in der Gasphase über flüssigem Stickstoff lagern. Die dafür vorgesehenen Zellen wurden, ausgehend von einer 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche mit einer konfluenten Zellschicht mit PBS gewaschen und mit Trypsin abgelöst. Nach Zugabe von Medium oder PBS wurden die Zellen in einem 15 ml Falcon-Röhrchen für 3 min bei 800 rpm pelletiert und in 2 ml Medium folgender Zusammensetzung aufgenommen:

- 10 % DMSO
- 20 % FCS in Medium MEM oder D-MEM (keine weitere Zugabe von Glutamin oder Antibiotika).

Die Zellsuspension wurde auf 2 Polypropylen-Kryogefäße verteilt. Daraus resultierte eine Zelldichte von 5 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Kryogefäß, was einer 50 % konfluenten Kulturflasche entspricht. In einer mit 2-Propanol gefüllten Kryo-Box wurden die Zellen durch langsam bis auf -70°C abgekühlt. Anschließend wurden die gefrorenen Zellen zur Dauerlagerung in den Stickstofftank

transferiert. Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen wurden sie im Wasserbad aufgetaut und direkt anschließend in eine Zellkulturflasche mit vorgewärmtem Medium gegeben. Nach 24 h im begasten Brutschrank wurden die Zellen weiter passagiert.

### 2.2.2 Zellbiologische Methoden

#### 2.2.2.1 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse

Proteine lassen sich durch spezifische Antikörper im Zellinneren auf mikroskopischer Ebene detektieren. Das Prinzip der indirekten Immunfluoreszenzanalyse beruht auf der Bindung zweier Antikörper. Dabei bindet ein Primärantikörper Antigen-spezifisch an ein Protein. Der Sekundärantikörper, ein anti-Immunglobulin-Antikörper, bindet dann nachfolgend Spezies-spezifisch an die konstanten Domänen des Primärantikörpers. Er weist damit gebundene unmarkierte Antikörper an einem Protein nach. Der Nachweis wird hierbei über Fluoreszenzfarbstoffe geführt, die an Sekundärantikörper gekoppelt sind. Diese Fluoreszenzfarbstoffe strahlen nach Anregung im UV-Licht eines definierten Spektralbereiches und ermöglichen unter dem Fluoreszenzmikroskop eine Lokalisationsbestimmung der detektierten Proteine in der Zelle.

Die ausgesäten Zellen wuchsen auf Deckgläschen in Zellkulturplatten. Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen, um Immunglobuline aus Serum zu entfernen und eine starke Hintergrundfärbung zu vermeiden. Sie wurden dann mit 2,5 %-Formaldehydlösung in PBS auf den Deckgläschen fixiert und anschließend mit 0,2 %-Triton-X-100-Lösung in PBS  $Mg^{2+}$  /  $Ca^{2+}$  permeabilisiert, um ein Aufnehmen der Antikörper durch die Zelle zu ermöglichen. Die Primärantikörper wurden in PBS/ 3 % BA verdünnt, wobei die optimale Verdünnung für jeden Antikörper spezifisch ist. Von der Antikörperlösung wurden 20  $\mu$ l auf einem Stück Parafilm vorgelegt. Das Deckgläschen wurde mit der Zell-bewachsenen Seite nach unten auf die Antikörperlösung gelegt und mit einem Stück feuchten Filterpapiers in einer geschlossenen Kammer waagrecht für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der überschüssige Primärantikörper durch 2 x Waschen mit PBS entfernt. Daran schloss sich eine 45-60-minütige Inkubation mit 20  $\mu$ l Sekundärantikörper (ebenfalls verdünnt in PBS/ 3 % BA) an. Die Kammer wurde dazu an einem dunklen Ort gelagert. Überschüssiger Antikörper wurde durch 3 x waschen mit PBS entfernt und 1 x in  $dH_2O$  gewaschen, um störende Salze zu entfernen. Die Deckgläschen wurden danach auf einem Objektträger in 5-10  $\mu$ l Mowiol eingebettet. Nach dem Aushärten über Nacht bei 4°C wurden die Präparate unter einem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

#### 2.2.2.2 Reporterstudien

Für Reporter-Gen-Assays wurden in der hier vorliegenden Arbeit u.a. Reporterplasmide aus dem PathDetect® Cis-Reporting System (Promega) verwendet. Dieses System dient der Analyse von

spezifischen Promotoraktivierungen in der Zelle. Ausgangskonstrukt für die Reporterplasmide ist der Reporter-Vektor pLuc-MCS. Der Vektor enthält eine multiple Klonierungsstelle für die Insertion von Enhancer-Elementen. Das Enhancer-Element und die TATA-Box kontrollieren die Expression des Reportergens. Reporterstudien wurden zur Messung des Influenzavirus-Minigenoms (PB1/PB2/PA/NP + Luziferase-Expressionskonstrukt) durchgeführt. In dem hier verwendeten pPol-NS-Luc Konstrukt befindet sich anstelle der beiden viralen NS-Gene das Luziferase-Gen unter Kontrolle der viralen Promotoren. Die virale Polymerase schreibt das vRNA-ähnliche Konstrukt in mRNA um, was zur Expression der Luziferase durch die Wirtszelle führt. Diese setzt im Lysat dann in einer enzymatischen Reaktion das Substrat Luziferin um. Die dabei auftretende Lumineszenz ist ein Maß für die Expression des Minigenoms. Für ein Minigenomasay wurden  $5 \times 10^5$  293T Zellen transfiziert, nach 24 h mit PBS gewaschen und mit 100 µl des passiven Lysis-Puffers (Kit) lysiert.

Das Dual Luciferase™ Reporter Assay System beruht auf der Verwendung von zwei Luziferase-Enzymen, mit deren Hilfe der Aktivierungszustand von zwei Promotoren in der gleichen Zellpopulation gemessen (in Raw Light Units, RLU) werden kann. Dazu werden am Luminometer (EG & G Berthold, Microplate Luminometer LB 96 V) nacheinander je 100 µl Substrat für die Aktivierung der Luciferasen aus *Photinus pyralis* bzw. *Renilla reniformis* zugegeben und die Signale nacheinander gemessen. Mit der ersten Luciferase-Messung weist man die Aktivität des Reporterplasmides mit Luciferase-Gen aus *Photinus pyralis* nach. Die Reaktion wird durch Zugabe des 2. Substrates gestoppt (Stop and Glow) und die Reaktion für die *Renilla*-Luciferase (kotransfiziertes Konstrukt pTK-Luc) wird gestartet. Der Promotor dieses Konstrukts steht unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors und wird zur Standardisierung verwendet. Die Messwerte des ersten Signals werden anschließend über die Messwerte des konstitutiven Promotors normalisiert und über den Quotienten aus Werten der „Schein“-Infektion und Werten für infizierte bzw. anderweitig stimulierte Zellen die x-fache Aktivierung des Promotors bestimmt. Die verwendeten Substrate sind im Kit der Firma Promega enthalten und wurden ebenso wie der Lysis-Puffer entsprechend den Herstellerangaben verdünnt bzw. gemischt.

### 2.2.3 Arbeiten mit Influenza A-Viren

#### 2.2.3.1 Herstellung rekombinanter „wildtyp“ Viren und Reassortanten

Influenza A Viren lassen sich durch Transfektion von Expressionskonstrukten in geeigneten Systemen (Zellkultur) herstellen und vermehren (Zellkultur z.B. MDCK-Zellen oder embryonierte Hühnereier). Die Herstellung von rekombinanten Influenzaviren erfordert ein gut transfizierbares Zellgewebe zur initialen Herstellung der Viren. Zur Transfektion wurden (humane) 293T-

Zellen verwendet. Im Anschluß daran wurden die neu gewonnenen Viren auf einem zweiten geeigneten System, in dieser Arbeit MDCK II-Zellen, vermehrt. Die Zellen wurden gewählt, da sie aufgrund ihrer Oberflächenglykoproteine für die Herstellung humaner Influenza A-Viren geeigneter waren als ein aviäres System.

Um Influenza A-Viren herzustellen wurden jeweils alle acht Segmente als pHW2000-Plasmidkonstrukte in 293T-Zellen eingebracht. Die Transfektion erfolgte wie unter Punkt 2.2.1.1 beschrieben. Je 500 ng eines Segmentkonstruktes (insgesamt 4 µg) wurden in einem Gesamtvolumen von 25 µl Opti-MEM aufgenommen und mit einem Lipofectamine 2000™ (6µl)-Opti-MEM-Gemisch (119 µl) zusammen für 15 Minuten bei RT inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde zusammen mit  $1 \times 10^6$  293T-Zellen, aufgenommen in Transfektionsmedium in einem 35 mm-Kulturgefäß (Gesamtvolumen von ca. 2 ml Medium) für 4-5 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Diese Zeit ist ausreichend um den Zellen ein Anhaften am Boden des Zellkulturgefäßes zu ermöglichen. Nach dieser Zeit wurden die Zellen 1 x mit PBS gewaschen und das Transfektionsmedium (D-MEM) durch 2 ml TPCK-Trypsin-haltiges (1 µg/ml) Infektionsmedium (D-MEM) ersetzt. Die Zellen wurden anschließend für 48 h bei 33°C im Brutschrank (5 % CO<sub>2</sub>) gehalten. Nach dieser Zeit wurde der Zellüberstand abgenommen und für fünf Minuten bei 3000 x g zentrifugiert um Zellreste und Viren zu trennen. Am Tag zuvor wurden  $1 \times 10^6$  MDCK II-Zellen in 60 mm Zellkulturgefäße ausgesät um innerhalb von ca. 20 h eine zu 80 % konfluente Zellschicht zu erhalten. Diese Zellen wurden dann für 45 min bei RT mit 1 ml des 293T-Zellüberstandes infiziert. Nach einmaligem waschen der Zellen mit PBS wurden sie für weitere 72 h mit TPCK-Trypsin (1 mg/ml)-haltigem Infektionsmedium (MEM) in einem Volumen von 4 ml inkubiert. Während dieser Zeit wurde ab einem Zeitpunkt von 12 h mikroskopisch kontrolliert, ob ein zytopathischer Effekt (CPE), d.h. die sichtbare Zerstörung der Epithelschicht durch austretende Viren sichtbar wird. War der Zellrasen vollständig zerstört, wurde der Zellüberstand abgenommen, wiederum für fünf Minuten bei 3000 x g zentrifugiert und zunächst im Hämagglutinationstest analysiert. Für den Fall, dass nach 72 h ein noch weitgehend intakter Zellrasen vorhanden war, wurde 1 ml des zentrifugierten Zellüberstandes zur weiteren Infektion von frisch ausgesäten 80 %-konfluenten MDCK II-Zellen (im 60 mm-Kulturgefäß) verwendet. Da die Virus-Nachweisgrenze beim Hämagglutinationstest bei ca.  $1 \times 10^6$ —Viruspartikeln pro 100 ml liegt, wurde weiterhin versucht, virales Antigen (Nukleoprotein) per indirekter Immunfluoreszenz nachzuweisen, sofern nach der zweiten Passage des Zellüberstandes auf MDCK II-Zellen kein zytopathischer Effekt sichtbar war. Diese Prozedur wurde für die Gewinnung von Viren bis zu einer maximal fünffachen Passage der Viren auf MDCK II-Zellen wieder-

holt. War dann durch Hämagglutinationstest oder Antigennachweis kein Virus nachweisbar, wurde der Versuch abgebrochen und der Virusansatz neu transfiziert.

Im Falle eines positiven Virusnachweises wurde der zentrifugierte Zellüberstand aliquotiert (250-500 µl je Cryogefäß) bei -80°C aufbewahrt und der Titer der Proben nach einmaligem Auftauen durch Antigennachweis per indirekter Immunfluoreszenz bestimmt.

### 2.2.3.2 Hämagglutinationstest (HA-Test)

Der einfache und schnell durchführbare Hämagglutinationstest erlaubt eine Abschätzung der Konzentration von Influenzaviren in Flüssigkeiten. Das Oberflächenglykoprotein Hämagglutinin bewirkt dabei durch Bindung an deren endständige Sialinsäuren (Neuraminsäuren) die Quervernetzung von Hühnererythrozyten (Hirst 1941). Die genauere Bestimmung des Virustiters bleibt anderen Methoden vorbehalten, da auch Hämagglutinin-haltige Membrantrümmer und sogenannte *DIs* (*Defective interfering particles*), nicht replikationskompetente Viren, deren Segmenten Teile der kodierenden Sequenzen fehlen, eine Hämagglutination bewirken können.

Für den Test wurde eine 96-Loch Mikrotiterplatte (Greiner) mit V-förmigen Vertiefungen verwendet. Ausgehend von einer unverdünnten Lösung werden serielle Zwei-schrittverdünnungen angefertigt. Dazu pipettiert man 100 µl der zu testenden Flüssigkeit (z.B. Zellüberstand) in die 1. Vertiefung der Platte. Ab der zweiten Vertiefung legt man 50 µl PBS vor. Dann pipettiert man aus der ersten Vertiefung 50 µl der unverdünnten Lösung in die folgende, mischt mit dem vorgelegten PBS und überführt 50 µl der Verdünnung in die folgende Vertiefung. Aus der letzten Vertiefung werden 50 µl verworfen. Anschließend gibt man 50 µl einer 1 % Hühnererythrozytenlösung in PBS in jede Vertiefung der Verdünnungsreihe und mischt die Komponenten durch kurzes Schwenken. Die Platte wird möglichst abgedeckt für 30 min auf Eis inkubiert. Die niedrige Temperatur verhindert die Aktivität der Neuraminidase. Bis zu einer bestimmten Verdünnung sind in der virushaltigen Lösung genug Partikel vorhanden, um die Erythrozyten zu vernetzen. Die nicht vernetzten Erythrozyten sinken zu Boden und sind nach der Inkubationszeit als Knöpfchen in der Spitze der Vertiefung erkennbar. Als Hämagglutinationstiter (HA-Titer) wird der reziproke Wert der Verdünnungsstufe angegeben, bei der gerade noch eine Hämagglutination erkennbar ist.

### 2.2.3.3 Titerbestimmung durch indirekte Immunfluoreszenzanalyse

Die indirekte Immunfluoreszenzanalyse (2.2.2.1) infizierter MDCK II-Zellen erlaubt die genauere Bestimmung infektiöser Influenzaviren. Für den reinen Antigennachweis wurde die Viruslösung unverdünnt verwendet. Für die Bestimmung des Virustiters dagegen, wurden Verdünnungen in PBS/ BA/ Mg<sup>2+</sup>/ Ca<sup>2+</sup> 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10.000 und 1:100.000 hergestellt. Die auf

Deckgläschen im 12-Kalotten-Format ausgesäten MDCK II-Zellen wurden dann mit 20 µl dieser Verdünnung plus 130 µl PBS/ BA/ Mg<sup>2+</sup>/ Ca<sup>2+</sup> für 45 min bei RT infiziert. Anschließend wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen und für 8 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Im Anschluß an die Infektionszeit wurden die Zellen laut Protokoll fixiert und permeabilisiert. Durch den primären Antikörper wurde das virale Nukleoprotein markiert. Mittels Fluoreszenz-gekoppelter Sekundärantikörper wurden alle positiv-markierten Zellen eines Deckgläschens in geeigneter Verdünnung unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Der Virustiter (ffu/ml) errechnet sich aus der Zahl der NP-positiven Zellen x Verdünnungsfaktor x 83. Der Faktor 83 ergibt sich folgendermaßen: Die Fläche des Deckgläschens entspricht nur 60 % der Gesamtfläche des 12-Kalotten-Formats. Die Zellen auf dem Deckgläschen werden also nur von 60 % der 20 µl Virusverdünnung, sprich 12 µl infiziert. 83 ist der Umrechnungsfaktor von 12 µl auf 1ml.

Ein Beispiel für 95 NP-positve Zellen bei einer Verdünnung von 1:1000:

$$95 \times 1000 \times 83 = 7,89 \times 10^6 \text{ ffu/ml}$$

### *2.2.3.4 Isolation viraler RNA*

Zur Isolation von vRNA aus Zellüberständen von Influenza A-Viren wurde das RNeasy<sup>®</sup> RNA Isolation Kit von QIAGEN verwendet. Nach dem Aufschluß der Viren wird die RNA in Anwesenheit chaotroper Salze an die Glasfasermembran der Säule gebunden und anschließend mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O oder dem mitgelieferten Puffer eluiert. Zunächst wurde für die Anwendung des Kits 1 ml des Zellüberstandes für 1,5 h bei 30.000 rpm im Rotor TLA-45 ultrazentrifugiert. Das Viruspellet wurde dann in 600 µl RLT-Puffer, versetzt mit β-Mercaptoethanol aufgenommen und nach den Angaben des Herstellers weiter verarbeitet. Die virale RNA wurde in 50 µl des Elutionspuffers aufgenommen.

### *2.2.3.5 Nachweis des rekombinanten Virus*

Das Genom hergestellter Viren wurde hinsichtlich der Zusammensetzung aus verschiedenen Influenza A-Stämmen und zur Überprüfung möglicher Mutationen, v.a. innerhalb der Oberflächenglykoproteine durch die Passage auf Zellen teilweise sequenziert. Dazu wurde genomische RNA aus den Virusstocks isoliert (2.2.3.4), in cDNA umgeschrieben (2.2.4.1) und Teile einzelner Segmente nach Sanger sequenziert (2.2.4.10). Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit der Software Lasergene oder MacVector.

### *2.2.3.6 Herstellung von Glycerolstocks für Influenza A-Viren*

Für die Hämagglutinin-Rezeptorbindung, Neuraminidase-Substratspezifität und die Bindung der Oberflächenglykoproteine an NK-Rezeptoren wurden Glycerolstocks der verwendeten Viren

eingesetzt. Dazu wurden zunächst  $6 \times 1 \times 10^6$  MDCK II-Zellen (auf einer 6-Kalottenplatte mit je 2 ml Infektions-MEM) mit einer  $MOI=0,01$  des entsprechenden Virusstocks infiziert und das Virus so vermehrt. Ca. 48 h p.i. (*post infection*) wurde der Zellüberstand geerntet, bei 3500 rpm für 5 min zentrifugiert und die Virussuspension per Hämagglutinationstest (2.2.3.2) kontrolliert. Der virushaltige Zellüberstand wurde ohne weiteres Einfrieren frisch weiterverwendet. Dazu wurde ein Sucrosekissen (30 % Sucrose in TN-Puffer) mit der gesamten Virusmenge (ca. 12 ml) und zum Auffüllen des Zentrifugationsröhrchens PBS langsam schräg überschichtet und für 1,5 h bei  $30.000 \times g$  ultrazentrifugiert (Ultrazentrifuge L8-70M, Rotor SW 28, Beckmann®). Anschließend wurde der gesamte Überstand vorsichtig abgenommen und das nur wenig sichtbare Viruspellet in 250  $\mu$ l TN-Puffer ausgenommen und mit 250  $\mu$ l sterilem Glycerol versetzt (50 %). Die Glycerolstocks wurden bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Die Virustiter bleiben durch dieses Verfahren auch nach mehrmaligem Auftauen weitgehend stabil. Vor jedem Experiment wurden jedoch alle Titer für die Einstellung der zu verwendenden Viruslösung mit definierten HA-Einheiten (HA-Units, HAU) überprüft und Verdünnungen in TN-Puffer frisch hergestellt.

### 2.2.4 Molekularbiologische Methoden für die Konstruktion von Plasmiden

#### 2.2.4.1 Reverse Transkriptions (RT)-PCR

Die RT-PCR kombiniert zwei Methoden miteinander: die der reversen Transkription, bei der ein Oligonukleotid (Primer) an das 3'-Ende der RNA bindet. Das Enzym Reverse Transkriptase fügt dann Desoxyribonukleotide komplementär zur RNA an den Primer und schreibt so die Ribonukleinsäure in Einzelstrang-(ss)-DNA um. Diese ss-DNA wird anschließend per PCR durch einen Rückprimer am 3'-Ende des DNA-Einzelstranges und eine hitzestabile DNA-Polymerase zu einem definierten Stück doppelsträngiger cDNA komplementiert. Durch die PCR (*Polymerase chain reaction*) wird die cDNA durch die definierten Schritte der Denaturierung, Anlagerung von Hin- und Rückprimern und Kettenverlängerung exponentiell vermehrt. Reverse Transkription und PCR können dabei in einem Schritt (Einstufige RT-PCR) oder in zwei getrennten Reaktionen (Zweistufige RT-PCR) durchgeführt werden. Für die Klonierung von cDNA-Segmenten in den Vektor pHW2000™ wurde im Allgemeinen die Zweistufige RT-PCR verwendet. Für die Amplifizierung einzelner Segmentstücke zur Kontrolle der rekombinanten Viren und anschließender Sequenzierung wurde meist die Einstufige Methode verwendet. Beide Methoden sind gegeneinander austauschbar und unterscheiden sich durch den höheren Bedarf an viraler RNA durch die Einstufige-Methode und darin, dass vor allem lange cDNA-Segmente mit spezifischen PCR-Bedingungen und einer *High Fidelity*-Polymerase besser amplifiziert werden können.

Zweistufige RT-PCR

Lt Herstellerprotokoll Fermentas

4 µl RNA + 1,35 µl uni 12 a+g Mix (0,5 µg/µl) + 5,65 µl RNase-freies ddH<sub>2</sub>O

- 5 min bei 70°C (entfernt Sekundärstrukturen der RNA), anschließend 5 min auf Eis
- + 2 µl RNase-freies ddH<sub>2</sub>O + 4 µl 5 x M-MLV-Puffer + 1,5 µl dNTP (je 10 mM) + 0,5 µl RNasin (40 U/µl)
- 37°C für 5 min
- + 0,2 µl Revert Aid™ M-MuLV-Reverse Transkriptase

Cycler-Programm

Reverse Transkription	42°C	60 min
Hitzeinaktivierung	70°C	10 min
Kühlen	4°C	∞

In der anschließenden PCR wurde die *Pfu* Turbo Polymerase (aus *Pyrococcus furiosus*, Roche) eingesetzt. Sie besitzt durch die 3' → 5' Exonukleaseaktivität eine sehr hohe Fehlerkorrektur.

Zweistufiger PCR-Ansatz (100 µl)

70 µl dH<sub>2</sub>O + 20 µl 5 x Puffer + 2 µl dNTPs (je 10 mM) + 2 µl *Pfu* Turbo Polymerase (2,5 U/µl) + 2 µl Primer #1 + 2 µl Primer #2 + 2 µl RT-Ansatz

Cycler-Programm für die Segmente NP, NA, M, NS

<u>Denaturierung</u>	94°C	5 min	35 Zyklen
Denaturierung	94°C	1 min	
Primeranlagerung	52°C	30 sec	
<u>Kettenverlängerung</u>	72°C	3 min	
Kettenverlängerung	72°C	5 min	
Kühlen	4°C	∞	

Cycler-Programm für die Segmente PB1, PB2, PA, HA

<u>Denaturierung</u>	94°C	5 min	35 Zyklen
Denaturierung	94°C	1 min	
Primeranlagerung	52°C	30 sec	
<u>Kettenverlängerung</u>	72°C	7 min	
Kettenverlängerung	72°C	10 min	
Kühlen	4°C	∞	

Abweichungen ergeben sich für die Segmente in der Zugabe der Salzkonzentration (Standardpuffer mit MgCl<sub>2</sub> 1,25 mM Endkonzentration in 100 µl) durch

- 20 µl Puffer ohne MgCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub>-Stock (Kit, 25 mM): 8 µl (2 mM in 100 µl PCR-Ansatz) oder 10 µl (2,5 mM in 100 µl PCR-Ansatz)

für die Segmente:

a) der Stämme A/Moscow/10/99 (H3N2) und A/Panama/2007/99 (H3N2):

- 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>: PB1, PB2, PA, NA, NS
- 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>: NP, HA

b) des Stammes A/Newcaledonia/20/99:

- 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>: PB2, PA, NA, NS
- 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>: NP, HA

### Einstufige RT-PCR

Lt. Hertsellerprotokoll Qiagen

Durch die Anwendung dieses Protokolls konnten durch nur einen Reaktionsansatz cDNA-Segmente aus RNA gewonnen werden. Das Verfahren wird durch einen speziellen Enzymmix ermöglicht. Dieser enthält die Reversen Transkriptasen Omniscript™, Sensiscript™ und die DNA Polymerase HotStarTaq™.

### Ansatz

10 µl 5 x Puffer + 2 µl dNTP-Mix (je 10 mM) + 1,5 µl Primer #1 + 1,5 µl Primer #2 (je 20 µM) + 2 µl Enzym-Mix + 0,25 µl RNasin + 1 µg RNA, ad 50 µl RNase-freies ddH<sub>2</sub>O

### Cycler-Programm

Reverse Transkription	50°C	30 min	
<u>Hitzeinaktivierung der RT</u>	<u>95°C</u>	<u>15 min</u>	
Denaturierung	95°C	30 sec	29 Zyklen
Primeranlagerung	52°C	30 sec	
<u>Kettenverlängerung</u>	<u>72°C</u>	<u>4 min</u>	
Kettenverlängerung	72°C	10 min	
Kühlen	4°C	∞	

#### *2.2.4.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel*

Um DNA-Fragmente von 0,5 bis 10 kb Länge voneinander zu trennen und zu identifizieren wurde die Agarosegel-Elektrophorese verwendet. Die DNA-Fragmente wurden in 0,8-2 %-igen Gelen in 1 x TBE-Laufpuffer getrennt. Dazu wurden die Proben vorher mit 6 x Ladepuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte entsprechend der Gelgröße bei 60-80 Volt. Durch Zugabe von Ethidiumbromid ( $4 \times 10^{-5}$  mg/ml) wurde die DNA während der Elektrophorese angefärbt und konnte anschließend durch UV-Licht sichtbar gemacht werden

#### 2.2.4.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel

Auf dem UV-Durchlichtschirm wurden die DNA-Moleküle von Interesse mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Unter Anwendung des QIAEX II Kits wurde die DNA anschließend entsprechend des Herstellerprotokolls extrahiert.

#### 2.2.4.4 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Um DNA-Moleküle an definierten Nukleotidsequenzen durch Enzyme zu spalten wurde folgendes Protokoll angewendet:

DNA	1 µg – 10 µg
10 x Puffer	2 µl (1 Enzym)
Enzym 1 (10 U/µl)	0,5-1 µl
ggf. Enzym 2 (10 U/µl)	0,5-1 µl
ad H <sub>2</sub> O	20 µl

Die Restriktion erfolgte in den entsprechenden Inkubationspuffern bei 37°C.

#### 2.2.4.5 Ligation / Rekombination von DNA-Fragment und Vektor

Die T4 DNA-Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem 5`-Phosphat und einem 3`-Hydroxylende von Polynukleotiden. Standardmäßig wurden verwendet: geschnittener Vektor und cDNA in einem molaren Verhältnis von 1:5 bzw. für die Ligation von Influenza A-cDNA-Segmenten mit dem Vektor pHW2000™ nach der Formel:

$$\text{Masse}_{\text{Fragment}} [\text{ng}] = 5 \times \text{Masse}_{\text{Vektor}} [\text{ng}] \times \text{Länge}_{\text{Fragment}} [\text{bp}] / \text{Länge}_{\text{Vektor}} [\text{bp}]$$

T4-DNA-Ligase Puffer (10 x)	1 µl
T4-DNA-Ligase (1 U/ µl)	1 µl
Vektor pHW2000/ <i>BsmBI</i>	50 ng
dH <sub>2</sub> O ad	10 µl

Der Ansatz wurde über Nacht bei 16°C oder 1-2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Rekombination von Vektor pHW2000/*BsmBI* mit einem cDNA-Segment des Influnza A-Virus erfolgte nach den Angaben des Kits der Firma Clontech-Takara Bio Europe.

#### 2.2.4.6 Herstellung Transformations-kompetenter *E. coli XL blue* Bakterien

Bei dem Verfahren nach Hanahan (1983), werden Bakterien so modifiziert, dass sie durch Transformation Plasmid-DNA aufnehmen können. Zunächst wurden 200 ml Bakterienkultur in 2 x YT-Medium angeimpft und bei 37°C auf einem Schüttler mit 200 rpm bis zu einer OD<sub>540</sub>=0,4-0,6 kultiviert. Dann wurde die Zellsuspension für 20 min auf Eis gekühlt und bei

4°C bei 6200 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml eiskaltem FSB-Puffer (10 mM KMes, pH 7,0; 50 mM CaCl<sub>2</sub>; 45 mM MnCl<sub>2</sub>; 100 mM RbCl und 10 % Glycerol in Aqua bidest.) resuspendiert und weitere 20 min auf Eis aufbewahrt. Die Suspension wurde mit gleichen Parametern zentrifugiert und die Zellen in 3 ml eiskaltem FSB-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 105 µl DMSO (leicht mischen) wurden die Zellen weitere 15 min auf Eis inkubiert und anschließend nochmals 105 µl DMSO zugegeben und vorsichtig gemischt. Die Suspension wurde in Aliquots von je 100 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert, bis die Zellen für die Transformation verwendet wurden.

### *2.2.4.7 Transformation chemisch kompetenter E.coli*

Das Einbringen von Plasmid-DNA durch die Zellwand kompetenter Bakterien, die dadurch einen neuen Phänotyp ausprägen können, wird als Transformation bezeichnet. Durch das Ausplattieren dieser transformierten Bakterien auf Antibiotika-haltigen Agarplatten erfolgt eine Selektion der Bakterien, die durch das aufgenommene Plasmid eine Antibiotika-Resistenz besitzen.

Die kompetenten *E.coli*-Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 50 µl der Bakteriensuspension mit 5 µl eines Ligationsansatzes (Volumen 20 µl) oder 0,1 ng Plasmid-DNA in einem Polypropylen Reaktionsgefäß für 30 min inkubiert. Die Bakterien wurden nach dem Hitzeschock im Wasserbad (45 sec bei 42°C bei XL-1 Blue) 1-2 min auf Eis gekühlt und anschließend mit 450 µl vorgewärmten SOC-Medium versetzt. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37°C und 225 rpm zur Expression des Antibiotika-Resistenzgens inkubiert. Die Bakterien wurden dann vor dem Ausplattieren entweder kurz zentrifugiert und in 50-100 µl Medium resuspendiert oder es wurde ohne weitere Zentrifugation ein definiertes Volumen direkt ausplattiert. Die Agarplatten enthielten ein geeignetes Antibiotikum und die Prozedur erfolgte unter möglichst sterilen Bedingungen. Die Platten wurden im Brutschrank über Nacht bei 37°C inkubiert. Einzelne Bakterienkolonien wurden dann entweder per Kolonie-PCR mit geeigneten Primern getestet oder in Flüssigkultur weitervermehrt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA dieser Bakterienklone isoliert und mittels Restriktionsspaltung und Sequenzierung überprüft.

### *2.2.4.8 Plasmidpräparation von DNA im kleinen und großen Maßstab*

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurden Kits der Firma QIAGEN und Invitex mit den entsprechenden Protokollen des Herstellers verwendet. Die Präparation im kleinen Maßstab erfolgte mit Hilfe des QIAprep® Spin Miniprep Kits. Für die Gewinnung grösserer Mengen Plasmid-DNA (> 500 µg aus 200-250 ml Bakterienkultur) wurden QIAGEN Plasmid Maxi Kits verwendet. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in Übernacht-Kulturen (bei 37°C,

## Methoden

---

200 rpm) in einem Maßstab von 5 ml (Minipräparation) bzw. 200-250 ml (Maxipräparation). Für Ampicillin-resistente Bedingungen wurde im Medium eine Endkonzentration von 100 ng/ml verwendet.

### 2.2.4.9 Spektralphotometrische Analyse von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren erfolgte über die Messung der optischen Dichte mittels Absorptionsspektrometrie. DNA absorbiert ultraviolettes Licht und man führt zunächst die Messung der Extinktion (E) bei einer Wellenlänge von 260 nm durch. Dazu wurde DNA 1: 200 bzw. RNA 1:250 jeweils mit dH<sub>2</sub>O verdünnt. Zusammen mit einem spezifischen Multiplikationsfaktor wurde dann die Konzentration der Probe bestimmt.

Konzentration (ds DNA) =  $50 \times E_{260 \text{ nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor der Messlösung}$

Konzentration (ss DNA) =  $30 \times E_{260 \text{ nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor der Messlösung}$

Konzentration (RNA) =  $40 \times E_{260 \text{ nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor der Messlösung}$

Da auch Proteine Licht der Wellenlänge 260 nm absorbieren, ihr Absorptionsmaximum jedoch bei 280 nm liegt, erhält man aus dem Quotient  $E_{260 \text{ nm}} / E_{280 \text{ nm}}$  eine Aussage über eine mögliche Proteinkontaminationen in der Lösung. In einer proteinfreien Nukleinsäurelösung liegt der Quotient bei 1,8-2,0.

### 2.2.4.10 DNA-Sequenzierung

Angewandt wurde das Kettenabbruchverfahren (Sanger et al., 1977) im Thermocycler. Um Sequenzinformationen über einen DNA-Abschnitt zu erhalten wurde für diesen eine PCR mit nur einem Oligonukleotid nach folgendem Protokoll durchgeführt:

DNA	1-4 µl
Oligonukleotid (10 pmol/µl)	0,5 µl
ABI BigDye 3.1	1 µl
Puffer (5 x)	1,5 µl
dH <sub>2</sub> O ad	10 µl

Die eingesetzte DNA-Menge war dabei den folgenden Angaben angepasst :

PCR-Produkte (100-200 bp)	1-3 ng
PCR-Produkte (200-500 bp)	3-10 ng
PCR-Produkte (500-1000 bp)	10-20 ng
Plasmide	150-300 ng
Plasmide aus Mini-Preparation	200ng (entspricht etwa 1 µl)

## Methoden

Die Sequenzierungs-PCR hatte folgende Parameter:

<u>Initiale Denaturierung</u>	96°C	1-2 min	25 Zyklen
Denaturierung bei	96°C	10 sec	
Hybridisierung bei	45-60 °C	5 sec	
<u>Elongation</u>	60°C	4 min	
Kühlen	4°C	∞	

Die PCR-Produkte wurden vor dem Auftrag auf das Sequenzierungsgel über Gelfiltration gereinigt. Während der PCR werden in die DNA mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte 2',3'-Didesoxynukleotide (ddNTPs) eingebaut. Damit entstehen durch Kettenabbrüche Fragmente mit definierten terminalen Basen. Die mit den Fluoreszenzfarbstoffen konjugierte DNA wird vom Gerät während der Elektrophorese mittels Laser angeregt und gemessen. Die Auswertung der Sequenz erfolgte automatisch mit der Software „Sequencing Analysis 3.0“ (ABI PRISM/ Perkin Elmer).

### 2.2.4.11 Klonierung viraler Gensegmente in den Vektor pHW2000™

cDNA-Segmente wurden entweder durch die Protokollgenaue Anwendung des Kits der Firma Clontech, ehemals vertrieben von BD-Biosciences (daher die Primerbezeichnung BD) mit dem Vektor pHW2000/*BsmBI* rekombiniert oder per Ligation über *BsmBI* oder *BfuAI* in den Vektor eingefügt.

cDNA-Fragmente, die nicht per Clontech-Kit (amplifiziert mit BD-gekennzeichneten Primern) rekombiniert wurden, sondern über die Schnittstellen von Typ I-Restriktionsenzymen mit dem Vektor pHW2000/*BsmBI* ligiert werden sollten, wurden nach dem Restriktionsverdau per Phenol-Chloroform-Fällung gereinigt. Bei Typ I-Enzymen (Auslegerenzymen) liegen die Erkennungs- und Schnittsequenzen nicht als Palindrom vor. Die Schnittsequenz liegt stattdessen neben einer nicht-palindromischen Erkennungssequenz (z.B. *BsmBI*, *BfuAI*). Segmente die mit Primern einer Typ I-Erkennungssequenz amplifiziert wurden, wurden nach Ihrer Isolation aus dem Agarosegel (2.2.4.5) über Nacht bei entsprechender Temperatur (z.B. 33°C) im PCR-Cycler verdaut.

Für die Phenol-Chloroform-Fällung wurde der Restriktionsansatz mit dH<sub>2</sub>O auf 200 µl aufgefüllt und 1:1 mit 200 µl Phenol-Chloroform versetzt. Die Probe wurde gut gemischt (Vortex) und für 3 min bei 13.000 x g zentrifugiert, was eine Phasentrennung zur Folge hat. Die Nukleinsäuren verbleiben dabei in der wässrigen Phase. Diese wird abgenommen, in ein neues Gefäß überführt und 1/10 Vol NaAcetat (3 M) und 2 Vol eiskalter Ethanol zugegeben. Um später die gereinigte DNA besser sichtbar zu machen, gibt man weiterhin 1 µl (20 µg/µl) Glykogen dazu. Die

## Methoden

---

Probe wird für mindestens 30 min bei -20°C gelagert und anschließen bei 4°C für 15 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Das anschließend sichtbare DNA-Pellet wird vom Überstand befreit und einmal mit kaltem 70 %-Ethanol gewaschen, d.h. bei 13.000 x g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde dann um Ethanolrückstände zu entfernen (in der Vakuumzentrifuge) getrocknet und in 10 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen. Nach der Konzentrationsbestimmung auf dem Agarosegel wurde das cDNA-Fragment mit dem Vektor pHW2000/*BsmBI* ligiert.

### 2.2.5 Proteinanalytische Arbeiten

#### 2.2.5.1 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

In der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden die Proteine nach Denaturierung und Ladungsausgleich (durch β-Mercaptoethanol und SDS) ihrer Molmasse nach voneinander getrennt. Entwickelt wurde das diskontinuierliche System 1964 durch Ornstein und Davis, weiterentwickelt als denaturierendes Verfahren durch Laemmli (Laemmli 1970). Die Elektrophorese erfolgt dabei in einem Acrylamid und Bisacrylamid (37,5:1) enthaltenden Gel, das aus zwei Teilen, dem Sammelgel und dem Trenngel besteht. Das kürzere Sammelgel enthält dabei weniger Acrylamid. Es dient der Konzentration der Proben und führt dadurch zur Ausbildung schärferer Banden im Trenngel.

In einer Mini-Protean 3-Gießvorrichtung (Bio-Rad, München) wurde zwischen zwei vorher mit Isopropanol entfetteten Glasplatten mit einem Abstand von 0,75 mm (oder 1,5 mm) zuerst das Trenngel und nach dessen Polymerisierung das Sammelgel gegossen. Durch einen Kamm im Sammelgel wurden die Taschen zur Proteinbeladung freigehalten.

Die Proteinproben wurden dann zunächst im Verhältnis 1:1 (v/v) mit SDS-Probenpuffer versetzt, 3 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf ein 12,5 %-iges Trenngel mit 5 %-igem Sammelgel aufgetragen. Nach dem Beladen der Taschen erfolgte die Elektrophorese mit 25 mA pro Gel in vertikalen Laufapparaturen (Bio-Rad, München) mit 1 x SDS-Gellaufpuffer.

Rezept für SDS-Polyacrylamidgele:

	<b>12,5 % Trenngel</b>	<b>5 % Sammelgel</b>
30 % Acrylamid mit	4,125 ml	0,83 ml
0,8 % Bis-Acrylamid		
1,5 M Tris-HCl, pH 8,9	2,5 ml	
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8		1,25 ml

## Methoden

---

10 % APS (frisch)	100 µl	50 µl
10 % SDS	100 µl	50 µl
TEMED	6 µl	6 µl
dH <sub>2</sub> O	3,2 ml	2,8 ml

### 2.2.5.2 Immunoblot

Beschrieben wurde dieses Verfahren durch H. Towbin (Towbin, Staehelin et al. 1979).

Mit dem Western Blot lassen sich Proteine mittels spezifischen Antikörpern nach einer Größenaufreinigung im SDS-Gel nachweisen. Dazu werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine zunächst in einem elektrischen Feld aus der Gelmatrix auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dies geschah im Semi-Dry-Blot-Verfahren mittels einer Semi-Dry-Blot-Kammer (Bio-Rad, München) gemäß den Herstellerangaben. Der Erfolg des Blottens lässt sich durch eine reversible Ponceau S-Färbung überprüfen. Dazu wurde die Membran für 2-5 min mit 0,1 % Ponceau S (in 7 % Trichloressigsäure) inkubiert und mit destilliertem Wasser entfärbt.

Für den Immunnachweis wurde die Membran zunächst 1 h mit Magermilchlösung (3 % Magermilchlösung in 1 x TBST) behandelt, um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu verhindern. Der zu verwendende primäre Antikörper wurde in 0,5 % Magermilchpulver in 1 x TBST verdünnt. Die geeignete Konzentration muss für jeden Antikörper empirisch ermittelt werden. Die Membran wurde für 1 h bei Raumtemperatur mit 170 µl Antikörperlösung/cm<sup>2</sup> inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran für je 10 min in 1 x TBST wurde der Sekundärantikörper, ebenfalls verdünnt in 0,5 % Magermilchpulver in 1 x TBST zugegeben. Dieser erkennt die konstante Region des primären Antikörpers und ist somit Spezies-spezifisch. Die hier verwendeten Sekundärantikörper sind mit dem Enzym Peroxidase (aus Meerrettich) gekoppelt, welches im anschließenden Detektionsverfahren eine Chemolumineszenz-Reaktion katalysiert. Deren Lichtentwicklung schwärzt photochemisch einen Röntgenfilm (Kodak, USA) an den Positionen des immunreaktiven Proteins auf der Membran. Nach gründlichem Entfernen von überschüssigem Sekundärantikörper durch Waschen (6 x für je 5 min) mit 1 x TBST wurde die Membran mit der frisch angesetzten Detektionslösung (Super Signal® Dura Extended Substrate, Pierce, Bonn) für 5 min behandelt. Die Membran wurde anschließend in Folie eingeschlagen und für verschiedene Zeiten gegen Röntgenfilme exponiert. Die Expositionszeit ist dabei sehr variabel und muss für jeden Blot bzw. jedes Protein empirisch ermittelt werden. Nach der Detektion kann die Membran bei 4°C gelagert werden. Dadurch kann die

Membran gegebenenfalls zu einem späteren Zeitpunkt neu exponiert oder nach entsprechender Vorbehandlung neu mit Antikörpern inkubiert werden.

### 2.2.5.3 Herstellung und Analyse von Zelllysaten

Für die vergleichende virale Proteinexpression von vier Wildtyp- und zwei rekombinanten Influenza A-Viren der Subtypen H1N1, H1N2 und H3N2 wurden MDCK II-Zellen im 35 mm-Format mit einer MOI (*Multiplicity of infection*)=1 (entspricht  $1 \times 10^6$  ffu) in insgesamt 300  $\mu$ l PBS/ BA/  $Mg^{2+}$ /  $Ca^{2+}$  infiziert. Die Zellen wurden dann für definierte Zeitpunkte von 2/4/6/8 h in Infektionsmedium bei 37°C, 5 %  $CO_2$  inkubiert. Nach ihrer Infektionszeit wurden sie 1 x mit kaltem PBS gewaschen und mit 100  $\mu$ l ebenfalls kaltem RIPA-Puffer für 10 min auf Eis lysiert. Die Zellen wurden per Zellschaber mit dem Überstand in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und weitere 15 min auf Eis inkubiert. Nach der daran anschließenden Zentrifugation (13.000 x g, 4°C) wurden die Proben 1:1 mit 2 x SDS-Probenpuffer (5 %  $\beta$ -Mercaptoethanol frisch zugegeben) versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lysate konnten so bei -20°C gelagert werden. Vor dem Auftragen auf ein 12,5 %-SDS-Acrylamidgel wurden die Proben für 5 min bei 95°C erhitzt. Je 50  $\mu$ l einer Probe wurden bei 25 mA pro Gel aufgetrennt. Nach dem Immunoblot (2.2.5.2) wurde die Membran in 3 %-Magermilchpulver (MMP) in 1 x TBST blockiert und entsprechend den Antikörperbindungsstellen geschnitten. Die Antikörper wurden in 0,5 %-MMP in 1 x TBST verdünnt und für jeweils 1 h bei RT inkubiert. Im Anschluß an die Antikörperbindung wurde die Membran 3 x für 10 min (nach 1. AK) bzw. 6 x für 5 min (nach 2. AK) mit 1 x TBST gewaschen. Nachgewiesen wurden die viralen Proteine PB1 (bei ca. 90 kDa), NP (bei ca. 55 kDa), M1 (bei ca. 28 kDa), NS1 (bei ca. 26 kDa) und das zelluläre Protein Tubulin (ebenfalls bei 55 kDa). Der Nachweis der Antikörperbindung erfolgte über Chemolumineszenz (SuperSignal WestDura Extended Duration Substrate, Pierce) auf Röntgenfilmen (Kodak)

### 2.2.6 Aufnahme multizyklischer Replikationskurven

Um das Replikationsverhalten von Viren in Zellkultur zu untersuchen, wurden MDCK II-Zellen mit einer MOI=0,01 im 35 mm-Format infiziert. Die Ansätze wurden als Doppelbestimmung angefertigt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit exakt 2 ml TPCK-Trypsin-haltigem Infektions-MEM (1  $\mu$ g/ml) überschichtet. Zu den Zeitpunkten 12/24/36/48/(60) h *p.i.* wurden allen Ansätzen und der Kontrolle (ohne Infektion) 150  $\mu$ l des Zellüberstandes entnommen und durch Infektionsmedium (TPCK-Trypsin 1  $\mu$ g/ml) ersetzt. Die Proben wurden für 5 min bei 3500 rpm zentrifugiert und zunächst bei -80°C aufbewahrt. Die Ansätze wurden während der Dauer des Experiments mikroskopisch betrachtet und es wurden solange Proben entnommen, bis nahezu die gesamte Zellschicht durch den

zytopathischen Effekt zerstört war. Dieser Zeitpunkt war im Allgemeinen nach 48 h erreicht. Nach dem Ende der Inkubationszeit wurden die Titer der einzelnen Proben per Immunfluoreszenz bestimmt und die Mittelwerte der Doppelbestimmung logarithmisch in einem Diagramm aufgetragen. Jedes Experiment wurde in dieser Form wiederholt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen (STABWN) dieser Doppelbestimmung sind als Replikationskurven im Ergebnisteil dargestellt.

### 2.2.6.1 Neutralisationsstudien

Um den Einfluss von Antiseren auf die Replikation einzelner Viren darzustellen, wurden multi-zyklische Replikationskurven wie beschrieben angefertigt. Die Ansätze wurden dazu verdoppelt und zwei der vier Infektionsansätze mit Antiserum-haltigem Infektions-MEM (TPCK-Trypsin 1 µg/ml) inkubiert. Die Konzentration der Antiseren wurde so gewählt, dass ausgehend von zuvor bestimmten Plaqueneutralisationstern (siehe Plaqueneutralisationstest 2.2.7) für alle H1-Viren eine 50 %-Inhibition der Virustiter erreicht werden konnte. Das Patientenserum wurde dem Infektionsmedium daher in der Verdünnung 1:10.000 zugegeben. Die Probenentnahme und Auswertung erfolgten wie zuvor beschrieben.

### 2.2.7 Plaqueneutralisationstests (PNT)

Um den Einfluss eines Antiserums auf die Virusvermehrung und damit auch den Virustiter zu bestimmen, hat man verschiedene Möglichkeiten die Wirkung von Antiseren zu untersuchen. Gängige, vor allem in der Diagnostik eingesetzte Methoden sind neben dem Plaqueneutralisationstest (PNT) auch der Hämagglutinationshemmtest (HHT) und Plaquereduktionsneutralisationstests im kleinen Maßstab (PNRT). Für die Fragestellung dieser Arbeit wurden PNTs bevorzugt. Sie ermöglichen eine direkte Analyse des Serumtiters, der Zellkultur-basiert innerhalb einer Viruskonzentration eine 50 %-Plaquereduktion bewirkt. Durch dieses Verfahren konnte die Neutralisierbarkeit verschiedener Virussubtypen gegenüber dem jeweiligen Antiserum in Bezug auf deren tatsächliche Replikation verglichen werden (im Vergleich zum HHT, der den Einfluss des Serums auf die Hämagglutinationsfähigkeit eines Virus untersucht).

Am Tag vor Beginn der Tests wurden MDCK II-Zellen im 6-Kalotten-Format (pro PNT 3 Platten) so ausgesät, dass sie am nächsten Tag eine Konfluenz von 80 % zeigten.

Für die Durchführung der PNTs wurden zunächst Verdünnungen des zu testenden Antiserums in PBS/ BA/ Mg<sup>2+</sup>/ Ca<sup>2+</sup> (kurz PBS<sup>+/+</sup>) angefertigt. Zur Verringerung unspezifischer Reaktionen wurde das Antiserum bei einer Verdünnung von 1:10 in PBS<sup>+/+</sup> für 30 min bei 56°C inaktiviert (Komplementinaktivierung) und anschließend in geeignete Verdünnungen gebracht (Bedingungen wurden getestet). Während des Inaktivierungsschrittes wurden die Virusstocks, ebenfalls in

## Methoden

---

PBS<sup>++</sup>, verdünnt. Die Bedingungen wurden hier so gewählt, dass im 35 mm-Format ca. 30-50 Plaques zählbar sein sollten. Die Tests wurden im Allgemeinen für zwei verschiedene Virusverdünnungen, die sich um eine halbe log-Stufe unterschieden (z.B. 10<sup>-3</sup> und 10<sup>-3,5</sup>) mit je drei verschiedenen Serumverdünnungen durchgeführt. Serum- und Virusverdünnungen wurden anschließend jeweils 1:1 (je 300 µl = 600 µl pro Kalotte) gemischt und für 60 min bei 37°C inkubiert. Die 80 %-konfluenten Zellen wurden dann mit den drei Virus-/Serumverdünnungen, als vergleichende Viruskontrolle mit der Virusverdünnung 1:1 in PBS<sup>++</sup> (jeweils in Doppelsätzen) und als Zellkontrolle nur mit PBS<sup>++</sup> infiziert (45 min bei RT, schwenken alle 15 min). Die Ansätze wurden anschließend direkt mit 2 ml des Avicell-Plaquemediums (mit 1 µg/ml TPCK-Trypsin) überschichtet und die Platten für 60-72 h im Brutschrank (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Platten 2 x mit PBS gewaschen und anschließend fixiert und gefärbt (Kristallviolettlösung, 10 % Formaldehyd). Die Färbelösung wurde nach mindestens 30 min Einwirkzeit mit dH<sub>2</sub>O entfernt und die Platten getrocknet. Die Plaquezahlen wurden durch auszählen ermittelt und die reziproke Serumverdünnung bei 50 % Plaquereduktion über die folgende Formel bestimmt:

$$\frac{1}{2}(a \times b/c + d \times b/e) = 50\% \text{ Plaquereduktionstiter}$$

a= reziproke Serumverdünnung > 50% Plaquereduktion, c= Plaquezahl „a“

d= reziproke Serumverdünnung < 50% Plaquereduktion, e= Plaquezahl „d“

b=1/2 Plaquezahl der Viruskontrolle

### 2.2.8 Rezeptorassays / ELISA

ELISA für „Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay“ ist eine Methode zum Nachweis von Proteinen aus Flüssigkeiten oder der Bindungsstärke von Antikörpern an die Proteine. Bei dieser immunologischen Nachweismethode kommt es zu einer spezifischen Bindungsreaktion zwischen einem ersten spezifischen Bindungspartner, der Substanz, die nachgewiesen werden soll ("Analyt") und einem zweiten spezifischen Bindungspartner, der mit dem Analyten reagiert oder bindet. Spezifische Bindereaktionen können auf verschiedene Weise detektiert werden. Üblicherweise ist dabei einer der Bindungspartner markiert. Markierungsmethoden können Radioisotope, Chromogene, Fluorogene, Enzymmarkierung oder Substanzen sein, die wiederum ein spezifisches Bindepaar bilden können (z.B. Biotin / Streptavidin). Durch die Zugabe eines Substrates wird per Enzymreaktion ein optisch-messbarer Farbumschlag erreicht.

### 2.2.8.1 Bestimmung der Hämagglutinin-Rezeptorbindung über Festphasen-Assays

Die Festphasenmethode mittels direkter Bindung erlaubt differenzierte Einblicke in die Wechselwirkung zwischen Hämagglutinin und den PAA-Biotin-Oligosacchariden, den synthetischen Analoga des zellulären Rezeptors. Für dieses Assay wurden 96-Kalotten-Platten (40 µl / Kalotte, 3 x 8 Kalotten pro Virus) mit je 16 HA-Einheiten einer gereinigten Virussuspension (Virus-Glyzerolstocks) in TN-Puffer und 16 h abgedeckt bei 4°C an der Platte (Corning) immobilisiert. Anschließend wurden die Platten 3 x mit kaltem PBS gewaschen (jeweils 200 µl/Kalotte). Danach wurden pro Kalotte 100 µl Blockierungslösung (2 % BSA in TN-Puffer) zugegeben und die Platten für 1,5 h bei RT inkubiert. Im Anschluß wurde 3 x mit kaltem PBS, welches 0,05 % Tween 20 enthielt gewaschen (200 µl/Kalotte). Nach Zugabe von je 35 µl/Kalotte der Zweischrittverdünnungen von biotinylierten Oligosacchariden (OS-PAA-Biotin: 3'SLN; 6'SLN; 6'SL) in Puffer „R“, beginnend bei 20 µM, wurden die Platten bei 4°C für 1 h inkubiert. Im Anschluß an drei Waschschrte mit PBS/0,05 % Tween 20 (kalt, 200 µl/Kalotte) wurden je 50 µl einer Streptavidin-Peroxidaselösung (100 mU/ml) in Puffer „R“ zugegeben und so die biotinylierten Oligosaccharide über das Steptavidin für 45 min bei 4°C an das Enzym POD gekoppelt. Nach weiteren drei Waschschrten mit PBS/0,05 % Tween 20 (kalt, 200 µl/Kalotte) wurden 50 µl der Substratlösung ABTS zugegeben und die Platte bei 37°C inkubiert bis eine hellgrüne Färbung auftrat. Die optische Dichte wurde bei 405 nm im ELISA-Reader SpektraFluor Plus (Tecan, A) gemessen.

Die Dissoziationskonstante  $K_{\text{diss}}$  wurde bestimmt, indem man die optische Dichte gegen die OS-PAA-Biotin-Konzentrationen aufträgt (Scatchard-Plots). Die Dissoziationskonstante ist gleich der Konzentration, die dem Punkt  $A_{\text{max}}/2$  entspricht. Angegeben wurde die Affinitätskonstante  $K_{\text{aff}}$ , sie entspricht  $1/K_{\text{diss}}$ .

### 2.2.8.2 Bestimmung der Neuraminidase-Substratspezifität

Die Methode zur Bestimmung der Neuraminidase-Substratspezifität ist eng angelehnt an das Fluoreszenzassay von L. V. Mochalova (Mochalova, Korchagina et al. 2005). Das Oberflächenglykoprotein der Influenza A-Viren hydrolysiert als Exoglykosidase die Bindung zwischen Sialinsäure und dem verbundenem Zuckerrest. Die Methode basiert auf der Verwendung BODIPY-gelabelter Sialooligosaccharide als NA-Substrat und der darauf folgenden Separierung innerhalb einer DEAE-Toyopearl-Minisäule. Durch die fluoreszenzmarkierten Sialooligosaccharide, entsteht unter der Wirkung der Neuraminidase ein Gemisch, welches das neutral geladene fluoreszenzmarkierte Produkt und negativ geladenes, nicht reagierendes Substart enthält. Das Substrat wird über eine chromatografische Minisäule mit DEAE-Ionenaustauscherharz abgetrennt und das Produkt fluorometrisch gemessen.

## Methoden

---

Die verwendeten Oligosaccharide (2.1.9) wurden mir freundlicherweise vom *Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, RUS* überlassen. Sie kommen in einem Komplex mit einer Spacer-Gruppe (sp) und dem neutralen Fluoreszenzfarbstoff BODIPY FLSE (fluo) zum Einsatz.

Die Oligosaccharid-Spezifität mit der die Neuraminidase die verschiedenen fluoreszenzmarkierten  $\alpha$ 2,3- und  $\alpha$ 2,6-Sialooligosaccharide schneidet, wurde innerhalb dieser Arbeit für zwei N1-Neuraminidasen (A/NewCaledonia/20/99 (H1N1) und A/CommonBussard/Berlin/1/06 (H5N1) und drei N2-Neuraminidasen (A/Sachsen/1816/02; rNC4-P7-M und rNC4-P6/7-M) bestimmt. Das Assay beinhaltet folgende Teilschritte:

- (1) Die Inkubation der fluoreszenzmarkierten Sialooligosaccharide mit Neuraminidase unter Bedingungen, bei denen nur eine partielle Desialierung des Substrats abläuft.
- (2) Das Auftragen des Reaktionsgemisches auf eine Minisäule mit Ionenaustauscherharz mit dem Ziel der Bindung des negativ geladenen Substrats.
- (3) Die fluorometrische Bestimmung des neutral geladenen fluoreszenzmarkierten Reaktionsproduktes im wäßrigen Eluat und des negativ geladenen Substrats.
- (4) Die Berechnung der Ausbeute der enzymatischen Reaktion und der Substratspezifität der Neuraminidase.

Für die Untersuchung wurden in TN-Puffer verdünnte, gereinigte Virusstocks verwendet. Die Verdünnung jedes Virusstammes wurde so gewählt, dass sie bei Wechselwirkung mit 100  $\mu$ M 3' SiaLac-sp-Fluo, dem besten Substrat, die Produktausbeute von 30 % in 30 min nicht überstieg. Dadurch wurde die enzymatische Aktivität desselben Virusstammes gegenüber anderen Sialosiden im linearen Bereich der kinetischen Kurve untersucht. Die einzelnen Assays wurden mit konstanten Viruskonzentrationen bei variablen Anfangskonzentrationen der Substrate im Reaktionsgemisch und variablen Inkubationszeiten durchgeführt. Für die Durchführung der enzymatischen Reaktion in Mikro-Reaktionsgefäßen (0,2 ml SnapStrip PCR Tube) wurden 10  $\mu$ l Endvolumen (je 5  $\mu$ l für zwei Messpunkte) des Reaktionsgemisches angesetzt, welches neben dem entsprechend verdünnten gereinigten Virus (3  $\mu$ l) auch Substrat in den Anfangskonzentrationen von 15 bis 50  $\mu$ M enthielt. Die Reaktion lief in einem Puffer ab, der 0,05 M Na-Acetat, pH 5,0-5,2 und 0,005 M  $\text{CaCl}_2$  enthielt. Die Mikro-Reaktionsgefäße wurden sorgfältig verschlossen und im Thermostat bei 37 °C für eine bestimmte Zeit (zwischen 10 und 30 min) inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden die Reaktionsgefäße für acht Minuten bei 80 °C

## Methoden

---

inkubiert und anschließend mit Wasser (ddH<sub>2</sub>O) bis zu einem Volumen von 50 µl verdünnt. Diese Lösung wurde entweder sofort analysiert oder bei -20 °C gelagert.

Für die Auftrennung der Reaktionsprodukte wurden chromatografische Minisäulen, die aus Pipettenspitzen mit Filter hergestellt wurden und mit 40 µl (Auftrag von 100 µl Harz ergibt nach Abtropfen ca. 40 µl) des Ionenaustauscherharzes DEAE-Toyopearl (Tosoh, J) in 1 M Acetatpuffer, pH 5,0 befüllt waren, benutzt. Vor dem Auftragen von 20 µl Probe wurden die Säulen drei Mal mit je 150 µl Wasser (ddH<sub>2</sub>O) gewaschen. Das neutral geladene Reaktionsprodukt wurde mittels Mikropipette mit 450 µl Wasser eluiert und in eine schwarze 96-Kalotten-Mikrotiterplatte (Nunc) zur Fluoreszenzmessung überführt (je 150 µl in drei Kalotten). Das nicht-reagierende negativ-geladene Substrat verblieb unter diesen Bedingungen an das Harz gebunden in der Säule und wurde mit 450 µl 0,5 M NaCl eluiert (je 150 µl in die nächsten drei Kalotten). Die Fluoreszenzmessung wurde am ELISA-Reader SpektraFluor Plus (Tecan, A) mit dem Standardfilter 485/535 nm durchgeführt. Die Berechnung der Ausbeute der enzymatischen Reaktion und der Substratspezifität der Neuraminidase wurde folgendermaßen ausgewertet:

Die Neuraminidaseaktivität wurde als die Konstante der Substratspezifität der Neuraminidase bezogen auf das Set an Oligosacchariden bestimmt. Die Analyse wurde unter Bedingungen durchgeführt, bei denen die NA-Aktivität gegenüber den fluoreszenzmarkierten Oligosacchariden als Anfangsgeschwindigkeit ( $V_0$ ) der enzymatischen Reaktion im linearen Bereich der kinetischen Kurve, d.h. der Abhängigkeit der Bildung des Produkts von der Zeit, bestimmt wurde. Die Ausbeute der enzymatischen Reaktion (A) und die Konzentration des gebildeten Produkts (C) berechnen sich aus den Gleichungen (1) bzw. (2):

$$A = I_p \times 100 / (I_p + I_s) \quad (1)$$

$$C = I_p \times S_0 / (I_p + I_s) \quad (2)$$

$I_p$  = Menge des gebildeten Produkts

$I_s$  = Menge des nicht reagierenden Substrats

$S_0$  = Anfangskonzentration des Substrats

Die Anfangsgeschwindigkeit im linearen Bereich der kinetischen Kurve wird nach der Gleichung bestimmt:  $V_0 = C/t$  ( $t$  = Inkubationszeit). Unter den gewählten Bedingungen entspricht das Verhältnis  $V_0/S_0$  praktisch der Spezifitätskonstanten (Tangens des Anstiegswinkels im Anfangsbereich der kinetischen Kurve der Abhängigkeit  $V_0$  von  $S_0$ ) und erlaubt eine quantitative Beurteilung der Effektivität der Desialierung des Substrats durch die untersuchte Sialidase. Der

Vergleich dieses Parameters für verschiedene Substrate desselben Enzyms ermöglicht die Beurteilung seiner Substratspezifität.

### *2.2.8.3 Bestimmung der Bindung viraler Oberflächenglykoproteine an NK-Rezeptoren*

Die relative Bindungsstärke von Influenza A-Viren an die NK-Rezeptoren NKp44 und NKp46 wurde ebenfalls per Festphasenmethode bestimmt. Die Methode ist eine Neuerung bzw. Weiterentwicklung zur Bestimmung der Spezifität zwischen viralen Glykoproteinen und NK-Rezeptor mittels direkter Bindung. Sie ist angelehnt an die Veröffentlichung von Arnon et al., (Arnon, Achdout et al. 2004). In dieser Veröffentlichung wurde die direkte Bindung der NK-Rezeptoren NKp44 und NKp46 an HA über HA-Rosetten des H3N2-Virus X31 (A/Aichi/2/68xPR/8/34) bestimmt. Da das gereinigte Protein für die zu testenden Viren dieser Arbeit nicht vorlag, wurde ähnlich wie für die Bestimmung der Spezifität der Hämagglutinin-Rezeptorbindung eine Suspension gereinigter Viruspartikel verwendet. Weiterhin schließt die Verwendung des gesamten Virus einen Einfluss des Glykoproteins NA bezüglich der relativen Bindungsstärke an die NK-Rezeptoren nicht aus. Die einzusetzenden HA-Einheiten wurden in Testexperimenten bestimmt. Spezifische Bindungen ließen sich durch die Beschichtung von Cornell-Platten im 96-Kalotten-Format mit 64 HA-Einheiten/Kalotte (HAU) erzielen.

Die 96-Kalotten-Platten (Corning) wurden mit 64 HAE einer gereinigten Virussuspension in TN-Puffer beschichtet (40 µl/Kalotte) und für 16 h (oder über Nacht) bei +4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Platten drei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen (200 µl/Kalotte). Danach wurden 100 µl/Kalotte Blockierungslösung (1 %-BSA in PBS) zugegeben und die Platte für 1,5 h bei RT inkubiert. Daran schlossen sich drei Waschschrte mit kaltem PBS, welches 0,05 % Tween 20 und 1 % BSA (PBSt) enthielt an (ebenfalls 200 µl/Kalotte). Nach Zugabe von Ig-Fusionsproteinen (0,1 µg, 0,2 µg, 0,5 µg/100 µl oder 100 µl TN-Puffer als Kontrolle) wurden die Platten abermals über Nacht bei 4 °C inkubiert. Im Anschluß an drei Waschschrte mit kaltem PBSt (0,05 % Tween, 1 % BSA), jeweils 200 µl/Kalotte, wurden 100 µl des Sekundärantikörpers mouse anti-human IgG-Biotin, verdünnt für ELISA 1:1000 in PBSt (0,05 %, 1 % BSA) zugegeben und für 1 h bei 4 °C gekühlt. Anschließend wurden 50 µl einer Streptavidin-Peroxidase-Lösung (100 mU/ml) in PBSt (entspricht 2 µl StrPOD-Lösung in 10 ml Puffer) zugegeben und die Platten 45 min bei 4 °C inkubiert. Nach weiteren drei Waschschrten mit kaltem PBSt wurden 50 µl der Substratlösung ABTS zugegeben und die Platten bei 37°C inkubiert bis eine hellgrüne Färbung auftrat. Die Färbung wurde (nach ca. 1 h) durch Zugabe von 50 µl/Kalotte) ABTS-Stop-Lösung (Konzentrat, zuvor 1:5 verdünnt in dH<sub>2</sub>O) gestoppt. Die optische Dicht wurde im ELISA-Reader SpektraFluor Plus (Tecan, A) bei 405 nm gemessen.

## 2.2.9 Arbeiten mit Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen)

### 2.2.9.1 Gewinnung von NK-Zellen aus Buffy Coat

Buffy Coat ist aus Vollblut gewonnenes, Leukozyten- und Thrombozyten-reiches Zellmaterial ohne Plasma und ohne einen Großteil der Erythrozyten. Es wurde vom DRK-Blutspendedienst bezogen. Um PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) aus *Buffy Coat* zu isolieren, wurden die Zellen 1:3 mit Versene verdünnt und in eine Zellkulturflasche überführt (insgesamt ca. 100 ml). 10 ml des Lymphozyten-Separations-Mediums Ficoll wurden in 50-ml-Röhrchen vorgelegt und mit ca. 25 ml Zellsuspension vorsichtig überschichtet. Die Zellen wurden per Gradientenzentrifugation für 30 min bei 300 x g und RT in Phasen getrennt (Anlauf 2 min oder Stufe 1, Auslauf 2 min oder Stufe 2). Die Interphase wurde abgenommen und in frische 50-ml-Röhrchen überführt (gleiche Anzahl wie Gradienten). Die Röhrchen wurden mit PBS (kalt) aufgefüllt und bei 4 °C für 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellpellets in PBS aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Die Zellen wurden für bei 4 °C für 10 min bei 300 x g zentrifugiert, der Überstand anschließend verworfen und das Zellpellet erneut in PBS aufgenommen. Um Erythrozyten zu lysieren, die später bei der Gewinnung der NK-Zellen in der MACS®-Säule den Zelldurchfluß behindern, wurden die Zellen für 1-3 min mit 1 ml des Erythrozyten-Lyse-Puffers inkubiert und dann wieder auf 50 ml mit PBS aufgefüllt. Anschließend wurde der Waschschrift wurde 2 x oder mehrfach wiederholt bis der Überstand nach dem zentrifugieren klar erschien. Die Zellen wurden abschließend auf ein Volumen von 50 ml mit PBS aufgefüllt. Die Zellzahl wurde anschließend bestimmt (siehe 2.2.9.2). Aus den frisch isolierten PBMCs wurden per MACS: *NK cell Isolation Kit* (Milteny Biotec) eine hochgradig reine NK-Zellpopulation gewonnen. Das Kit beruht auf negativer Selektion von „nicht-NK-Zellen“. „Nicht-NK-Zellen“ werden indirekt magnetisch mit einem Cocktail von Biotin-konjugierten Antikörpern gegen zellspezifische Antigene und einen Cocktail von Micro-Beads, konjugiert an monoklonale Antikörper, markiert. Die magnetische Separation erfolgt durch Platzierung der MACS®-Säulen (LS) in das magnetische Feld des MACS-Separators. Die magnetisch-markierten Zellen verbleiben beim Schleusen des Zellmaterials durch die Säule innerhalb der Säule. Die nicht-markierten NK-Zellen passieren die Säule und werden gesammelt. Die Reinheit der NK-Zellen wurde per FACS-Analyse mit den Antikörpern CD3-FITC und CD56-PE analysiert. NK-Zellen sind CD3-negativ und CD56-positiv. Für NK-Assays wurden die NK-Zellen vorsichtig zentrifugiert (5 min bei 300 x g) und anschließend in ca. 3 ml RPMI-Medium in einer T25-Zellkulturflasche (TPP) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> über Nacht aufbewahrt.

### 2.2.9.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte per Neubauer-Zählkammer. 10 µl einer Zellsuspension wurden 1:10 vorverdünnt in 80 µl PBS und 10 µl Trypan-Blau. 10 µl dieser Suspension wurden auf eine per Glasplättchen verdeckte Zählkammer aufgetragen und jeweils vier der äußersten 16-Feld-Quadrate (von neun) unter 10-facher Vergrößerung des Mikroskops ausgezählt. Bestimmt wurde nur die Zahl der NK-Zellen, die sich durch ihre Größe von den kleineren verbliebenen Thrombozyten und den größeren Lymphozyten unterscheiden. Der Mittelwert der Zellzahl der vier Quadrate wurde mit dem Faktor 10 (Verdünnung) und dem Faktor 10.000 (Kammerfaktor) multipliziert. Man errechnet so die Zellzahl pro Milliliter.

### 2.2.9.3 Infektion von Suspensionszellen K562

Die Suspensionszelllinie K562 wurde für NK-Assays verwendet. Die Zelllinie wurde für diese Assays am Abend vor dem Experiment mit verschiedenen Virusstämmen, mit einer MOI (*multiplicity of infection*)=1 infiziert. Die Zellen wurden dazu 1 x mit PBS gewaschen (3 min bei 800 x g). Die pelletierten Zellen ( $5 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$ ) wurden in einem Volumen von 200 µl aufgenommen und mit weiteren 50 µl der entsprechend eingestellten Virussuspension bzw. PBS als Kontrolle (in PBS/ BA/  $Mg^{2+}$ /  $Ca^{2+}$ ) für 45 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden anschließend erneut gewaschen und die Zellen dann in 5 ml RPMI-Infektionsmedium aufgenommen. Sie wurden für 16 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. In dieser Zeit kommt es zur Expression der Glykoproteine HA und NA auf der Zelloberfläche. Diese Proteine interagieren mit den Oberflächenrezeptoren mit den NK-Zellen.

### 2.2.9.4 NK-Assay und FACS-Färbung

Die virusinfizierten (bzw. als Kontrolle nicht infizierten) K562-Zellen wurden nach 16 h Inkubationzeit in 15-ml-Röhrchen überführt, für 5 min bei 300 x g zentrifugiert und anschließend 1 x mit PBS gewaschen (3 min bei 300 x g). Daraufhin wurden die Zellen mit dem per FACS-Analyse detektierbaren Farbstoff CFSE gefärbt.

CFSE Färbung: 1 ml einer 2,5 µM-verdünnten CFSE-Lösung wurde auf die gewaschenen Zellen gegeben, zügig resuspendiert und für 3-5 min bei RT inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend zunächst mit 500 µl reinem FKS gewaschen (5 min bei 200 x g). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen schließlich 2 x mit PBS, welches 5 % FKS enthielt gewaschen (5 min bei 200 x g). Die Zellen wurden anschließend in 5 ml RPMI aufgenommen.

Als weitere Kontrolle wurde ein Teil der nicht infizierten K562 Zellen nicht gefärbt. Nach der Färbung wurden alle Zellen (K562 infiziert und nicht infiziert; NK-Zellen) gezählt. Anschließend wurden, je nach Menge der vorhandenen NK-Zellen,  $2 \times 10^4$  bis  $5 \times 10^4$  der infizierten

## Methoden

---

K562 Zellen bzw. Kontrollzellen im Verhältnis 1:10 bzw. 1:20 mit NK-Zellen für 3 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> in einem Gesamtvolumen von 1 ml inkubiert. Verwendet wurden spezielle Hydrogelbeschichtete *low attachment*-Platten im 24-Kalotten-Format (Corning), die ein Anhaften der Zellen am Boden der Platte verhindern. Die gleiche Menge der infizierten K562-Zellen bzw. Kontrollzellen wurde jeweils ohne NK-Zellen inkubiert und später für den Infektionsnachweis (Färbung gegen das Nukleoprotein) im FACS eingesetzt. Je Experiment wurden die NK-Zellen eines gesunden Spenders verwendet. Die Zahl der gewonnenen NK-Zellen variierte je nach Spender stark zwischen  $5 \times 10^6$  und  $5 \times 10^7$  Zellen pro Buffy Coat.

Alle Zellen wurden nach drei Stunden aus der Inkubationsplatte entnommen und in FACS-Röhrchen überführt. Pro Röhrchen wurde 1ml FACS-Puffer hinzugegeben und die Zellen bei 4°C für 5 min bei 300 x g gewaschen, der Überstand abgesaugt und anschließend 20 min mit 100 µl 2,5 %-Formaldehydlösung auf Eis fixiert. Die CFSE-gefärbten Zellen wurden dann bis zur Messung bei 4 °C aufbewahrt. Andere Zellen wurden gewaschen (4°C, 5 min, 300 x g) und mit 1 ml Saponinpuffer/Ansatz 10 min bei RT permeabilisiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (4°C, 5 min, 300 x g) wurde der Puffer abgesaugt und pro Ansatz 50 µl primäre Antikörperlösung (z.B. α-NP) in Saponinpuffer zugegeben. Nach 30 min Inkubationszeit bei RT (dunkel) wurde mit 1 ml Saponinpuffer gewaschen (4°C, 5 min, 300 x g) und 50 µl der Sekundärantikörperlösung in Saponinpuffer zugegeben. Nach ebenfalls 30 min Inkubationszeit bei RT (dunkel) wurde zuerst mit 1 ml Saponinpuffer, anschließend mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen (jeweils 4°C, 5 min, 300 x g) und die Überstände nach jedem Zentrifugationsschritt vorsichtig abgesaugt. Die Zellen wurden abschließend vor der Messung im FACS (FACSCalibur) mit FACS-Puffer (ca. 500 µl) versetzt.

Im FACS wird die Zellsuspension unter hoher Beschleunigung durch eine Düse gepresst. Beim Austritt aus der Düse sind die Zellen extrem beschleunigt und von einer isotonischen Hüllflüssigkeit umgeben. Unter der Düsenöffnung trifft ein fokussierter Laserstrahl auf die austretende Flüssigkeit. Zellen, die den Laserstrahl passieren streuen das Licht in verschiedene Richtungen und senden durch Kopplung an fluoreszierende Antikörper zusätzlich Fluoreszenzlicht aus. Lichtsignale, die in Richtung des Lasers gestreut werden, sind als sogenanntes Vorwärtsstreulicht (FSC) durch Lichtsensoren meßbar. Das Vorwärtsstreulicht ist ein Maß für die Größe der Zellen. Lichtsignale, die hinter der Düse vom Mikroskopobjektiv aufgefangen werden, sind das Seitwärtsstreulicht (SSC) und das Fluoreszenzlicht der Antikörper. Das Seitwärtsstreulicht ist ein Maß für die Granularität der Zellen, das Fluoreszenzlicht ist spezifisch für die verwendeten Fluorochrome, beispielsweise Phycoerythrin oder FITC.

## Methoden

---

In dieser Arbeit wurde die Darstellung der Messergebnisse in Form von Histogrammen gewählt. Dabei wurde die Fluoreszenzintensität des entsprechenden Farbstoffs auf der X-Achse gegen die Anzahl der Zellen auf der Y-Achse (*counts*) aufgetragen. Die integralen Zahlenwerte wurden prozentual für die Auswertung verwendet.

### 3 Ergebnisse

Nach den ersten Isolationen von zwei H1N2-Viren in Saudi Arabien im März 2001, konnte die Zirkulation von H1N2-Viren bis März 2002 in weiten Teilen der Welt, geografisch auf vier Kontinenten (Asien, Afrika, Europa und Nordamerika) nachgewiesen werden (Gregory, Bennett et al. 2002; WHO 2002). In einigen Ländern, beispielsweise Großbritannien, Israel und Ägypten, gehörte die Mehrheit der ab August 2001 bis Februar 2002 isolierten H1-Viren zum Subtyp H1N2. In anderen Ländern, darunter Deutschland, wurden sie nur sporadisch neben H1N1-Viren nachgewiesen (Gregory, Bennett et al. 2002; Biere and Schweiger 2008). Die letzten nachgewiesenen H1N2-Infektionen stammen aus dem Jahr 2003 (Chen, La et al. 2006).

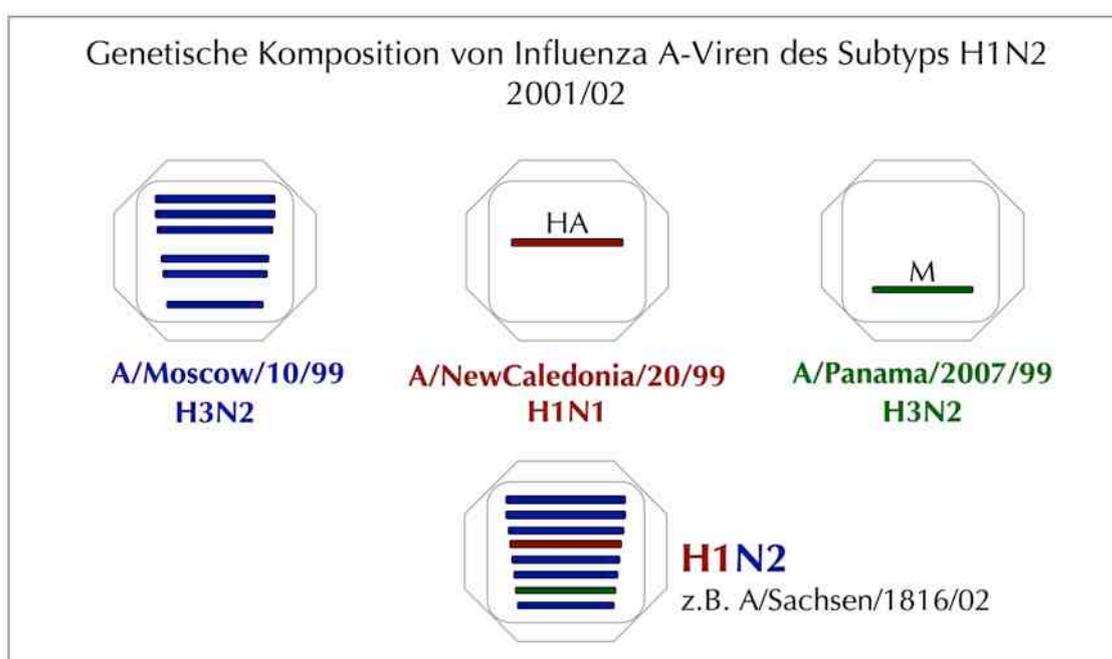


Bild 3.1: **Die genetische Komposition der H1N2-Viren der Jahre 2001 bis 2003.** H1N2-Viren entstanden durch Reassortierung eines A/Moscow-ähnlichen Virus (H3N2) mit dem HA-Segment eines A/NewCaledonia-ähnlichen Virus (H1N1). Das M-Segment entsprach dem eines A/Panama-ähnlichen Virus. Quelle: (Gregory, Bennett et al. 2002)

Um das Gefahrenpotential der neuen A/H1N2-Viren für die Bevölkerung einschätzen zu können, wurde von zentralen Gesundheitsbehörden in der Saison 2001/02 zunächst die Neutralisierbarkeit der H1N2-Viren durch Antikörper untersucht, die der saisonale Impfstoff induzierte (Gregory, Bennett et al. 2002; Xu, Smith et al. 2002; Goddard, Joseph et al. 2004). Da der trivalente Impfstoff sowohl die Komponenten von H3N2-, als auch von H1N1-Viren enthielt und Viren des neuen Subtyps noch nicht lange zirkulierten, bestand ein guter Schutz durch den Impfstoff. Neben der Bestimmung antigenetischer Merkmale der Viren, wurden genetische und phylogenetische Merkmale der H1N2-Viren durch Sequenzierung bestimmt und veröffentlicht (Gregory, Bennett et al. 2002; Xu, Smith et al. 2002). Die epidemiologischen Merkmale der in

## Ergebnisse

Deutschland isolierten H1N2-Viren durch das Nationale Referenzzentrum in Berlin waren mit diesen Ergebnissen hinsichtlich Neutralisierbarkeit und genetischer Komposition in Einklang (Influenza 2002). Diese Studien bildeten den Ausgangspunkt dieser Arbeit. Bild 3.1 zeigt welchen Ursprung die Segmente der zirkulierenden H1N2-Viren hatten und veranschaulicht die genetische Verwandtschaft der einzelnen Segmente zu drei Influenza A-Stämmen.

### 3.1.1 Übersicht der Aminosäureunterschiede der viralen Segmente

Anhand im Rahmen dieser Arbeit sequenzierter Segmente der Viren A/Sachsen/1816/02 (H1N2, HA), A/NewCaledonia/20/99 (H1N1), A/Moscow/10/99 (H3N2) und A/Panama/2007/99 (H3N2) (Accession-Nr. FluLANL: DQ486029; DQ487327–DQ487341), Sequenze, die aus dem nationalen Referenzzentrum Influenza (NRZ, Robert Koch-Institut) zur Verfügung gestellt wurden sowie durch Sequenzen, die aus Sequenzdatenbanken verfügbar waren, wurde eine detaillierte Analyse stammspezifischer Aminosäureunterschiede erstellt. Eine Übersicht ist segmentbezogen in Tabelle 3.1 zusammengestellt.

Tab. 3.1: Analyse segmentspezifischer Aminosäureunterschiede des Subtyps H1N2 im Vergleich zu den parentalen Stämmen A/Moscow/10/99 (H3N2), A/Panama/2007/99 (H3N2) und A/NewCaledonia/20/99 (H1N1).

Segment	Aminosäure	Protein	A/Moscow/10/99	A/Panama/2007/99	A/SaudiArabia/2231/01	A/Sachsen/1816/02	A/NewCaledonia/20/99
			H3N2	H3N2	H1N2	H1N2	H1N1
M	R174K	M1	Arg	Lys	Lys		Arg
M	A218T	M1	Ala	Thr	Thr		Ala
M	C17T	M2	Cys	Cys	Tyr		Cys
M	G16E	M2	Gly	Gly	Glu		Gly
M	N31S	M2	Asn	Ser	Ser		Ser
M	N20S	M2	Asn	Asn	Asn	Ser	Asn
NA	K83E	NA	Lys	Glu		Glu	
NA	G143R	NA	Gly	Arg	Gly	Gly	
NA	D197H	NA	Asp	His	Asp	Asp	
NA	E199K	NA	Glu	Glu	Lys	Lys	
NA	N208D	NA	Asn	Asp	Asn	Asn	
NA	K249R	NA	Lys	Arg	Lys	Lys	
NA	I257V	NA	Ile	Ile	Val	Ile	
NA	P267K/L	NA	Pro	Lys	Leu	Leu	
NA	S311T	NA	Ser	Ser	Thr	Ser	
NA	L370S	NA	Leu	Ser	Leu	Leu	
NA	K431N	NA	Lys	Lys	Asn	Asn	
NA	L437W	NA	Leu	Trp	Leu	Leu	
NP	N50S	NP	Asn	Ser		Ser	Asn
NP	K77R	NP	Lys	Arg		Arg	Lys
NP	A146T	NP	Ala	Thr		Thr	Thr
NP	D480E	NP	Asp	Glu			Asp
PB1	N105S	PB1	Asn	Ser			Asn
PB1	M179I	PB1	Met	Ile		Met	Val
PB1	K387R	PB1	Lys	Arg			Lys
PB1	I423M	PB1	Ile	Met			Ile
NS	V82A	NS1	Val	Ala	Val		Ala
NS	I156V	NS1	Ile	Val	Ile		
<b>1. AS ist A, Beginn HA1: ATYAD</b>							
HA	V169A	HA			Ala	Ala	Val
HA	N190D	HA			Asp	Asn	Asn
HA	A193T	HA			Thr	Thr	Ala
HA	A218T	HA			Thr	Thr	Ala
HA	V348M	HA			Met	Val	Val

Die Tabelle zeigt spezifische Aminosäureaustausche von H1N2-Viren und ihre Verwandtschaft zu den parentalen Stämmen *A/Moscow/10/99* (H3N2), *A/Panama/2007/99* (H3N2) und *A/NewCaledonia/20/99* (H1N1). Verglichen wurde das Segment M der H1N2-Viren zum Stamm *A/Panama/2007/99* (H3N2), die Segmente NA, NP, PB1 und NS zu *A/Moscow/10/99* (H3N2) und das HA-Segment zu *A/NewCaledonia/20/99* (H1N1). Das NA-Segment des Stammes *A/Panama/2007/99* wurde ebenfalls zum Stamm *A/Moscow/10/99* verglichen. Aminosäureunterschiede zum Vergleichsstamm sind rot markiert.

### 3.2 Die Herstellung „rekombinanter Wildtyp“-Viren

Für den Vergleich der Eigenschaften von H1N2-Viren mit deren „Elternstämmen“, sollten sowohl das rekombinante „H1N2-Referenzvirus“ (bezeichnet als rNC4-P7-M), die drei parentalen Viren sowie weitere Reassortanten mit gemischten Genkonstellationen gewonnen werden. Ihre Herstellung erfolgte mit Hilfe der „reversen Genetik“ durch Transfektion von klonierten cDNA-Konstrukten in geeignete Kultursysteme. Ausgangsmaterial für die Herstellung der revers genetischen Systeme waren die parentalen Wildtyp-Viren. Die drei Stämme, aus denen die Reassortante H1N2 entstanden war, sind epidemiologisch betrachtet „Referenzstämme“. Sie werden nach bestimmten Kriterien isoliert und gezüchtet und waren in der Influenzasaison 2001/02 die von der WHO als Vakzinestämme empfohlenen Komponenten des saisonalen Impfstoffes. Es waren daher sowohl Sequenzen aus internationalen Datenbanken, als auch Virusproben in ausreichender Menge erhältlich.

Virusisolate (aus Brutei 11d, 1. Passage) der Stämme ***A/Moscow/10/99* (H3N2)**, ***A/Panama/2007/99* (H3N2)** und ***A/NewCaledonia/20/99* (H1N1)** bzw. die RNA dieser Stämme wurde aus dem Nationalen Referenzzentrum (NRZ) Influenza in Berlin bezogen. Nach Gewinnung ausreichender RNA-Mengen wurden aus diesen drei Stämmen per zweistufiger-RT-PCR nacheinander die vollständigen acht Segmente amplifiziert (2.2.4.1). Dafür wurden je nach Art der Klonierung zwei Arten von Primern verwendet: einmal Primerpaare, die außerhalb der nichtkodierenden Bereiche eine Schnittstelle für die Enzyme *BfuA* I oder *BsmB* I enthielten. Für die Verwendung des *In-Fusion™ Dry Down PCR Cloning Kits* (Clontech) wurden laut Protokoll Primerpaare verwendet, die jeweils 15 Nukleotide lange 5'-Überhänge kompatibel zum Vektor *pHW2000/BsmB* I besaßen. Die PCR-Bedingungen wurden für die Subtypen H3N2 und H1N1 angepasst und teilweise spezifisch für jedes Segment verändert um optimale PCR-Ergebnisse zu erzielen. Grundlage dafür war die Publikation von Hoffmann *et al.* (Hoffmann,

## Ergebnisse

Stech et al. 2001). Bild 3.2 zeigt die PCR-Produkte des Stammes A/Moscow/10 /99 (H3N2) nach Auftrennung auf einem Agarosegel.

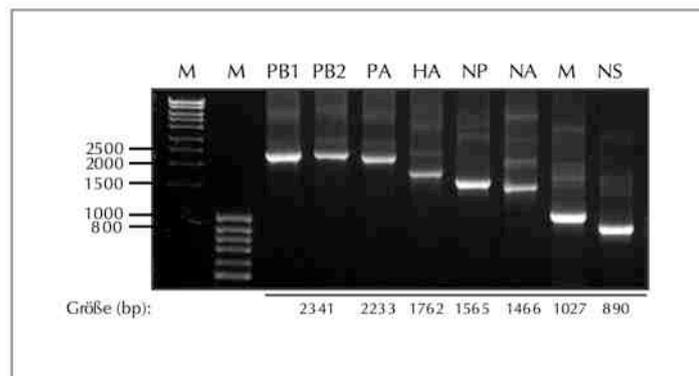


Bild 3.2: **Übersicht der acht Segmente des Stammes A/Moscow/10/99.** Die Segmente wurden aus cDNA mit Segment-spezifischen Primern amplifiziert und 25 µl des PCR-Produktes auf einem 1 %-Agarosegel aufgetrennt.

Die amplifizierten PCR-Produkte wurden aus dem Gel isoliert, gereinigt und je nach Segment mit dem Enzym *BsmB* I oder *BfuA* I verdaut und abermals gereinigt. Segmente, die mit den spezifischen Primern des In-Fusion™ Dry Down PCR Cloning Kit (Clontech) amplifiziert wurden, konnten ohne weiteren Restriktionsverdau für die Klonierung eingesetzt werden. Nach der Mengenbestimmung wurden sie für die Rekombination (oder Ligation) in den Vektor pHW2000 (geschnitten mit *BsmB* I, auch *Esp* I) eingesetzt. Der Ligationsansatz / Rekombinationsansatz wurde nach entsprechender Inkubationszeit (siehe Methoden) in hochkompetente *E. coli* transformiert. Die DNA der erhaltenen Bakterienkolonien wurde entweder mittels Test-PCR geprüft und anschließend Plasmid-DNA gewonnen oder gleich aus den Kolonien die Plasmid-DNA, zunächst im kleinen Maßstab isoliert. Die Plasmide wurden dann per Restriktionsverdau linearisiert und inserierte cDNA anhand der Fragmentgrößen auf einem Agarosegel nachgewiesen. Teile des Vektors und die inserierte cDNA wurden sequenziert und sofern keine Mutationen erkannt wurden im größeren Maßstab gewonnen.

Insgesamt wurden 24 Plasmide, drei Sätze aus je acht Plasmiden der Referenzstämme A/Moscow/10/99 (H3N2), A/Panama/2007/99 (H3N2) und A/NewCaledonia/20/99 (H1N1), hergestellt. Sie wurden für die Gewinnung der „rekombinanten-Wildtyp“-Viren und weiterer Reassortanten eingesetzt. Die Herstellung des Plasmidsatzes für den Stamm A/Panama/2007/99 (H3N2) erfolgte mit Unterstützung von Dipl.-Ing. Andrea Zöhner. Die vollständigen Genomsequenzen, d.h. kodierende und nicht kodierende Sequenzen der Segmente von A/Moscow/10/99 (H3N2) und A/Panama/2007/99 (H3N2) wurden der Datenbank Los Alamos (FLULANL) zur Verfügung gestellt (Accession-Nummern: DQ486029; DQ487327-DQ487341).

Die Herstellung rekombinanter Influenzaviren erfolgte mit Hilfe der „Acht-Plasmid-Systeme“ zur Gewinnung von Influenza A-Viren mittels klonierter cDNA ((Hoffmann, Neumann et al. 2000), Einleitung und Methoden 2.2.1.1). Dazu wurden je 500 ng der acht Plasmid-Konstrukte mit Lipofectamine 2000™ in HEK-293T-Zellen eingebracht. Diese Zellen eignen sich sehr gut für die Aufnahme der Plasmid-DNA, produzieren jedoch keine großen Virusmengen. Das in diesen Zellen gewonnene Virus wurde von zellulären Überresten durch Zentrifugation befreit. Dargestellt ist das Transfektionsschema in Bild 3.3. Die weitere Passage erfolgte in MDCK II-Zellen, die sowohl Rezeptoren mit  $\alpha$ 2,6-gebundenen Sialinsäuren besitzen und daher einen geringeren Selektionsdruck auf die Rezeptorspezifität der Viren ausüben.

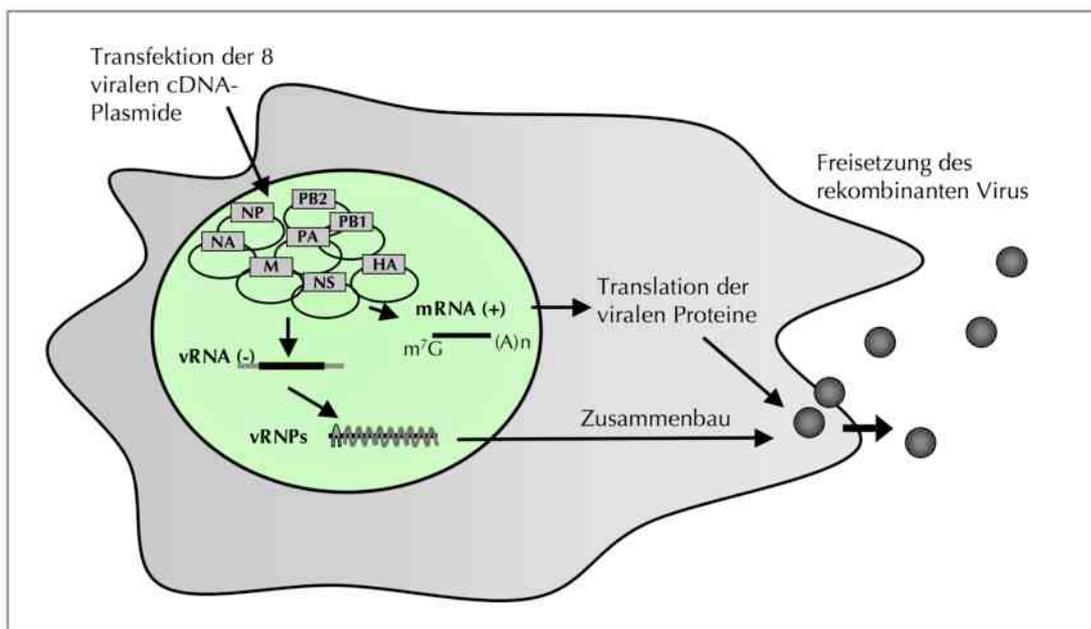
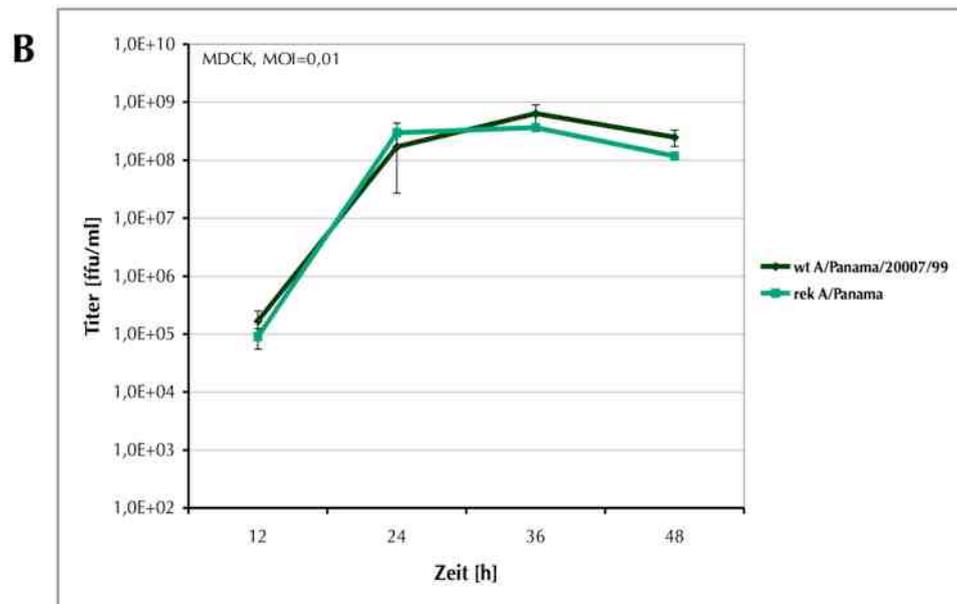
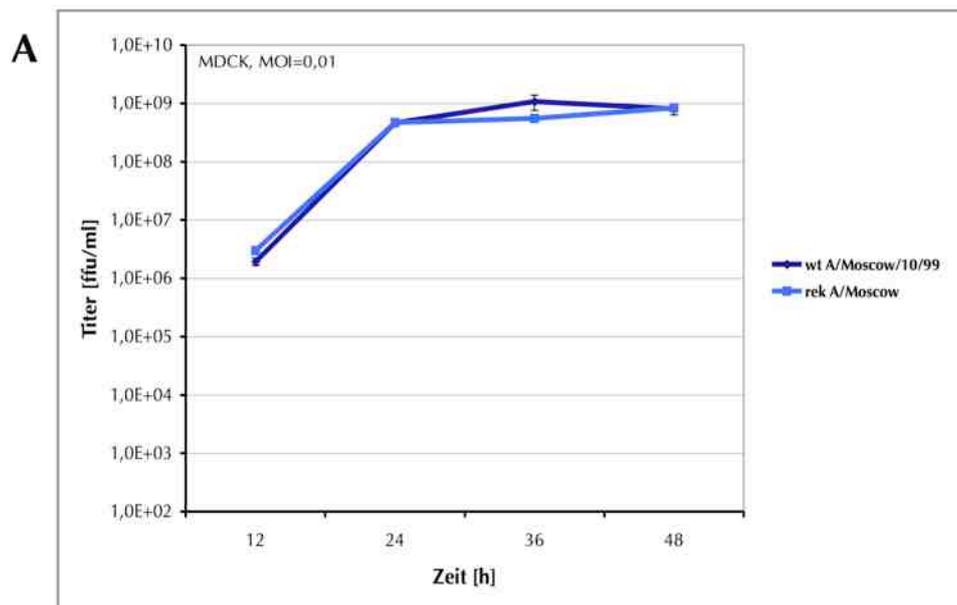


Bild 3.3: **Transfektionsschema zur Gewinnung rekombinanter Influenza A-Viren.** Acht cDNA-Plasmide werden mit Lipofektamin 2000 in HEK-293T-Zellen eingebracht. Innerhalb der Zellen wird von den Plasmiden mRNA transkribiert und Negativstrang-vRNA abgelesen. Die translatierten Proteine werden durch die Zelle zusammen mit der genomischen vRNA zu neuen Viruspartikeln verpackt. Durch eine Auswahl der Plasmide ist die Herkunft einzelner Segmente in den rekombinanten Viruspartikeln steuerbar.

Um sicherzustellen, dass die rekombinant gewonnenen Viren der drei Referenzstämme den eigentlichen Wildtyp-Isolaten in ihren Replikationseigenschaften gleichen, wurden beide parallel verglichen. Verzögerte oder eingeschränkte Replikationsfähigkeit der „rekombinanten-Wildtyp“-Viren hätten in einem solchen Fall einen späteren Vergleich von veränderten Virusreassortanten im Vergleich zu den (rekombinanten) Wildtyp-Viren erschwert oder verhindert. Für den Vergleich von „rekombinanten-Wildtyp“- und Wildtyp-Viren wurden Replikationskurven durch Vermehrung auf MDCK II-Zellen angefertigt. Da die Wildtyp-Viren aus Patientenproben durch Passage im Brutei isoliert wurden, wurden sie zuvor ebenfalls einmal auf MDCK II-Zellen vermehrt.

## Ergebnisse

Für die Replikationskurven wurden Zellen in 35 mm Kulturschalen (entspricht  $10^6$  Zellen) ausgesät und über Nacht in Kulturmedium gehalten. Anschließend wurden die Zellen mit einer MOI (*Multiplicity of infection*) von 0,01 infiziert und in Infektionsmedium für 48 h Stunden inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten (nach 12, 24, 36, 48 h) wurden Proben von 150  $\mu$ l entnommen und die Flüssigkeitsmenge jeweils durch Medium ersetzt. Die Virusmenge im Zellkultur-Überstand der Proben wurde anschließend per Immunfluoreszenz auf MDCK II-Zellen quantifiziert. Die bestimmten Virustiter sind in den Replikationskurven logarithmisch dargestellt. Die Bilder 3.4 (A-C) zeigen einen Vergleich der Replikationseigenschaften von „rekombinanten- Wildtyp“-Viren mit den natürlichen Wildtypen für die drei Referenzstämme.



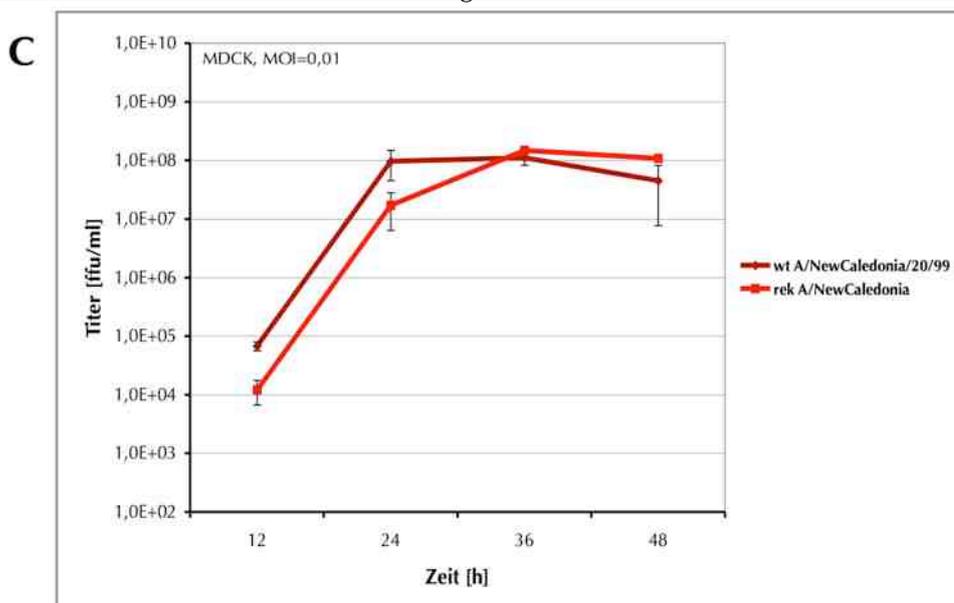


Bild 3.4: Vergleichende Vermehrungskurven der drei parentalen Influenza A-Virusstämme A/Moscow/10/99 (H3N2), A/Panama/2007/99 (H3N2) und A/NewCaledonia/20/99 (H1N1). A zeigt die Replikationskinetik des Stammes A/Moscow/10/99 zusammen mit dem entsprechenden rekombinanten A/Moscow-Virus. B vergleicht A/Panama/2007/99 mit dem „rekombinanten-Wildtyp“. C zeigt das Replikationsverhalten von A/NewCaledonia/20/99 und rekombinanten A/NewCaledonia. Die Replikationskurven zeigen Mittelwerte aus zwei Experimenten, die jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte STABWN.

Das Replikationsverhalten der „rekombinanten-Wildtyp“-Viren aller drei Stämme in MDCK II-Zellen entsprach dem der Wildtyp-Viren. Die Kurven des Stammes A/Moscow (A) und A/Panama (B) verlaufen für die Wildtypen und die rekombinanten Viren jeweils nahezu identisch. Für den Stamm A/NewCaledonia (C) waren nur geringe Abweichungen der beiden Viren (wt und rek) zueinander erkennbar. Nach 36 h erreichen Wildtyp und rekombinante Viren jedoch den maximalen Titer von im Mittel  $1 \times 10^8$  ffu/ml. Die Herstellung der drei funktionellen rekombinanten Systeme war die Grundlage für die Herstellung neuer Virusreassortanten mit Hilfe der reversen Genetik. Die einzelnen Plasmide konnten so als eine Art „Baukastensystem“ weiterverwendet werden.

Die Farbgebung der im Folgenden dargestellten Viren ist in Bild 3.5 erklärt. Die Farbe blau kennzeichnet die Segmente des Stammes A/Moscow (H3N2), grün die des Stammes A/Panama (H3N2), rot die Segmente des H1N1-Stammes A/NewCaledonia. Der jeweils dunklere Farbton in einigen Abbildungen stellt dar, dass es sich um das Wildtyp-Virus handelt. Der hellere Farbton wurde für die rekombinanten Viren verwendet.

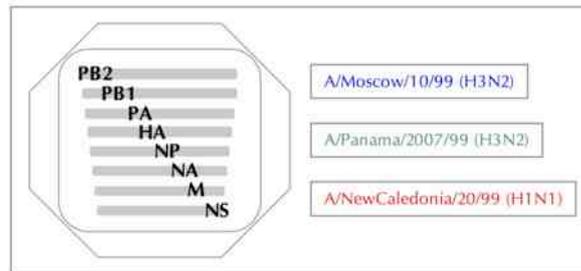


Bild 3.5: **Schematische Darstellung für die Bezeichnung der Segmente und Virusstämme.** Die Abbildung des Virus gibt die Reihenfolge der Segmente 1-8 mit 1 (PB2), 2 (PB1), 3 (PA), 4 (HA), 5 (NP), 6 (NA), 7 (M), 8 (NS) wieder. Der Farbcode rechts gibt den Virusstamm der schematischen Darstellung an: blau-A/Moscow/10/99, grün-A/Panama/2007/99 und rot-A/NewCaledonia/20/99 (H1N1).

### 3.3 Die Herstellung von Virus-Reassortanten

#### 3.3.1 Virus-Reassortanten des Subtyps H3N2

Die Herstellung aller Reassortanten verfolgte das Ziel durch gezielten Austausch einzelner Segmente deren spezifischen Einfluss auf die Eigenschaften eines Virus nachzuvollziehen. Sie erlauben durch die Analyse bestimmter Viren eine Aussage über das Maß der Kompatibilität von Segmenten verschiedener Virusstämme zueinander. Weiterhin ist es möglich zu untersuchen, welche Segmente die Eigenschaften eines Virus besonders stark beeinflussen. Für die Herstellung der Reassortanten wurden zwei Ansätze gewählt, die in Bild 3.6 dargestellt sind. Einmal wurde auf der Basis von H3N2-Viren untersucht, ob durch das Einkreuzen interner Gensegmente eines H1N1-Virus die Replikationsfähigkeit der H3N2-Viren beeinflusst wird. Im darauf folgenden Kapitel 3.2.2 bezieht sich die Herstellung und Analyse der Reassortanten auf das konkrete Fallbeispiel der Entstehung von H1N2-Viren in den Jahren 2001/02. Ausgehend von der Herstellung eines rekombinanten H1N2-„Referenzvirus“ aus den drei rekombinanten Plasmidsystemen wurden dann weitere Gensegmente, intern und auch NA ausgetauscht. Die Auswirkungen der spezifischen genetischen Zusammensetzung der Viren wurden anschließend hinsichtlich der Vermehrungsfähigkeit, der Rezeptor- bzw. Substratspezifität von HA und NA und ihrer Reaktivität gegenüber Komponenten des Immunsystems (Antiseren, NK-Zellen) untersucht.

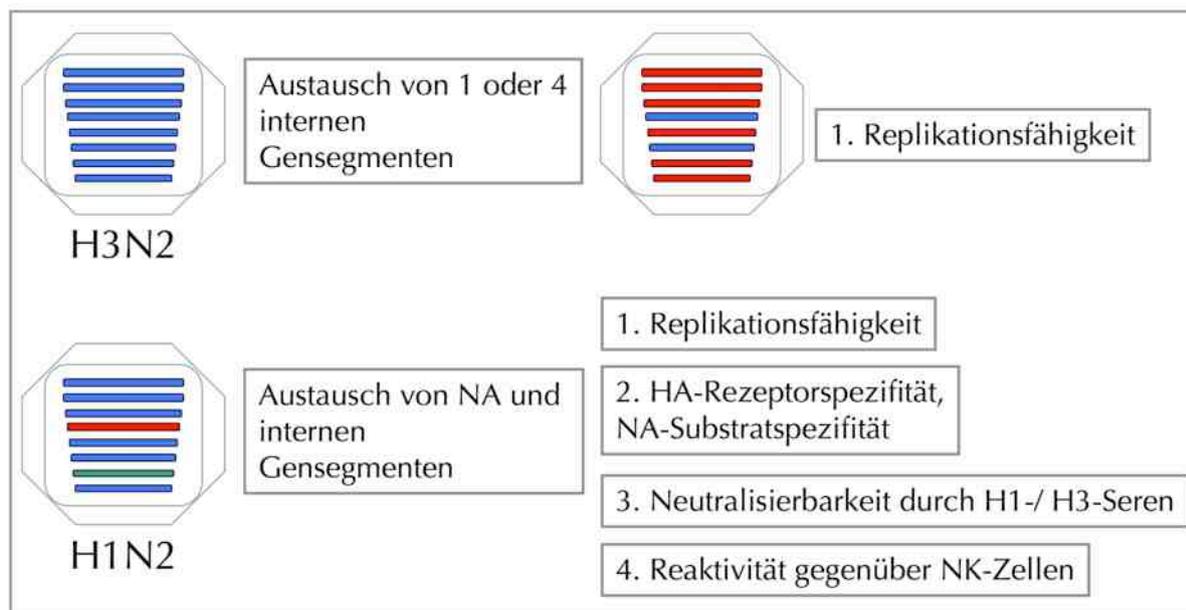


Bild 3.6: **Die Herstellung von H3N2- und H1N2-Reassortanten.** Einzelne Reassortanten der beiden Subtypen wurden nach den angegebenen Kriterien Replikationsfähigkeit, Rezeptorspezifität des Hämagglutinins, Substratspezifität der Neuraminidase, Neutralisierbarkeit durch H1- und H3-Antisera und Reaktivität gegenüber NK-Zellen untersucht.

Die Übersicht 3.7 beschreibt die H3N2-Reassortanten, die im Laufe dieser Arbeit hergestellt wurden und für welche Reassortanten die Gewinnung aus Zellkulturüberständen nicht gelang (2. Teil der Abbildung). Es wurden jeweils mit dem Hintergrund des A/Moscow-Virus und dem des A/Panama-Virus die gleichen Segmente durch A/NewCaledonia ersetzt. Das Schema liest sich mit folgender Legende:

-  repräsentiert den Stamm A/Moscow (M)
-  repräsentiert den Stamm A/Panama (P)
-  repräsentiert den Stamm A/NewCaledonia (NC)

Ausgetauscht wurden die Segmente des Virus A/Moscow bzw. A/Panama entweder durch die einzelnen NP-, M-, NS-Segmente oder den kompletten Polymerasesatz PB2, PB1, PA und NP des A/NewCaledonia-Stammes. Die Bezeichnung der Viren beginnt mit „r“ für rekombinant, gibt zunächst an, welche Segmente ausgetauscht wurden und endet mit der Bezeichnung für das ursprüngliche Virus, wie M für A/Moscow oder P für A/Panama. Die Nummerierung folgt der allgemein für Influenzaviren gültigen Ordnung der Segmente nach ihrer Größe in Basenpaaren: Segment 1 für PB2, Segment 2 für PB1, Segment 3 für PA, Segment 4 für HA, Segment

## Ergebnisse

5 für NP, Segment 6 für NA, Segment 7 für M, Segment 8 für NS. Umrahmte Symbole markieren das jeweils ausgetauschte Segment.

Reassortante	PB1/PB2/PA	HA	NP	NA	M	NS
rNC5-M						
rNC7-M						
rNC8-M						
rNC1/2/3/5-M						
rNC5-P						
rNC7-P						
rNC8-P						
rNC1/2/3/5-P						

rNC1/2/3-M							
rNC1/2/3-P							

Bild 3.7: **Die Reassortanten des Subtyps H3N2.** Das Bild zeigt die Bezeichnung der hergestellten rekombinanten Viren, symbolisiert durch die Zusammensetzung der acht Segmente aus den Stämmen A/Moscow (H3N2), A/Panama (H3N2) und A/NewCaledonia (H1N1) (siehe Legende). Die zwei rot gekennzeichneten Reassortanten rNC1/2/3-M und rNC1/2/3-P konnten nicht gewonnen werden. Umrahmte Symbole markieren das ausgetauschte Segment im Vergleich zum rek A/Moscow-Stamm (Reassortanten 1-4, 9) bzw. zum rek A/Panama-Stamm (Reassortanten 5-8, 10).

Die Gewinnung der Reassortanten glich der bereits beschriebenen Herstellung der „rekombinanten-Wildtyp“-Viren. Die Virustiter wurden nach einmaligem einfrieren bei -80°C per Immunfluoreszenz bestimmt. Die Zusammensetzung der Viren wurde durch Isolierung von RNA aus der Virusprobe, anschließender Amplifikation einzelner Segmente/ -teile und deren Sequenzierung bestätigt.

### 3.3.2 Virus-Reassortanten des Subtyps H1N2

Die Zusammensetzung der H1N2-Viren der Jahre 2001-2003 aus ursprünglich drei verschiedenen Influenzastämmen stellt eine Besonderheit des Virus dar. Daran orientierte sich sowohl die Rekonstruktion des rekombinanten **H1N2-„Referenzvirus“ rNC4-P7-M**, als auch die weiterhin

vorgenommenen Austausch zur Herstellung davon abweichender H1N2-Reassortanten. Das M-Segment zeigte die phylogenetisch größte Übereinstimmung mit dem eines A/Panama-ähnlichen Virus. Diese Besonderheit könnte bedeuten, dass durch Kozirkulation von A/Moscow- und A/Panama-Viren tatsächlich drei Virusstämme an der Entstehung der „Triple-Reassortante“ beteiligt waren. Möglich ist auch die Reassortierung des A/NewCaledonia-HA mit einer A/Moscow-Variante mit A/Panama-ähnlichem M-Segment. Die Frage, ob diese Zusammensetzung aus ursprünglich drei Stämmen einen Vorteil für die Verbreitung des Virus bedeutete, floß in die Herstellung weiterer H1N2-Viren, abweichend vom Referenzvirus rNC4-P7-M mit ein. Neben dem „Referenzvirus“ NC4-P7-M wurden sieben weitere H1N2-Viren erzeugt. Systematisch wurde einmal das NA-Segment als zweites Antikörper-induzierendes Gen durch das Homolog eines anderen H3N2-Stammes, den des A/Panama/2007/99-Virus, ersetzt. Der Austausch des NA-Segments sollte weiterhin untersucht, inwiefern die H1-Hämagglutinine zusammen mit einer N2-Neuraminidase eine grundsätzlich funktionelle Balance der Rezeptor-bindenden bzw. –zerstörenden Aktivitäten von HA und NA bilden können. Hintergrund dieser Frage ist die Spekulation, dass zahlreiche Mutationen der H1-Hämagglutinine in den Jahren 1995-1999 (Gregory, Bennett et al. 2002) die Entstehung von H1N2-Viren deutlich begünstigten bzw. überhaupt erst ermöglichten. Durch drei weitere Reassortanten sollte die Zusammensetzung aus zwei verschiedenen H3N2-Komponenten untersucht werden, indem neben dem M-Segment auch andere interne Segmente ebenfalls durch Homologe des A/Panama-Stammes ersetzt wurden. Somit wurden die Reassortanten der Kombination rNC4-P1/2/3/7-M (Polymerasesegmente + M aus A/Panama), rNC4-5/7-M (NP und M aus A/Panama) und rNC4-7/8-M (NS und M aus A/Panama) erzeugt. Drei weitere Reassortanten wurden hergestellt, um zu untersuchen, ob dem M-Segment eine besondere Bedeutung zuzuordnen ist oder die Verbreitung der H1N2-Viren in dieser Zusammensetzung als eher zufällig anzusehen ist. So wurden ausgehend vom „Referenzvirus“ NC4-P7-M zwei Viren generiert, deren Genom an Stelle des A/Panama-M-Segments homologe Gensegmente der Stämme A/Moscow (rNC4-M) beziehungsweise A/NewCaledonia (rNC4/7-M) trägt. Die Reassortante rNC4-M diente im Vergleich zum „Referenzvirus“ rNC4-P7-M der weiteren Fragestellung, ob die Entstehung und Zirkulation der H1N2-Viren, zumindest theoretisch, ebenso durch Reassortierung eines A/Panama-Virus mit dem H1-HA hätte stattfinden können. So wurde neben rNC4-M auch die Reassortante rNC-4-P generiert. Eine Übersicht der H1N2-Virusreassortanten dieser Arbeit gibt Bild 3.8.

## Ergebnisse

Reassortante	PB1/PB2/PA	HA	NP	NA	M	NS
rNC4-P7-M						
rNC4-P6/7-M						
rNC4-P1/2/3/7-M						
rNC4-P5/7-M						
rNC4-P7/8-M						
rNC4-P						
rNC4-M						
rNC4/7-M						

Bild 3.8: **Die Reassortanten des Subtyps H1N2.** Das Bild zeigt die Bezeichnung der hergestellten rekombinanten H1N2-Viren. Sie tragen als Gemeinsamkeit das H1-HA-Segment des Stammes A/NewCaledonia und das N2-NA-Segment des Stammes A/Moscow, ähnlich den natürlichen H1N2-Isolaten oder das NA-Segment ersetzt durch A/Panama. Die internen Segmente stammen ursprünglich aus H3N2-Viren (A/Moscow oder A/Panama), bei rNC4/7-M ist das M-Segment A/NewCaledonia (H1N1) zuzuordnen. (Symbole siehe Legende) Die grau umrahmten Symbole markieren das ausgetauschte Segment. Mit rotem Rahmen ist das „Referenzvirus“ rNC4-P7-M gekennzeichnet.

### 3.4 Die Replikation der Reassortanten des Subtyps H3N2

Die H3N2-Reassortanten wurden jeweils mit dem rekombinanten Elternvirus verglichen, in dessen „Grundgerüst“ die ausgetauschten A/NewCaledonia Segmente eingefügt wurden. Durch homologe Gensegmente des Stammes A/NewCaledonia wurden, wie unter Punkt 3.2.1 beschrieben, die Segmente fünf (NP), sieben (M) und acht (NS) und eins/ zwei/ drei/ fünf (der komplette Polymerasesatz und NP). Entsprechend ihres Grundgerüsts wurden die fünf Viren in Replikationskinetiken miteinander verglichen. Die Prozedur der Infektion und Probenentnahme gleicht dabei dem unter Punkt 3.1 beschriebenen Verfahren. MDCK II-Zellen wurden mit einer MOI=0,01 infiziert. Nach der Inkubationszeit und anschließendem Waschschrift wurden die Zellen mit TPCK-Trypsin-haltigem Infektionsmedium inkubiert und nach 12/ 24/ 36/ 48 h dem Zellüberstand Proben entnommen und durch Infektionsmedium ersetzt. Die Zugabe des Enzyms wird für die Spaltung des Hämagglutinins und damit zur Ausbildung infektiöser Viruspartikel benötigt. Die Bilder 3.9 A (A/Moscow-Reassortanten) und B (A/Panama-Reassortanten) zeigen das Replikationsverhalten der Reassortanten parallel zu Ihrem jeweiligen „rekombinanten-Wildtyp“-Virus.

## Ergebnisse

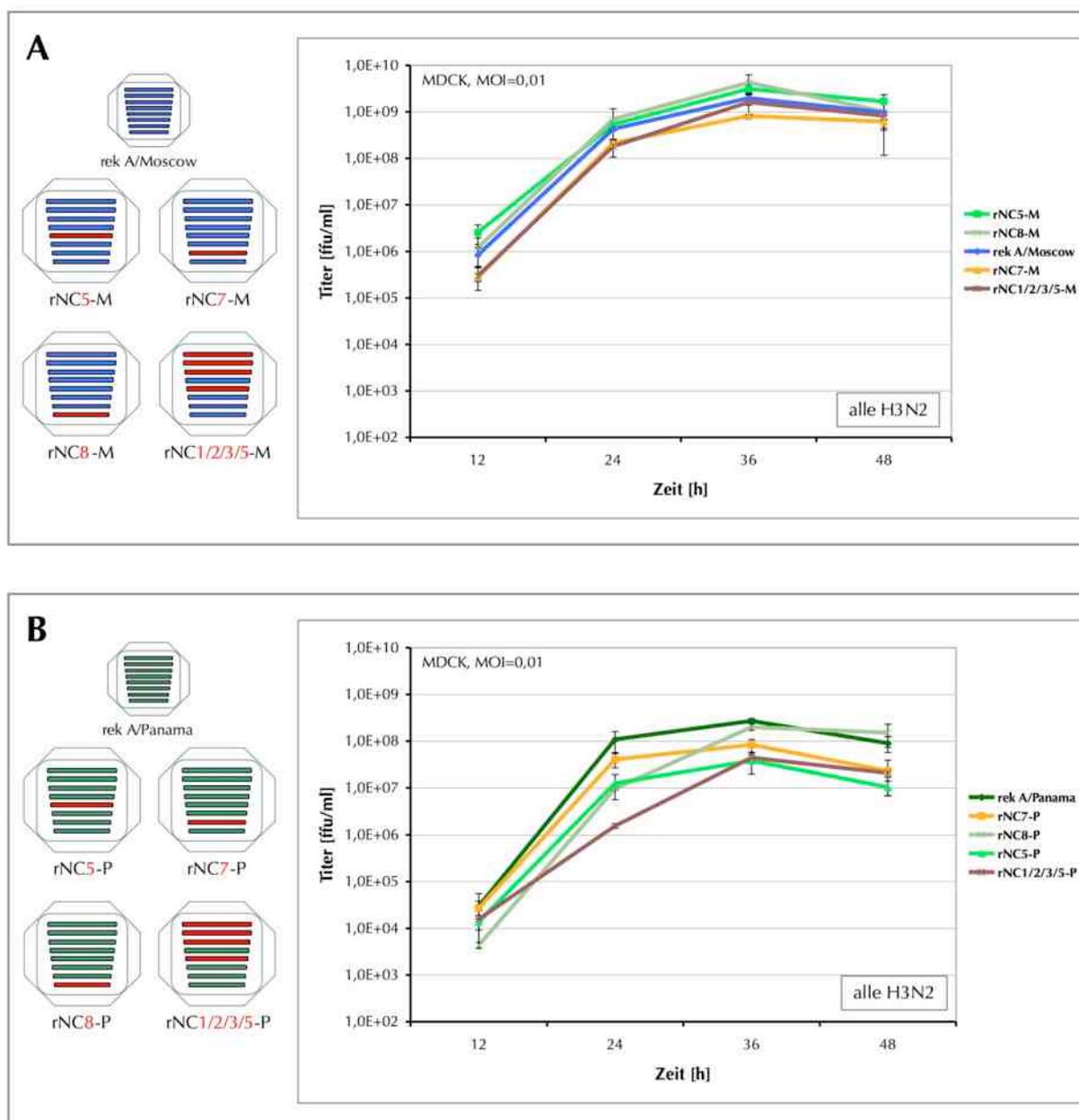


Bild 3.9: Die Replikationskinetiken der Reassortanten des Subtyps H3N2. **A** zeigt das homogene Replikationsverhalten der A/Moscow-Viren mit anteiligen A/NewCaledonia (H1N1)-Segmenten. **B** verdeutlicht das abweichende Replikationsverhalten der A/Panama-A/NewCaledonia-Reassortanten im Vergleich zum rekombinanten Virus A/Panama. Die Replikationskurven zeigen Mittelwerte aus zwei Experimenten, die jeweils in Duplikation durchgeführt wurden. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte STABWN.

Deutlich erkennbar zeigte sich bei dem Vergleich der A/Moscow-Reassortanten zu rek A/Moscow (Bild 3.9 A) ein homogenes Bild des Replikationsverhaltens. Alle acht Segmente des A/NewCaledonia-Stammes sind kompatibel zu den Segmenten des H3N2-Virus. Die Vermehrungsfähigkeit blieb durch das Einkreuzen homologer Gensegmente von A/NewCaledonia unverändert.

Die Segmente des H1N1-Stammes sind ebenfalls funktionell kompatibel zu den Segmenten des H3N2-Stammes A/Panama. Der Einfluss der H1N1-Segmente machte sich hier jedoch durch ein z.T. leicht verzögertes Replikationsverhalten bemerkbar (Bild 3.9 B). Nur leichte Abweichungen waren nach Reassortierung der H1N1-Segmente M und NS (rNC7-P, rNC8-P) zu beobachten. Das Virus rNC8-P erreichte nach 24 h noch einen um eine log-Stufe geringeren Titer als rek A/Panama, die verzögerte Replikation war nach 48 h jedoch angeglichen. Das Virus rNC5-P replizierte gegenüber dem rek A/Panama-Virus eingeschränkt. Die erreichten Höchsttiter des Virus waren im Gegensatz zu rNC8-P auch nach 36 h bzw. 48 h eine log-Stufe niedriger als die des rek A/Panama-Virus. Das aus dem H1N1-Virus abstammende NP-Segment verringerte in diesem Fall also die Replikationsfähigkeit. Die eingeschränkte Replikationsfähigkeit wurde durch einen zusätzlichen Austausch der drei Polymerasesegmente verstärkt. Das Virus rNC1/2/3/5-P zeigte im Vergleich zu rNC5-P eine zusätzliche Verzögerung der Replikation. Es erreichte nach 24 h einen um annähernd 2 log-Stufen, nach 48 h 1 log-Stufe geringeren Titer als das rekombinante A/Panama-Virus. Das Einkreuzen der A/NewCaledonia Polymerase- und NP-Segmente ließ demnach unter Laborbedingungen funktionelle Viren entstehen, deren Fitness jedoch aufgrund verminderter Replikationsfähigkeit eingeschränkt war. Es kann daher vermutet werden, dass aufgrund von Sequenzunterschieden zwischen A/NewCaledonia- und A/Panama-NP-Proteinen, die Bindung des A/NewCaledonia-NP zu A/Panama-Polymeraseproteinen nicht optimal ist. Weiterhin scheinen die RNP-Komplexe der hier getesteten H3N2-Viren eine höhere Replikationsfähigkeit zu vermitteln als entsprechende H1N1-NP- und Polymeraseproteine.

### **3.5 Der Einfluss des Nukleoproteins auf die Replikation vRNA-ähnlicher Reportergerkonstrukte**

Bei der Herstellung von Reassortanten des Subtyps H3N2 wurde versucht, neben Viren, die den Polymerasesatz PB2, PB1, PA sowie das NP-Segment des A/NewCaledonia-Stammes (H1N1) enthielten auch Viren herzustellen, die nur die drei Polymerasesegmente des H1N1-Stammes tragen. Es gelang jedoch auch nach mehrmaliger Wiederholung des Verfahrens nicht, diese Reassortanten zu gewinnen. Um zu testen, ob die NP-Proteine der Stämme A/Moscow und A/Panama (beide H3N2) möglicherweise Einfluss auf die Polymerasefunktion des H1N1-Stammes haben, wurden die Polymerasesegmente des Stammes A/NewCaledonia mit den NP-Segmenten beider H3N2-Stämme in einer Reportergerstudie (siehe 2.2.2.2) getestet.

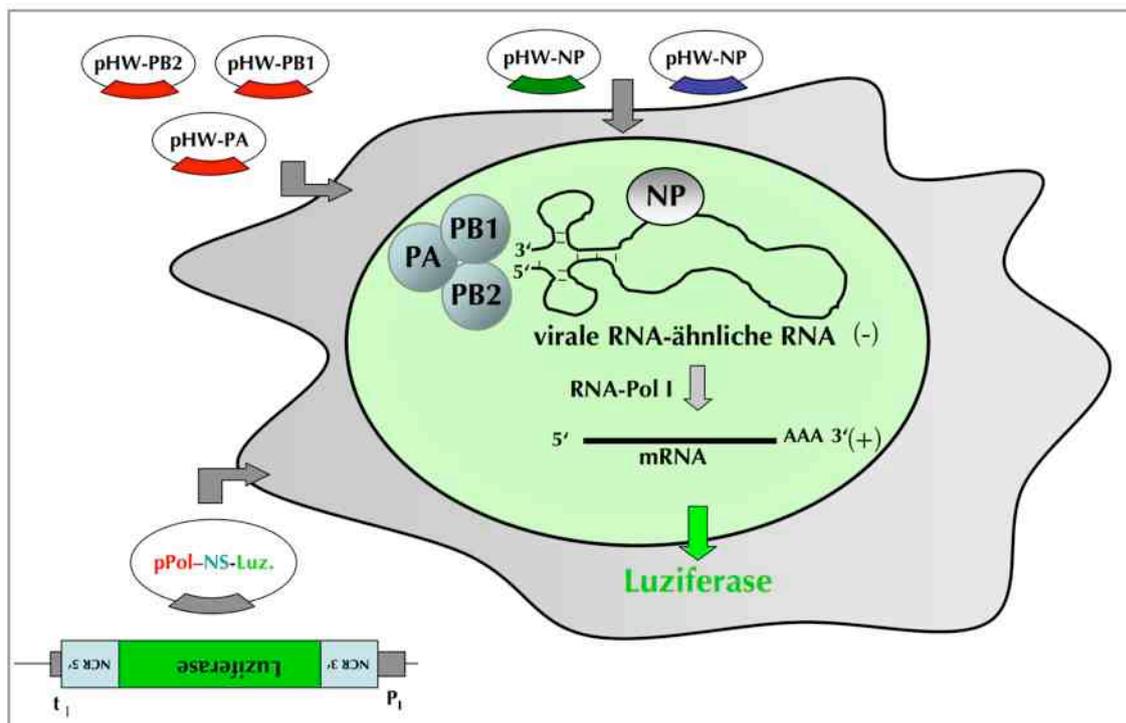


Bild 3.10: **Die Funktionsweise eines Influenza A-Virus „Minireplikons“.** Durch Transfektion der Expressionskonstrukte der Polymeraseproteine und NP zusammen mit dem Reportergenkonstrukt wurde das vRNA-ähnliche Konstrukt durch die exprimierten Proteine in mRNA transkribiert. Das Enzym Luziferase wird durch die Wirtszelle exprimiert und später in einer enzymatischen Reaktion das Substrat Luziferin durch die Luziferase umgesetzt. Dabei wird Lumineszenz freigesetzt. Die relative Luziferaseaktivität wurde über „raw light units“ im Luminometer gemessen.

Um ein vRNA-ähnliches Reportergenkonstrukt zu replizieren benötigt man die drei Polymeraseproteine PB2, PB1 und PA, sowie das Nukleoprotein. Die Funktionsweise des Influenzavirus „Minireplikons“ gibt Bild 3.10 wieder. Die genetische Information (vRNA-ähnliche RNA) liegt entsprechend den Orthomyxoviren in negativer Orientierung vor. Sie enthält an den 3'- und 5'-Enden die nichtkodierenden hochkonservierten *cis*-Signale eines Influenza-Gensegments (z.B. NS-Segment) für die Erkennung und Prozessierung durch die viralen Polymeraseproteine. Für das Experiment wurden HEK-293T-Zellen mit den Expressionskonstrukten pHW-PB2, -PB1, -PA und -NP, sowie dem Reporterkonstrukt pPol I-NS-Luziferase und einem zellulären Kontrollplasmid (pTK-Luziferase aus *Renilla*) transfiziert. Durch die virale Polymerase wurde bei Anwesenheit des NP-Proteins das vRNA-ähnliche Konstrukt über den pPol I-Promotor in mRNA transkribiert und Luziferase durch die Wirtszelle exprimiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit dem Lysis-Puffer des „Dual-Luciferase<sup>TM</sup>“-Systems aufgeschlossen. Im Luminometer wurde dann das Substrat Luziferin in einer enzymatischen Reaktion durch die Luziferase umgesetzt und die freigesetzte Lumineszenz gemessen. Nach dem Stop der Reaktion wurde über ein zweites Substrat zur Normalisierung der Werte die Aktivität der *Renilla*-Luziferase bestimmt. Die substrat-abhängigen Lichtsignale sind ein Maß für die Expression der Reportergenkonstrukte durch die

jeweiligen Polymeraseproteine zusammen mit dem NP-Protein. Bild 3.11 zeigt den Einfluss der beiden H3N2-Nukleoproteine auf die Expression des Reporterplasmids.

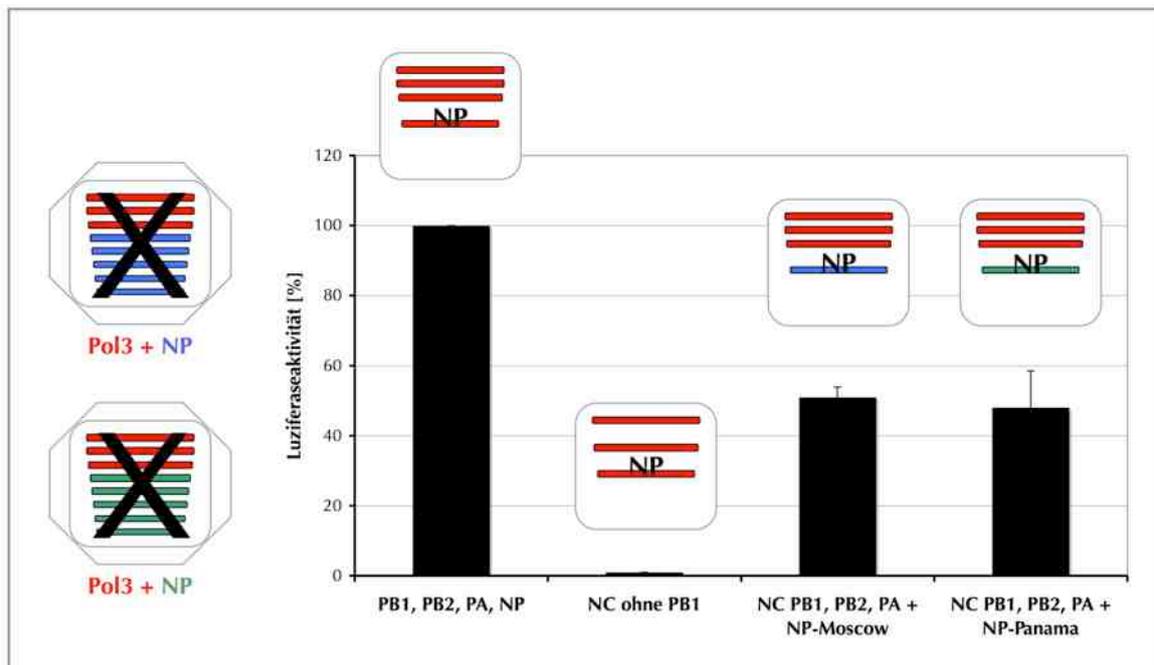


Bild 3.11: **Luziferasereporterexperimente mit Nukleoproteinen der Stämme A/Moscow und A/Panama (beide H3N2).** Gezeigt ist links die Replikation und Expression des Luziferasereportergenkonstrukts durch die drei Polymeraseproteine des Stammes A/NewCaledonia (H1N1) zusammen mit dem A/NewCaledonia-NP (100%). Die relative Luziferaseaktivität beträgt durch den Einfluss des A/Moscow-NP-Proteins nur 51 %. Durch das H3N2-NP des Stammes A/Panama beträgt die Luziferaseaktivität im Vergleich zum A/NewCaledonia-NP nur 48 %. Die Negativkontrolle zeigt die fehlende Aktivität des Polymerasekomplexes ohne die Expression des PB1-Proteins. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Vergleicht man in Bild 3.11 die Luziferaseaktivität bei Ko-Expression der A/NewCaledonia-Polymeraseproteine und A/NewCaledonia-NP mit der Ko-Expression der H3N2-Nukleoproteine, so war diese in beiden Fällen um ca. 50 % (49 % NP-A/Moscow und 52 % NP-A/Panama) eingeschränkt. Die eingeschränkte Kompatibilität zwischen den A/NewCaledonia (H1N1)-Polymeraseproteinen und H3N2-NP-Proteinen könnte, auch wenn sie die Aktivität des Polymerasekomplex nicht vollständig hemmt, die Gewinnung der Reassortanten rNC1/2/3-M und rNC1/2/3-P negativ beeinflusst haben.

### 3.6 Die Replikation der Reassortanten des Subtyps H1N2

Eine der zentralen Fragenstellungen dieser Arbeit bezog sich darauf, welche Eigenschaften der H1N2-Viren deren weltweite Verbreitung begünstigt haben könnten. Dazu wurden die replikativen Eigenschaften eines natürlichen H1N2-Isolates aus dem Jahr 2001/02 mit dem zur gleichen Zeit epidemiologisch als H1-Virus zirkulierenden A/NewCaledonia-ähnlichen H1N1-

Viren verglichen. Durch dieses Experiment sollte untersucht werden, ob H1N2-Viren aufgrund ihrer neuen Segmentkomposition abweichende Replikationseigenschaften zu anderen H1-Viren aufweisen, die ihre Verbreitung begünstigt haben könnten. Da die H1N2-Viren als Reassortanten sieben Segmente von H3N2-Viren umfassen, ist der hohe Verwandtschaftsgrad zu den A/Moscow-ähnlichen Viren ebenfalls von Bedeutung. Aus diesen Gründen wurde vergleichend die Replikation des Wildtyp-Virus A/Sachsen/1816/02 (H1N2), den „rekombinanten-Wildtyp“-Viren rek A/Moscow (H3N2), rek A/NewCaledonia (H1N1) mit dem rekombinanten „Referenzvirus“ rNC4-P7-M (H1N2) untersucht. Bild 3.12 (A) zeigt den zeitlichen Replikationsverlauf.

Die Auswertung dieser Wachstumskurve zeigte zwei bemerkenswerte Beobachtungen. Wildtyp H1N2-Viren verhielten sich ähnlich den H3N2-Viren, replizierten zu sehr hohen Titern und gehörten insgesamt betrachtet zu den (vier) Viren, die innerhalb dieser Arbeit durch Replikation in Zellkultur auf MDCK II-Zellen die höchsten Titer erzielten. Rekombinante rNC4-P7-M-Viren replizierten zu Titern, die 0,5-1,5 log-Stufen unter dem des Wildtyp-Isolates A/Sachsen/1816/02 lagen. Dabei ist zu beachten, dass H1N2-Isolate wenige charakteristische Aminosäureaustausche in den Glykoproteinen Hämagglutinin und Neuraminidase (u.a.) besitzen, die rekombinante H1N2-Viren nicht tragen, da sie aus den Segmenten der „Elternstämme“ hergestellt wurden. Der Sequenzvergleich der entsprechenden H3N2, H1N1 und H1N2-Isolate findet sich im Kapitel 3.1.1. Der Vergleich von WT- und rekombinanten H1N2-Viren ließ vermuten, dass H1N2-spezifische Mutationen eine schnelle Replikation zu hohen Titern begünstigt haben. Da sie auch im Vergleich zu H1N1-Viren zu frühen Zeitpunkten (nach 12 h, 24 h) leicht höhere Titer aufwiesen, könnte diese hohe und effiziente Replikationsfähigkeit zur weiten Verbreitung der H1N2-Viren beigetragen haben.

Ein weiterer Schritt bei der Untersuchung des Replikationsverhaltens von H1N2-Viren stellte die Reassortante rNC4-P6/7-M dar. Bei der Herstellung dieser Viren wurde im Vergleich zum Virus rNC4-P7-M das Segment sechs (NA) des Stammes A/Moscow durch A/Panama ersetzt. Durch diesen Austausch wurde dem Virus eine andere antigenetische Komponente im Vergleich zu den real vorkommenden H1N2-Isolaten zugefügt. Dadurch wurde eine theoretische antigenetische Weiterentwicklung der zirkulierenden Isolate (durch Reassortierung) untersucht. Die Wachstumskurve (Bild 3.12 B) zeigte im Vergleich beider rekombinanter H1N2-Viren, dass das Virus mit dem NA-Panama-Segment rNC4-P6/7-M Titer erreichte, die 0,5-1 log-Stufe über denen des „Referenzvirus“ rNC4-P7-M lagen. Dieses Experiment zeigte, dass das A/NewCaledonia-HA (H1) eine hohe Kompatibilität zum A/Panama-NA (N2) besitzt und diese „Triple-Reassortante“ (zusammengesetzt aus Segmenten dreier Stämme) zu sehr hohen Titern replizierte. Es zeigte weiterhin, dass durch Rekombination, beispielsweise den Austausch von

## Ergebnisse

Glykoproteinen zwischen parallel zirkulierenden humanpathogenen Viren, Reassortanten entstehen können, die eine höhere Replikationsfähigkeit besitzen auch wenn sie aus unterschiedlichen Virussubtypen stammen. Es können somit auch ohne das Einkreuzen von Segmenten aus Viren fremder Spezies (aviärer oder porciner Viren) Reassortanten entstehen, die ein höheres Infektionspotential besitzen als ihre „Elternstämme“.

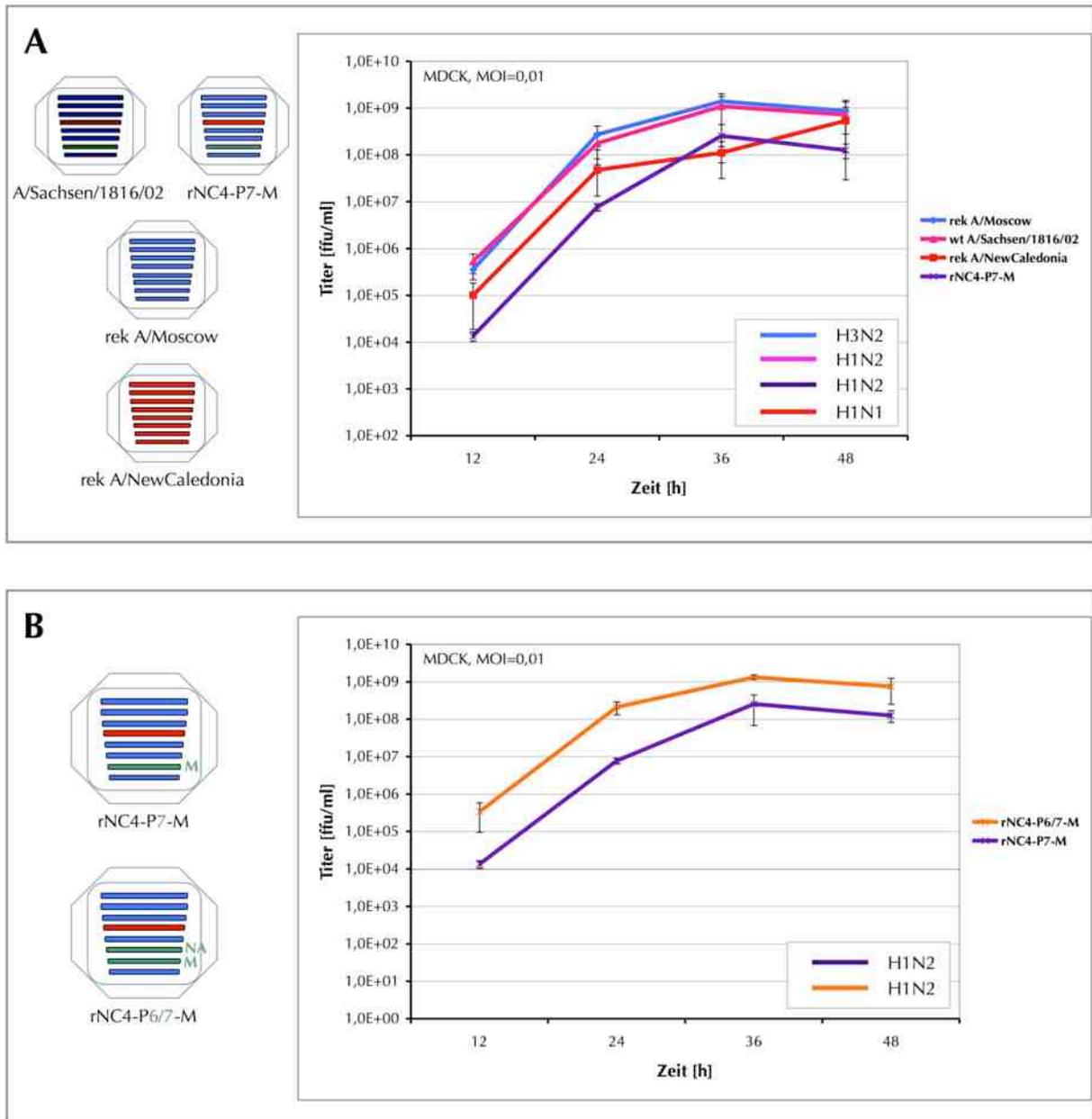


Bild 3.12: **Replikationsverhalten von Wildtyp- und rekombinanten H1N2-Viren.** **A** Das Wildtyp-Isolat A/Sachsen/1816/02 (H1N2) zeigt einen Replikationsverlauf, der dem rekombinanten A/Moscow-Virus (H3N2) sehr ähnelt. Das rekombinante Virus rNC4-P7-M repliziert ähnlich dem H1N1-Virus A/NewCaledonia. **B** Der Austausch des NA-Segments A/Moscow durch A/Panama erhöht die Replikation des Virus rNC4-P6/7-M im Vergleich zu rNC4-P7-M signifikant um 0,5-1 log-Sufe und erreicht ähnlich dem Wt H1N2-Isolat (A) schon nach 24 h Titer von  $1 \times 10^8$  ffu/ml. Alle Viren erreichen sehr hohe Endtiter von  $5 \times 10^7$  bis  $1 \times 10^9$  ffu/ml. Die Replikationskurven zeigen Mittelwerte aus zwei Experimenten, die jeweils in Doppelbestimmung angefertigt wurden. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte STABWN.

## Ergebnisse

Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit war, ob dem hohen Identitätsgrad der M-Segmente zwischen den H1N2-Isolaten und des Stammes A/Panama (H3N2) eine besondere Bedeutung zukommt, während alle anderen internen Segmente dem Stamm A/Moscow entsprechen. Konnten sich die H1N2-Viren zufällig in dieser genetischen Komposition durchsetzen oder verschaffte die Zusammensetzung dem Virus replikative Vorteile? Um der Frage nachzugehen, wurde das M-Segment des Stammes A/Panama durch die Segmente A/Moscow und A/NewCaledonia innerhalb des rekombinanten H1N2-„Referenzvirus“ ersetzt. Dadurch entstand zum einen das Virus rNC4-M, ein H1N2-Virus mit einem rein auf A/Moscow-basierenden Hintergrund. Zum anderen wurde eine Reassortante hergestellt und untersucht, die das M-Segment des Stammes A/NewCaledonia enthält. Bild 3.13 zeigt die entsprechenden Replikationskurven.

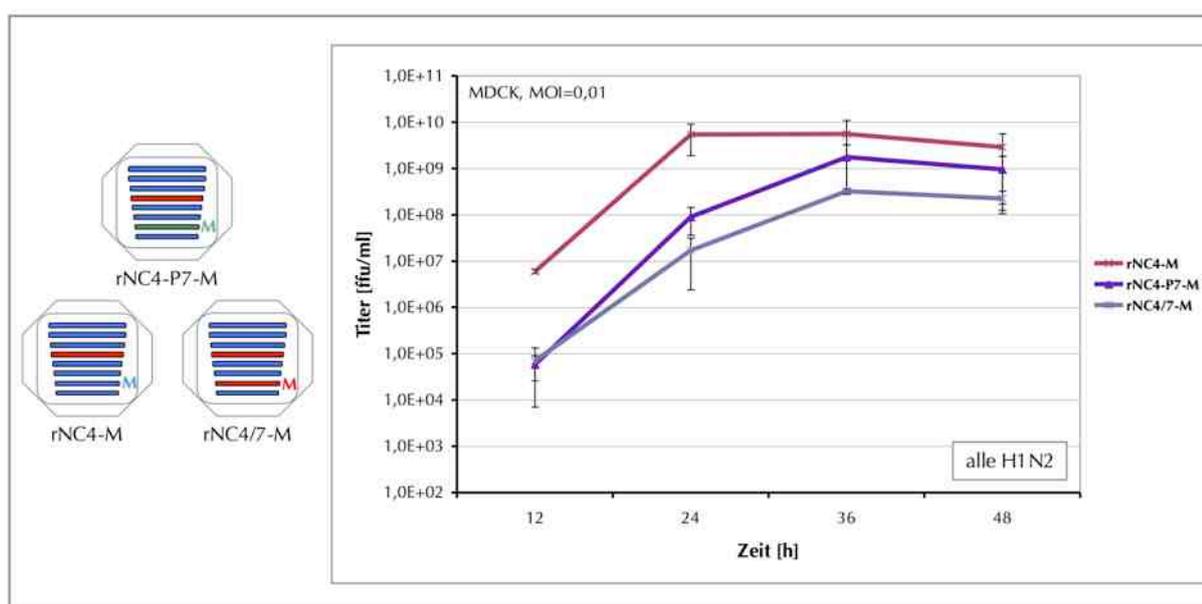


Bild 3.13: **Die Bedeutung des M-Segments innerhalb des rekombinanten H1N2-Virus.** Das rekombinante Virus rNC4-M repliziert im Vergleich zu rNC4-P7-M deutlich schneller. Nach 24 h liegen die Titer dieses Virus 1,5-2 log-Stufen über den Titern des Virus rNC4-P7-M. Viren, die das M-Segment des Stammes H1N1 enthalten, zeigen ein leicht verzögertes Wachstum. Deren Endtiter liegen ca. 0,5 log-Stufen unter denen des Virus rNC4-P7-M. Die Replikationskurven zeigen Mittelwerte aus zwei Experimenten, die jeweils in Doppelbestimmung angefertigt wurden. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte STABWN.

Die Vermehrungskurven zeigten, dass weder das M-Segment des Stammes A/Panama, noch das M-Segment des Stammes A/NewCaledonia dem H1N2-Virus zu schnellerem Wachstum oder höheren Titern in Zellkultur verhalfen. Der Austausch des A/Panama-M-Segments durch das Homolog von A/Moscow führte zu einem H1N2-Virus mit einem reinen A/Moscow-„Hintergrund“. Im Vergleich zum „Referenzvirus“ rNC4-P7-M lag deren Titer nach 24 h 1,8 Log-Stufen höher. Im Vergleich zu Virusreassortanten, die das M-Segment des Stammes A/NewCaledonia beinhalteten, zeigte sich, dass der rein H3N2-basierte Hintergrund des

## Ergebnisse

---

H1N2-Virus geringe replikative Vorteile (bis zu 0,5 log) gegenüber der Kombination HA+M aus H1N1 besaß. Zumindest auf Replikationsebene war kein Vorteil durch das M-A/Panama gegenüber dem Segment aus A/Moscow erkennbar. Anhand dieser Daten ist die Zusammensetzung der zirkulierenden H1N2-Isolate, abstammend von drei parental Stämmen, vermutlich als zufällig anzusehen. Grundsätzlich könnte sich diese Zusammensetzung jedoch auch auf andere Pathogenitätsfaktoren, beispielsweise die Transmissionsfähigkeit der Viren auswirken.

Der Vergleich der Vermehrungsfähigkeit eines rekombinanten H1N2-Virus mit rein auf A/Moscow basierendem Hintergrund (rNC4-M) mit dem „Referenzvirus rNC4-P7-M, zeigte die Fähigkeit dieser Viren zu höheren Titern zu replizieren. Abweichend davon sollte ebenfalls untersucht werden, ob die hypothetische Entstehung und Verbreitung von H1N2-Viren im Hintergrund des Stammes A/Panama (rNC4-P) ebenso möglich gewesen wäre. Es wurden daher Reassortanten generiert, die sieben Segmente des Stammes A/Panama und das H1-HA aus A/NewCaledonia enthalten. Um die Frage zu beantworten, ob eine Entstehung dieser Viren überhaupt möglich gewesen wäre, müssten genauere epidemiologische Daten aus der Entstehungsregion der H1N2-Viren vorliegen. Die Replikationskurven, gezeigt in Bild 3.14, gaben jedoch erste Hinweise auf eine verringerte Replikationsfähigkeit solcher Viren im Vergleich zum „Referenzvirus“ rNC4-P7-M und dem Virus rNC4-M. Aufgrund der deutlich geringeren Replikationsfähigkeit des Virus rNC4-P kann davon ausgegangen werden, dass sich selbst unter entsprechenden Voraussetzungen (Ko-Zirkulation von A/NewCaledonia/20/99 und A/Panama/2007/99, gleichzeitige Infektion eines Wirtes) rNC4-P-ähnliche Viren sich kaum hätten durchsetzen können, da sich neue Stämme nur dann weit verbreiten, wenn ihre Replikations- und Transmissionseigenschaften mindestens denen der „Elternviren“ entsprechen bzw. ihr pathogenes Potential erhöht ist.

## Ergebnisse

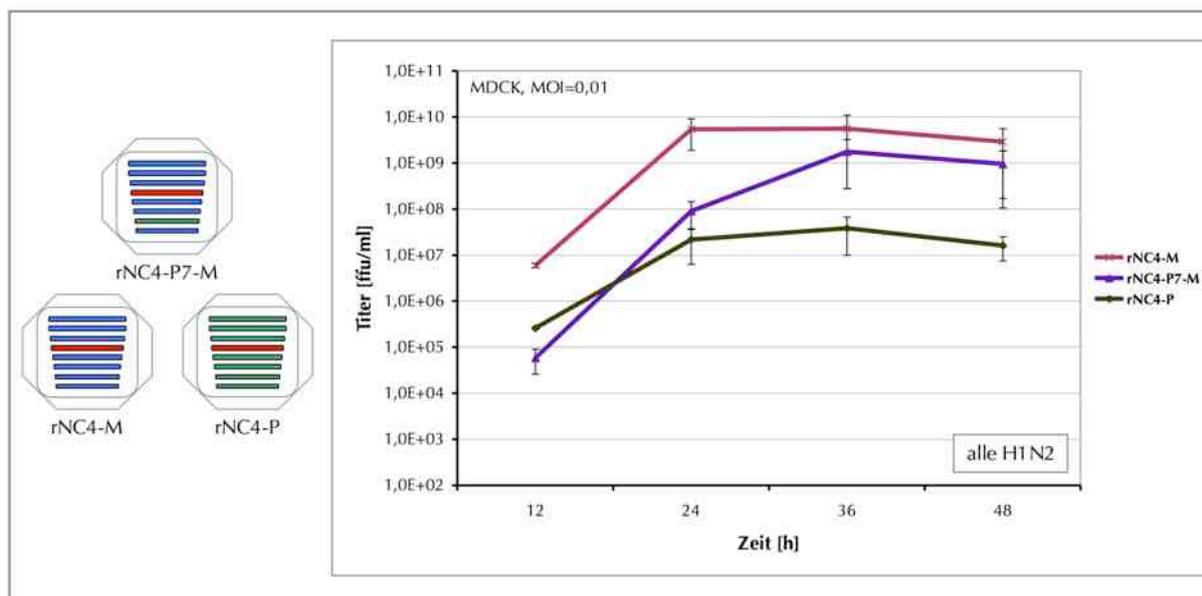


Bild 3.14: **Die Replikation rekombinanter H1N2-Viren mit dem Hintergrund A/Moscow beziehungsweise A/Panama.** Ersetzt man die Kombination des H1-Hämagglutinins mit A/Moscow durch A/Panama, so ist deutlich die eingeschränkte Replikationsfähigkeit um bis zu 2 log-Stufen verglichen mit rNC4-M, bis zu 1,5 log-Stufen verglichen mit rNC4-P7-M erkennbar. Das Virus rNC4-P mit Endtitern bis ca.  $6 \times 10^7$  ist eingeschränkt replikationsfähig und die Segmente HA-A/NewCaledonia mit dem NA-A/Panama jedoch zueinander kompatibel. Die Replikationskurven zeigen Mittelwerte aus zwei Experimenten, die jeweils in Doppelbestimmung angefertigt wurden. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte STABWN.

Eine der zentralen Fragen dieser Arbeit war, herauszufinden, ob die spezifische Komposition der WT H1N2-Viren aus drei parentalen Stämmen für die Verbreitung dieser Viren von Vorteil war. Möglich wäre ebenso, dass diese Komposition der H1N2-Viren auf ein zufälliges Ereignis zurückgeht, das gegenüber der Rekombination von nur zwei „Elternstämmen“ keine Vorteile bezüglich ihrer Verbreitung bedeutete. Hinweise für die Beantwortung dieser Fragen sollten vergleichende Replikationskurven mit verschiedenartig zusammengesetzten rekombinanten H1N2-Viren liefern. Dazu wurde unter Punkt 3.5, Bild 3.13 bereits der Frage nach der Bedeutung des A/Panama-M-Segments der WT H1N2-Isolate nachgegangen. Durch das Ersetzen des A/Panama-M-Segments durch das Homolog des Stammes A/Moscow (H3N2) replizierte die Reassortante rNC4-M zu deutlich höheren Titern als das „Referenzvirus“ rNC4-P7-M. Die Eigenschaft der Virus-Reassortante rNC4-M ließ vermuten, dass das A/Panama-M Segment rekombinanten H1N2-Viren keinen Replikationsvorteil verleiht. Bei den theoretischen Überlegungen zur Beantwortung dieser Frage wurde eine weitere Serie von H1N2-Viren hergestellt, indem ausgehend vom „Referenzvirus“ rNC4-P7-M weitere Segmente (neben dem M-Segment) durch Homologe des Stammes A/Panama ersetzt wurden. Diese Viren enthielten die Segmente M+NS (rNC4-P7/8-M), NP+M (rNC4-P5/7-M) bzw. die Segmente PB2/PB1/PA+M (rNC4-P1/2/3/7-M) des Stammes A/Panama. Ihre Replikationseigenschaften wurden mit dem „Referenzvirus“ rNC4-P7-M verglichen (Bild 3.15). Das Replikationsverhalten dieser H1N2-Viren

## Ergebnisse

lässt keinen signifikanten Einfluss der zusätzlichen A/Panama-Segmente erkennen. Der Austausch weiterer interner A/Moscow-Segmente durch den Stamm A/Panama veränderte die Replikationseigenschaften des „Referenzvirus“ nicht. Damit erhärtete sich die Vermutung, dass die Zusammensetzung von WT H1N2-Isolaten aus drei parentalen Stämmen auf ein zufälliges Ereignis zurückgeht und nicht unmittelbar deren Verbreitung beitrug.

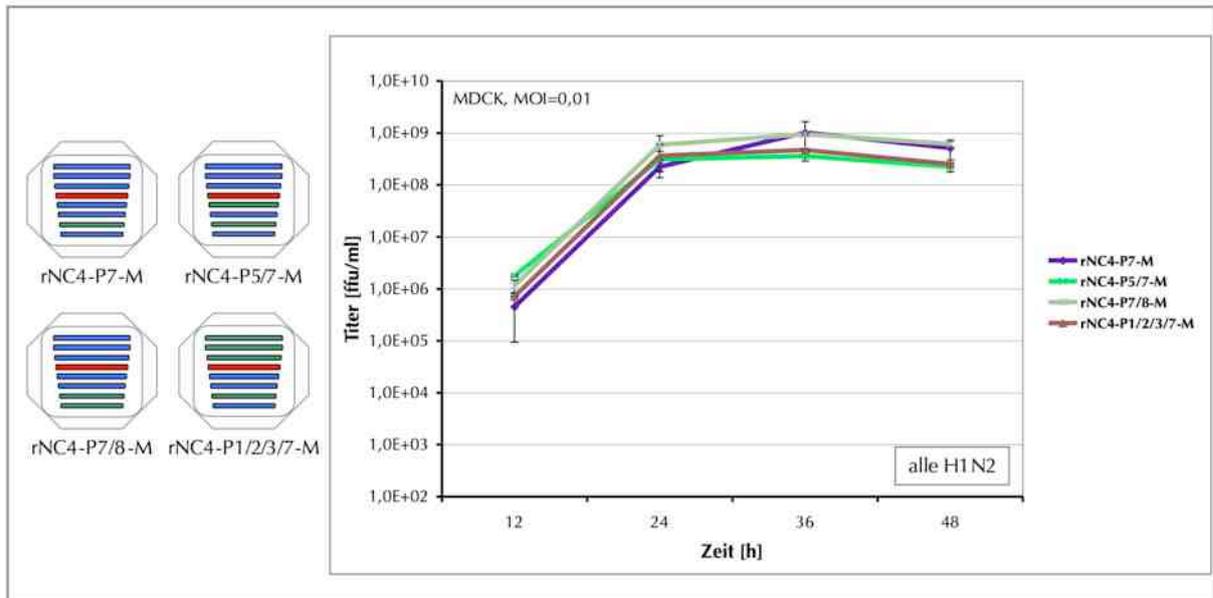


Bild 3.15: **Das Replikationsverhalten von H1N2-Reassortanten mit weiteren Segmenten des Stammes A/Panama.** Anhand der Replikationskurve sind keine Abweichungen vom Verhalten des Virus rNC4-P7-M durch das Einfügen der Segmente A/Panama-NP, -NS oder -PB2/PB1/PA erkennbar. Die Replikationskurven zeigen Mittelwerte aus zwei Experimenten, die jeweils in Doppelbestimmung angefertigt wurden. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte STABWN.

Zusammenfassend lassen sich die Replikationseigenschaften der WT H1N2-Viren (am Beispiel A/Sachsen/1816/02) und der rekombinanten H1N2-Viren folgendermaßen beschreiben: Alle H1N2-Viren replizierten effizient und zu hohen, im Fall des WT H1N2-Isolates sogar zu den höchsten erreichten Titern innerhalb dieser Arbeit. Zwei Segmente bewirkten nach Einführung eine deutliche Erhöhung und Beschleunigung der erreichten Replikationstiter verglichen mit dem rekombinanten „Referenzvirus“ rNC4-P7-M: das M-Segment des A/Moscow-Stammes und das Ersetzen des NA-Segments von A/Moscow durch A/Panama. Dennoch wurden solche Virusreassortanten unter natürlichen Bedingungen bislang nicht isoliert. Generell kann festgehalten werden, dass H1N2-Viren trotz des H1-HAs eher den Replikationseigenschaften der H3N2-A/Moscow Viren ähnelten. Die Viren mit den höchsten Replikationstitern in Zellkultur waren: A/Moscow/10/99 (H3N2), A/Panama/2007/99 (H3N2), A/Sachsen/1816/02 (H1N2), rNC4-P6/7-M (H1N2) und rNC4-M (H1N2). Keines der beiden rekombinanten H1N2-Viren erreichte jedoch höhere Titer als das WT H1N2-Isolat A/Sachsen/1816/02. Das WT H1N2-Isolat verfügte

demnach über optimale Replikationseigenschaften und hatte dadurch gute Grundvoraussetzungen für eine geografisch weite Zirkulation und Verbreitung.

### 3.7 Zeitliche Expressionsanalyse von Virusproteinen der Wildtyp- und rekombinanten H1N2-Viren und der „Elternstämme“

Um einschätzen zu können, ob Unterschiede im Replikationsverhalten der Viren auf Unterschiede in der Proteinexpression zurückzuführen waren, wurde die zelluläre Expression einzelner Virusproteine untersucht. Dazu wurden MDCK II-Zellen mit einer MOI=1 (in 35 mm-Kalotten) mit Wildtyp-Viren der Stämme A/NewCaledonia/20/99 (H1N1), A/Moscow/10/99 und A/Panama/2007/99 (beide H3N2), A/Sachsen/1816/02 (H1N2) und den beiden rekombinanten H1N2-Viren rNC4-P7-M und rNC4-P6/7-M infiziert. Nach 4/6/8 h wurden die Zellen mit RIPA-Puffer lysiert und nach Inkubation auf Eis die Proteinüberstände durch Zentrifugation gewonnen. Die Zelllysate wurden mit 2-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer versetzt, anschließend in flüssigem Stickstoff bei -172°C schockgefroren und bei -20 °C gelagert. Vor dem Auftragen auf SDS-Gele wurden die Proben bei 95 °C denaturiert und gleiche Probenvolumen anschließend aufgetrennt. Nach der Trennung der Proteine wurden diese auf Nitrozellulosemembranen transferiert, unspezifische Antikörper-Bindungsstellen blockiert und die Membran anschließend mit den Antikörpern  $\alpha$ -PB1,  $\alpha$ -NP,  $\alpha$ -M1,  $\alpha$ -NS1 und  $\alpha$ -Tubulin inkubiert. Bild 3.16 zeigt den Nachweis des Polymeraseproteins PB1, des Nukleoproteins NP, des Matrixproteins M1 und des Nichtstrukturproteins NS1 für die fünf Virusstämme im zeitlichen Verlauf.

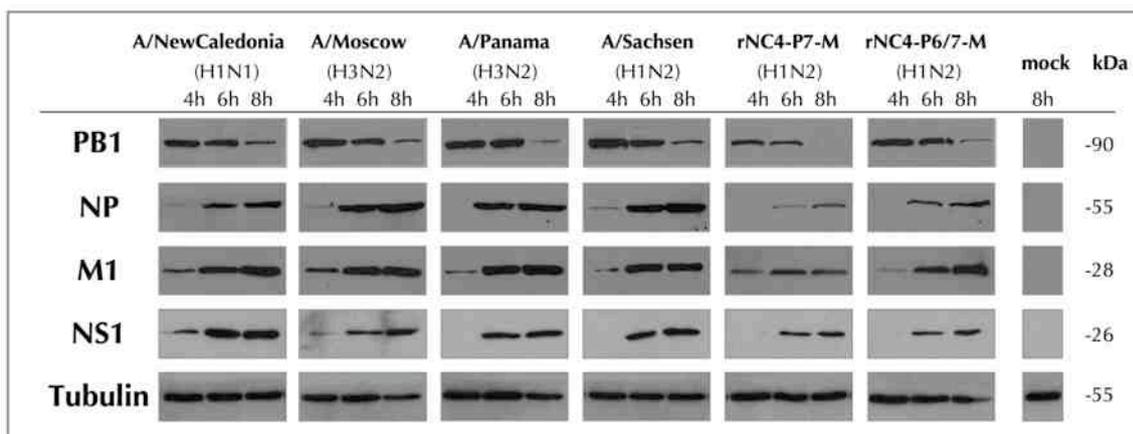


Bild 3.16: **Kinetik der Expression viraler Proteine von H1N1-, H3N2- und H1N2-Viren.** Lysate infizierter MDCK-Zellen (MOI=1) wurden nach angegebenen Zeitpunkten angefertigt und je 25  $\mu$ l der 1:1 mit Probenpuffer versetzten Lysate per 12,5 % SDS-PAGE aufgetrennt. Als Primärantikörper wurden  $\alpha$ -PB1, Ziege 1:50;  $\alpha$ -NP, Maus, 1:1000;  $\alpha$ -M 1:50, Maus;  $\alpha$ -NS1, Kaninchen 1:750 eingesetzt. Sekundärantikörper ( $\alpha$ -mouse und  $\alpha$ -rabbit bzw.  $\alpha$ -Ziege) wurden 1:20000, ebenso wie die Primärantikörper in 0,5 % MMP/TBST verdünnt. Als Expressionskontrolle wurde der Nachweis von zellulärem Tubulin ( $\alpha$ -DM1  $\alpha$ -Tubulin, 1:10000) verwendet.

Der Nachweis viraler Proteine im Western Blot zeigte nur geringfügige Unterschiede der viralen Expressionslevel zwischen den vier WT Viren und dem rekombinanten H1N2-Virus rNC4-P6/7-M. Bei allen sechs Viren waren die viralen Proteine PB1, NP, M1 und NS1 vier bis sechs Stunden nach der Infektion nachweisbar. Die Expression der viralen Proteine stieg im zeitlichen Verlauf an. Eine Ausnahme hierbei war das „rekombinante Referenzvirus“ (rNC4-P7-M). Die Expressionskontrolle, zelluläres Tubulin, wurde bei allen Viren gleichbleibend exprimiert. Das NS1-Protein der beiden WT-Isolate A/Caledonia/20/99 und A/Moscow/10/99 war schon nach 2 h nachweisbar. Deutliche Unterschiede zeigte jedoch der direkte Vergleich zwischen dem WT H1N2-Isolat A/Sachsen/1816/02 und dessen rekombinantem „Referenzvirus“ rNC4-P7-M. Die Expression von drei viralen Proteinen (PB1, NP und M1) war beim rekombinanten Virus rNC4-P7-M im Vergleich zum Wildtyp deutlich schwächer. Das vierte Protein, das Nichtstrukturprotein NS1, wurde leicht vermindert exprimiert. Das Matrixprotein zeigte im zeitlichen Verlauf weiterhin gleichbleibende, jedoch keine ansteigenden Expressionslevel. Die in Bild 3.12 A gezeigte Replikationskurve zeigt eine verzögerte Replikation des rekombinanten H1N2-„Referenzvirus“ im Vergleich zum natürlichen H1N2-Wildtypstamm. Die Replikationstiter des rekombinanten Virus waren 0,5-1,5 log-Stufen niedriger als die des Wildtyps. Damit korrelierte die schwächere Expression viraler Proteine des „Referenzvirus“ mit der verminderten Replikationsfähigkeit gegenüber dem Wildtyp. Das zweite rekombinante H1N2-Virus, rNC4-P6/7-M zeigte ebenfalls eine verminderte Expression des NP-Proteins. Diese korrelierte jedoch nicht mit einer verminderten Replikationsfähigkeit gegenüber dem WT H1N2-Isolat. Die Spezifität des anti-NP-Antikörpers sollte jedoch, da der Proteinnachweis bei den WT-Viren A/Moscow/10/99 und A/Sachsen/1816/02 gelang, unverändert sein.

### **3.8 Studien zur Rezeptoraffinität des Hämagglutinins und der Substratspezifität der Neuraminidase**

#### **3.8.1 Rezeptoraffinität des HA von H1N1, H3N2 und H1N2-Viren (ab 1999)**

Ein wesentlicher Faktor, der die Pathogenität von Influenzaviren beeinflusst, ist die Fähigkeit an spezifische Rezeptoren der Wirtszellen zu binden. Diese Rezeptoren vermitteln wirtsspezifisch den Zugang des Virus in die Wirtszelle durch Sialinsäuren auf ihrer Oberfläche, die vom viralen Hämagglutinin erkannt werden. Die Rezeptoren der Wirtszelle bestehen aus Zuckermolekülen (Galaktose), die über das C3- oder C6-Molekül des Zuckers mit der Sialinsäure verknüpft sind ( $\alpha 2,3 = 3'$ -Rezeptor oder  $\alpha 2,6 = 6'$ -Rezeptor) (siehe 1.5). Humanpathogene Influenza A-Viren binden bevorzugt an 6'SLN (6'-Sialyl-N-azetyl-Laktosamin), einen  $\alpha 2,6$ -gebundenen Sia-

## Ergebnisse

linsäurerezeptor. Sie zeigen generell nur eine sehr schwache Bindung an 3'SLN oder andere 3'-Rezeptoren wie 3'SL (Gambaryan, Piskarev et al. 1995). Um zu bestätigen, dass die rekombinanten Viren, ebenso wie die entsprechenden Wildtyp-Isolate keine Abweichungen zu diesem Bindungsmuster zeigen und um erstmalig auch die Bindungsfähigkeit von H1N2-Viren an 6'-gebundene Rezeptoren zu testen, wurden HA-Rezeptorbindungsstudien durchgeführt. Hierfür wurden „Festphasenassays“ mit Analoga natürlicher Rezeptoren (synthetischen Sialooligosacchariden) verwendet (Mochalova, Gambaryan et al. 2003).

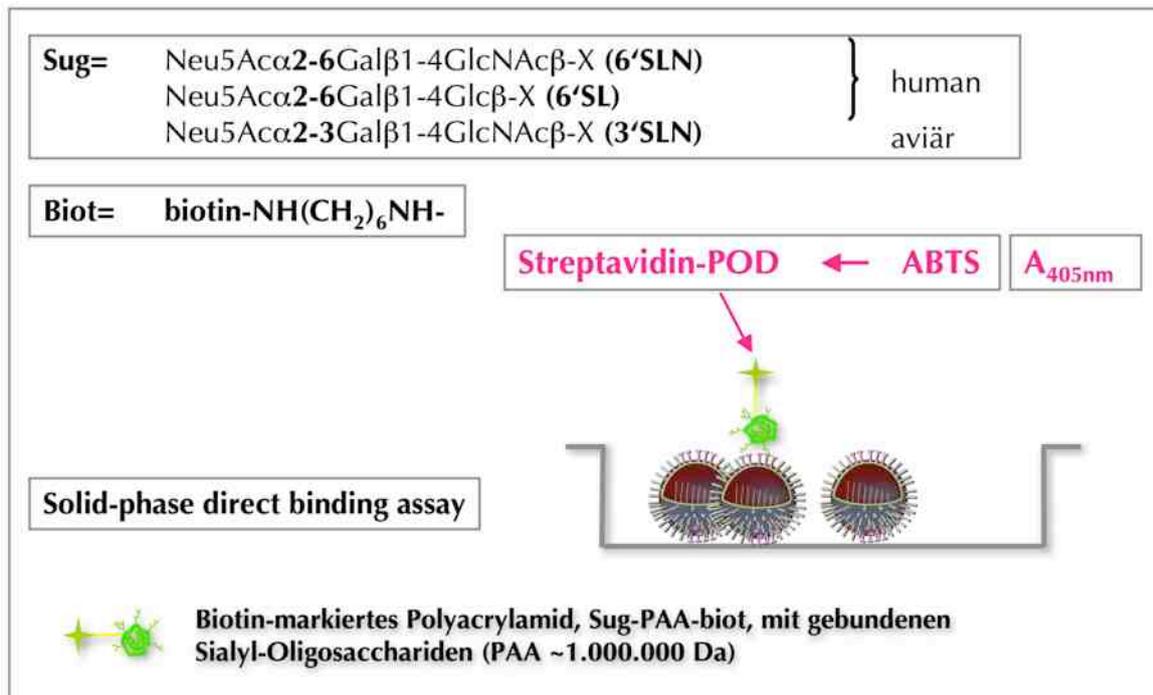


Bild 3.17: Schema des HA-Festphasen-Assays.

Dazu wurden die zu testenden Viren zunächst durch Ultrazentrifugation über Sucrosekissen gereinigt und anschließend als Glycerolstocks (50 % Glycerol in TN-Puffer) bei -20°C gelagert und verwendet. Es wurden je 16 hämagglutinierende Einheiten (HAU) eines Virus auf Platten im 96-Kalottenformat geschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dann wurden biotinylierte Sialooligosaccharide definierter Konzentration (in TN-Puffer) in Zweischnittverdünnungen zugefügt. Daraufhin wurde Streptavidin, welches an Peroxidase gebunden ist und an Biotin bindet zugegeben. Anschließend wurde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-haltiges Substrat (ABTS) zugegeben. Die Peroxidase bewirkt eine Oxidation des ABTS. Dadurch kommt es zu einem Farbumschlag nach grün, der nach ca. 15 minütiger Inkubationszeit photometrisch bei 405 nm im ELISA-Reader quantifiziert wurde. Der Puffer, in dem die Sialooligosaccharide verdünnt wurden, enthielt einen Neuraminidase-Inhibitor (Oseltamivir), um einen Einfluss der viralen Neuraminidase innerhalb des Experiments auszuschließen. Die Affinitätskonstante (K<sub>aff</sub>) wurde bestimmt als Sialinsäurekonzen-

## Ergebnisse

tation am Punkt des halben Absorptionsmaximums ( $A_{\max}/2$ ) in Scatchard Plots. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind zusammenfassend in Bild 3.18 dargestellt.

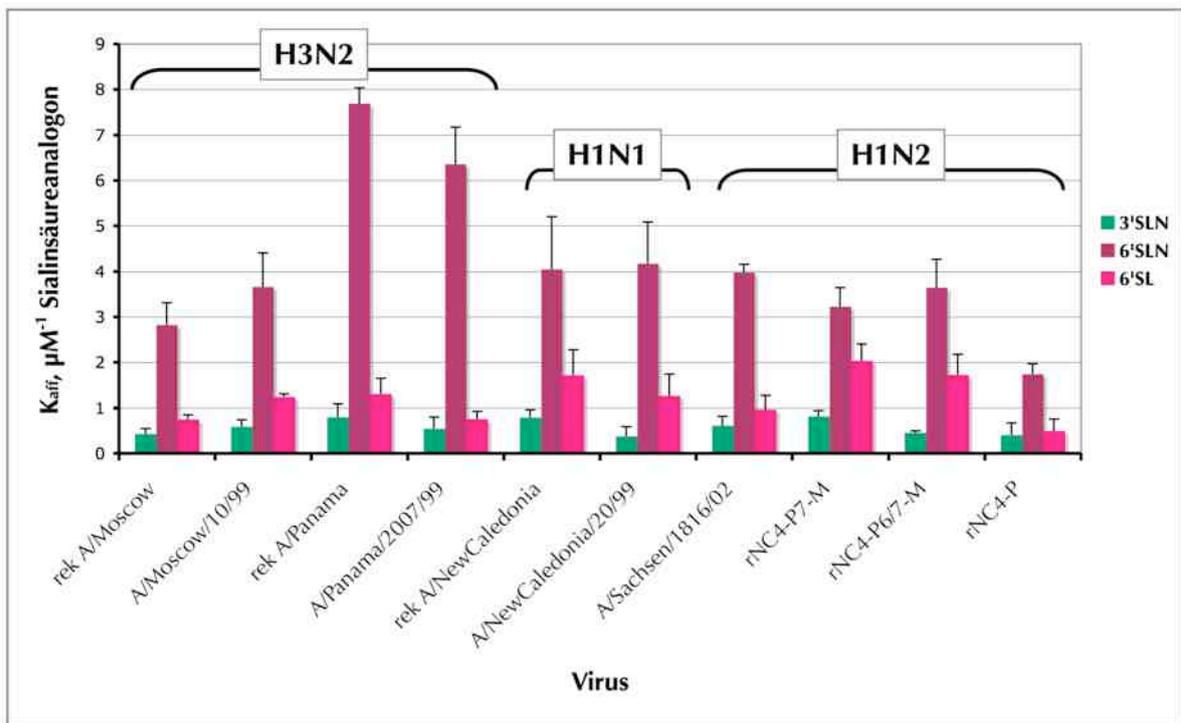


Bild 3.18: **Rezeptorbindungsaffinität der HA-Proteine humanpathogener Influenza A-Viren.** Gezeigt ist die Bindungsaktivität des Hämagglutinins von rekombinanten- und Wildtyp-Viren der Stämme A/Moscow/10/99, A/Panama/2007/99 (H3N2), A/NewCaledonia/20/99 (H1N1), A/Sachsen/1816/02, rNC4-P7-M, rNC4-P6/7-M und rNC4-P (H1N2) an das Sialooligosaccharid 3'SLN (grün), an das bevorzugt aviäre Viren binden und die humanen Rezeptoranaloga 6'SLN (magenta) und 6'SL (pink). Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte STABWN.

Jedes der getesteten Viren zeigte das typische Bindungsmuster eines Hämagglutinins humanpathogener Viren an gegenüber den drei Rezeptoranaloga: Alle Viren zeigten nur eine sehr geringe Affinität zu dem aviären Rezeptoranaloga 3'SLN, die stärkste Bindung erfolgte an das Rezeptoranaloga 6'SLN und eine sehr viel schwächere Affinität war bezüglich des Rezeptors 6'SL messbar. Auch die getesteten WT- und rek H1N2-Viren entsprachen diesem Bindungsmuster. Die rekombinanten Stämme verhielten sich ähnlich den Wildtyp-Isolaten. Geringfügige Abweichungen, z.B. eine leicht erhöhte Bindung des rekombinanten A/Moscow-Virus im Vergleich zu A/Moscow/10/99 an den Rezeptor 6'SL waren aufgrund der Diversität einzelner Messergebnisse nicht signifikant. Das Wildtyp-Isolat A/Sachsen/1816/02 (H1N2) zeigte eine große Ähnlichkeit zum Bindungsverhalten des Virus A/NewCaledonia/20/99, so dass abweichende Eigenschaften, wie z.B. schnellere Replikation zu höheren Titern nicht auf eine veränderte Bindungsaffinität des Hämagglutinins zurückzuführen sind. Auch die rekombinanten H1N2-Viren zeigten keine deutlichen Unterschiede im Bindungsverhalten verglichen zu H1N1-Viren. Das rekombinante H1N2-„Referenzvirus“ rNC4-P7-M zeigte unter den getesteten

Viren die höchste Affinität zum Rezeptor 6'SL. Das Virus rNC4-P wies unter allen getesteten Viren die schwächste Bindung gegenüber allen drei Rezeptoranalogs auf. Diese Eigenschaft korrelierte mit dem Replikationsverhalten der Reassortante, die im Vergleich aller H1N2-Viren bzw. Reassortanten dieser Arbeit zu den geringsten Endtitern replizierte.

### 3.8.2 Vergleich der Substratspezifität der Influenza A-Virus Neuraminidasen N1 und N2

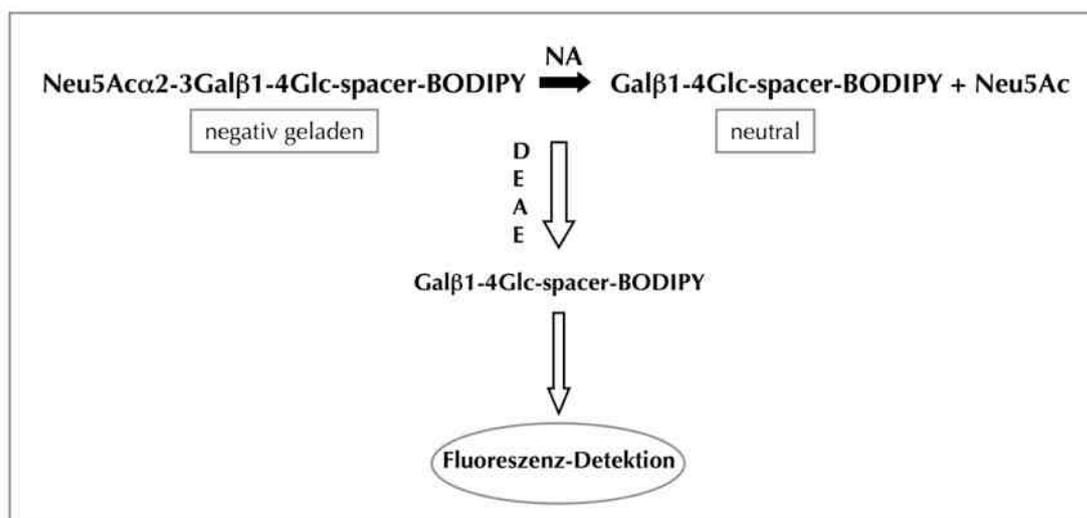


Bild 3.19: **Schema des Neuraminidase-Aktivitäts-Assays.** Die Neuraminidase (in Form von gereinigtem Virus) spaltet vom negativ geladenen Substrat, bestehend aus BODIPY-markiertem Trisaccharid Sialinsäure-Galaktose die Sialinsäure (Neuraminsäure) ab. Es entsteht neutrales BODIPY-markiertes Galaktose-Disaccharid als Produkt. Das geladene Substrat bindet an den Anionen-Austauscher DEAE, das neutrale Produkt wird von diesem durch Zugabe von Wasser getrennt und gemessen. Daraus wird die Menge des gebildeten (neutralen) Produkts errechnet. Die Menge des negativ-geladenen, nicht geschnittenen Substrates wird durch Zugabe von Natriumazetatpuffer vom DEAE getrennt und ebenfalls gemessen und errechnet.

Die Neuraminidase, eine Exoglykosidase, hydrolysiert die Bindung zwischen der Sialinsäure und dem entsprechend verlinkten Zuckerrest Galaktose. Die in dieser Arbeit angewandte Fluoreszenz-Methode verwendete BODIPY-markierte Trisaccharide als NA-Substrat. Sie basiert auf der quantitativen Trennung neutraler BODIPY-Disaccharide von negativ geladenem, nicht geschnittenem Substrat. Die Trennung erfolgte durch eine Anionen-Austauscher Kartusche (Mini-Säule, DEAE-Toyopearl), die Konzentration des Reaktionsproduktes wurde anhand der Fluoreszenz bestimmt (Mochalova, Korchagina et al. 2005). Die Inkubation der BODIPY-markierten Sialooligosaccharide mit der Neuraminidase fand unter Bedingungen statt, die nur die partielle Desialisierung des Substrates erlaubten. Das negativ geladene Substrat wurde in der Säule an den Anionen-Austauscher gebunden, das BODIPY-markierte (neutrale) Reaktionsprodukt wurde dann in wässriger Lösung eluiert und einer ELISA-Platte gesammelt. In einem weiteren Schritt wurde das nicht reagierende Substrat mit Azetatpuffer eluiert und ebenfalls in der ELISA-Platte gemessen. Dieser Schritt erlaubte die Quantifizierung der initialen Substratmenge und die ge-

## Ergebnisse

naue Berechnung der enzymatischen Reaktionskonstanten. Für die Überprüfung der Neuraminidasesubstratspezifität der humanen Viren wurden analog zum HA-Bindungsexperiment die Sialooligosaccharide 3'SiaLacNAc (3'SLN), 6' SiaLacNAc (6'SLN) und 6'SiaLac (6'SL) verwendet. Für die Durchführung wurden dieselben gereinigten Virus-Glyzerolstocks verwendet wie in den HA-Bindungsexperimenten.

Getestet wurde die Substratspezifität von Wildtyp- und rekombinanten H1N2-Viren (A/Sachsen/1816/02; rNC4-P7-M und rNC4-P6/7-M) im Vergleich zu A/NewCaledonia/20/99 (H1N1) und dem aviären Isolat A/CommonBussard/Berlin/1/06 (H5N1). Der Vergleich zu einem aviären Virus zeigte deutlich die großen Unterschiede zur Neuraminidaseaktivität humanpathogener Influenza A-Viren. Das Bild 3.20 zeigt die Neuraminidasespezifität der Neuraminidasen des Stammes A/Panama (rNC4-P6/7-M), A/Moscow (rNC4-P7-M), der Moscow-ähnlichen Neuraminidase (A/Sachsen/1816/02) (alle drei N2) und der A/NewCaledonia-Neuraminidase (N1).

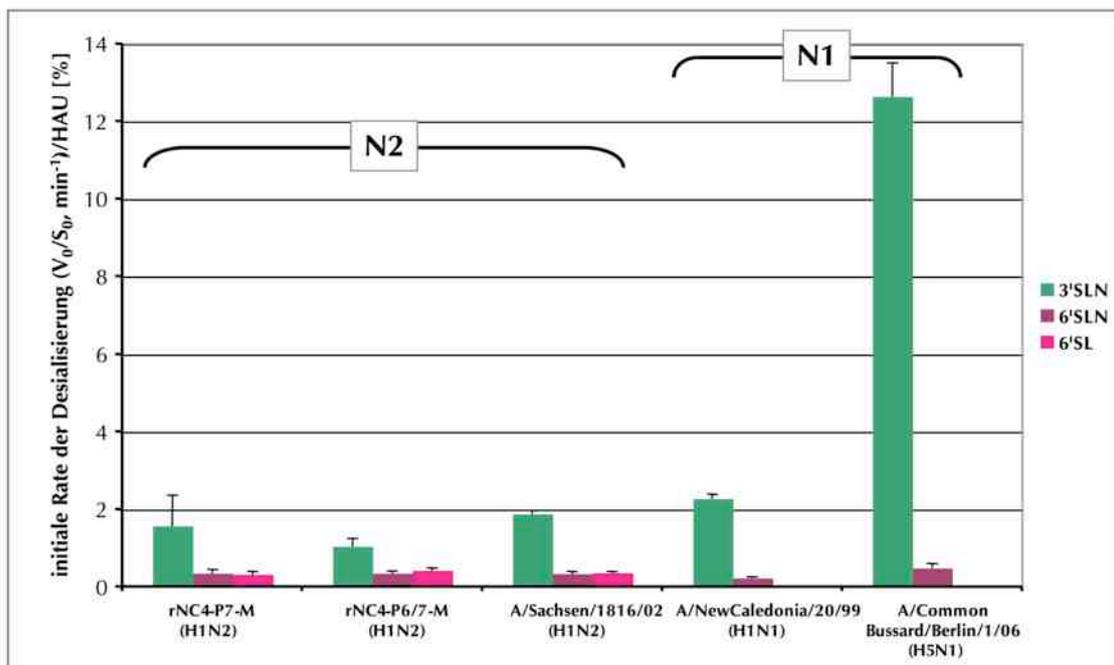


Bild 3.20: **Die Aktivität von Influenza A-Virus Neuraminidasen zu verschiedenen Substraten.** Angegeben ist prozentual die initiale Rate der Desialisierung pro HA-Einheit (HAU) für jedes Sialooligosaccharid. Sie wird berechnet aus dem Anstieg der linearen Region der Produktakkumulation gegen die Zeitkurve, von  $V_0$  aufgetragen gegen  $S_0$ , das bedeutet, als den Wert, bei dem  $V/S \ll K_m$ . Dabei ist  $V_0$  die Anfangsgeschwindigkeit;  $S_0$  die initiale Substratkonzentration;  $K_m$  die Michaelis Konstante. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten (N2) beziehungsweise zwei unabhängigen Experimenten (N1).

Betrachtet man die Aktivität der humanen Neuraminidasen, so sieht man, dass typischerweise auch deren größte Substrataffinität dem aviären Sialooligosaccharid 3'SLN gilt, jedoch 4-5-fach niedriger im Vergleich zur Neuraminidase des aviären Virus. Diese Spezifität wurde bislang auch bei allen anderen humanen Viren der Subtypen H1N1 und H3N2 gefunden (Mochalova,

Kurova et al. 2007). Die geringste Substrataffinität bezüglich des 3'SLN-Rezeptors zeigte das Virus rNC4-P6/7-M (NA-Panama). Die Desialisierung der 6'-gebundenen (humanen) Rezeptoren durch die Neuraminidasen N1 und N2 unterschied sich kaum. Sie war sowohl bei aviären, als auch bei humanen Neuraminidasen sehr viel geringer ausgeprägter als die Affinität zum Rezeptor 3'SLN.

Anhand der beiden Experimente wird der unterschiedliche Grad der Anpassungsfähigkeit zwischen den beiden Glykoproteinen Hämagglutinin und Neuraminidase an ihre Rezeptoren deutlich. Sie zeigten, dass für Neuraminidasen eine weniger starke Anpassung an 6'-gebundene Rezeptoren stattfindet. Die Bindung der Viren an die Zielzelle durch Hämagglutinin scheint demnach einem größeren „Selektionsdruck“ zu unterliegen als deren Ablösung von der Zelle. Grundsätzlich können aus diesem Experiment keine deutlichen Unterschiede zwischen H1N1- und H1N2-Viren abgeleitet werden, die darauf hindeuten, dass durch die Kombination von H1-HA mit einer N2-Neuraminidase die Verbreitung der H1N2-Viren durch einen stärkeren Umsatz von 6'-gebundenen Substraten positiv beeinflusst wurde.

### **3.9 Neutralisationsstudien mit H1-Antiseren**

#### **3.9.1 Plaqueneutralisationsstudien mit zwei verschiedenen H1-Antiseren**

Bislang konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich WT H1N2-Viren sehr effizient vermehren können. Weiterhin wurde untersucht, inwiefern ihre HA-Rezeptoraffinität bzw. NA-Substratspezifität ihren parentalen H1N1- und H3N2-Viren entspricht oder eventuelle Abweichungen erkennbar sind, die Hinweise auf Eigenschaften, die zu ihrer weiten Verbreitung beitragen geben könnten. Deutliche Abweichungen wurden in diesem Zusammenhang nicht festgestellt. Unter Punkt 3.6 konnte gezeigt werden, dass WT-H1N2-Viren im Vergleich zum rekombinanten „Referenzvirus“ rNC4-P7-M eine erhöhte Vermehrungsfähigkeit besitzen, die vermutlich auf die spezifischen Aminosäureunterschiede (Punkt 3.1.1) der WT-H1N2-Isolate zurückzuführen ist. Um zu untersuchen, ob Aminosäureunterschiede in antigenen Bereichen von HA und NA auch einen Einfluss auf immunreaktive Eigenschaften der Viren hatten, wurden Neutralisationsstudien mit Antiseren durchgeführt, die sich von denen der bislang veröffentlichten Studien mit Hämagglutinationshemmtests unterschieden (Gregory, Bennett et al. 2002; Xu, Smith et al. 2002; Goddard, Joseph et al. 2004). Aus diesem Grund und um zu untersuchen, ob die N2-Neuraminidase die Neutralisation durch H1-Antiseren beeinflussen kann, wurden zunächst Plaqueneutralisationsstudien durchgeführt. Aus dem Bestand des Nationalen Referenz-

## Ergebnisse

---

zentrums Influenza waren für Neutralisationsstudien verschiedene Antiseren vorhanden. Ausgewählt wurde ein H1N1-Serum aus Frettchen, das nach Immunisierung mit dem Virus A/NewCaledonia/20/99 gewonnen wurde. Weiterhin wurde ein Patientenserum, von einer Person mit nachgewiesener Influenzaerkrankung durch ein H1N1-Virus im Jahr 2002 verwendet. Diese Seren wurden eingesetzt, um Plaquetest-basierte Neutralisationsstudien durchzuführen. Für die Testreihen wurden vergleichend fünf H1-Viren getestet: A/NewCaledonia/20/99 und rek A/NewCaledonia (H1N1), sowie die H1N2-Viren A/Sachsen/1816/02, rNC4-P7-M und rNC4-P6/7-M. Dieser Test unterscheidet sich vom Hämagglutinations-Hemm-Test (HHT). Der HHT-Titer gibt den reziproken Wert der höchsten Serumverdünnung an, bei der die Hämagglutination noch verhindert wird. Die Neutralisation im Plaqueneutralisationstest beruht auf der tatsächlichen Inhibition der Virusreplikation und Infektivität.

Zunächst wurde zur Virusverdünnung im Verhältnis 1:1 eine Serumverdünnung zugegeben und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Für die Infektion von MDCK II-Zellen wurde die Konzentration der Viren zuvor so gewählt, dass Plaques gut zählbar waren (ca.  $10^{-3}$  bis  $10^{-5}$ ). Die Zellen wurden mit der Viruskontrolle oder Virus-Serum-Gemisch infiziert und nach Zugabe von Avicel-Plaquemedium für ca. 48 h im Zellkulturschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. Die Platten wurden gewaschen und mit formaldehydhaltiger Kristallviolett-Lösung fixiert und gefärbt. Nach dem Trocknen der Platten wurden Plaques ausgezählt und anhand der Serumverdünnung die Serumkonzentration bestimmt, die zu 50 % Plaquereduktion führt. Diese Serumtitere sind reziprok in den Abbildungen 3.21 A und B für beide Seren gezeigt.

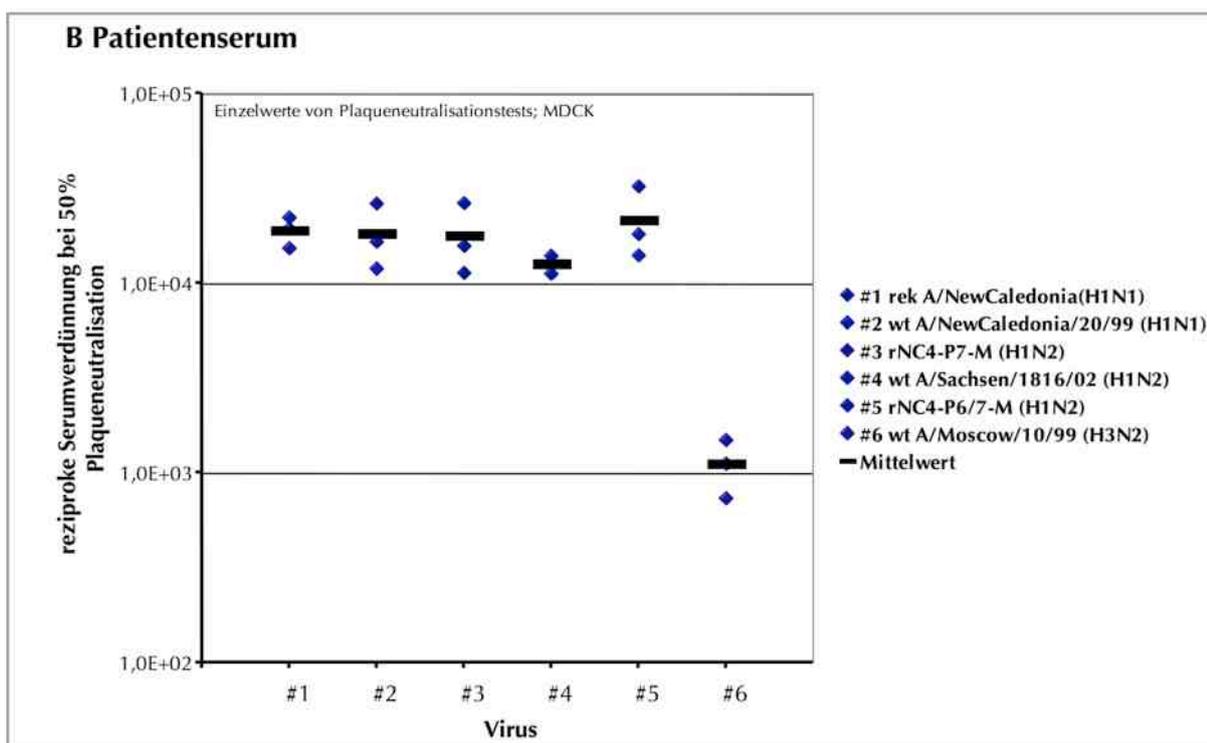
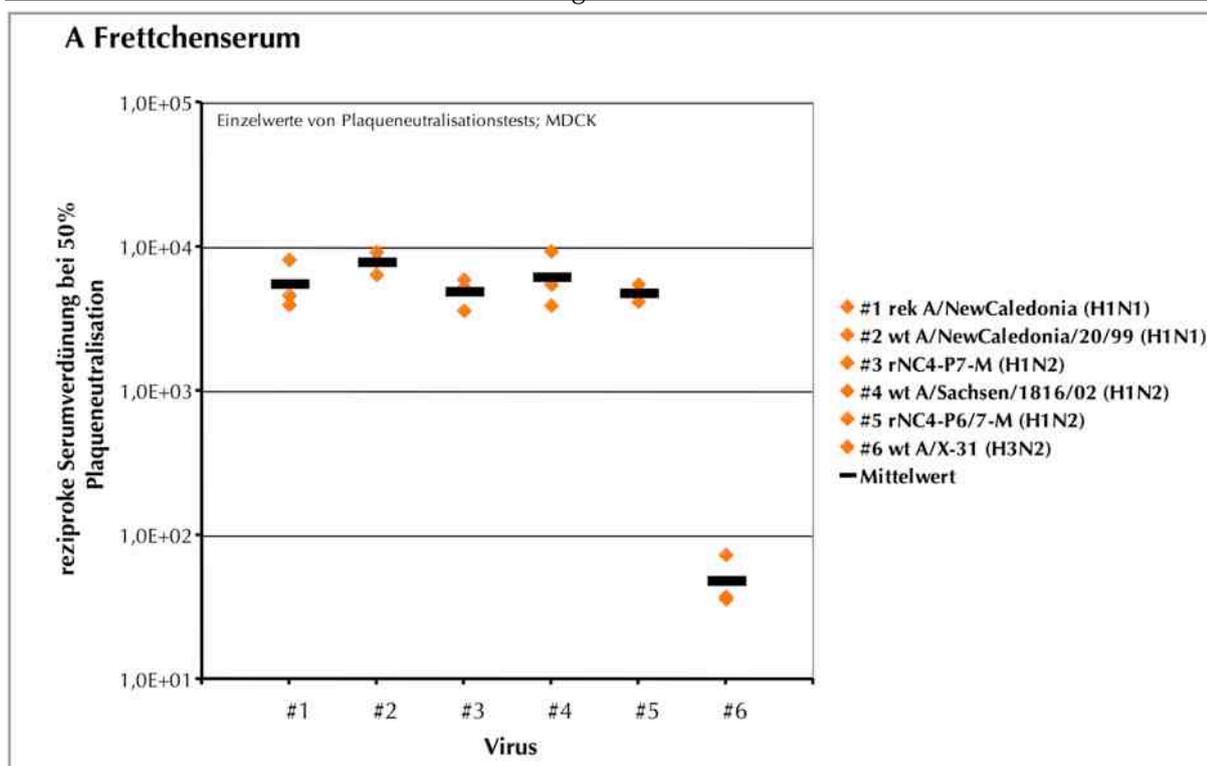


Bild 3.21: Vergleich der Plaquereduktion von H1N1- und H1N2- Influenza A-Viren durch zwei H1-Seren (Plaqueneutralisationstest). A Neutralisierung durch Serum, gewonnen aus Frettchen durch Immunisierung gegen A/NewCaledonia/20/99 (H1N1). Die reziproke Serumverdünnung bei 50 % Plaqueneutralisation liegt für alle getesteten H1-Viren je Serum innerhalb einer log-Stufe: bei  $4,8 - 8,4 \times 10^4$ . B Plaquereduktion durch ein humanes Patientenserum mit nachgewiesener H1-Influenzainfektion. Die reziproke Serumverdünnung bei 50 % Plaquereduktion beträgt  $1,2 - 2,1 \times 10^3$ . Die Tests wurden im 6-Kalottenformat in Doppelbestimmung durchgeführt.

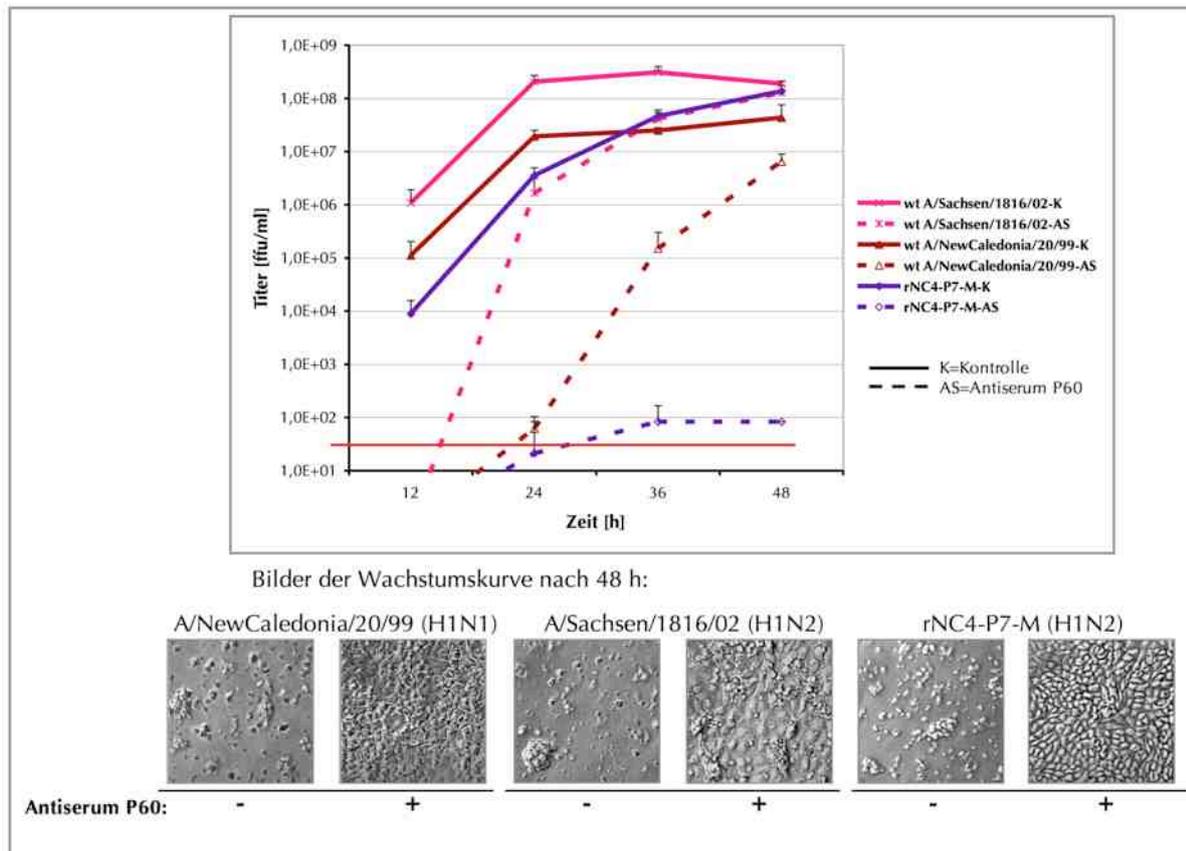
Die (reziproken) Werte der Verdünnung des Frettchenserums um eine 50 %-ige Plaqueneutralisation zu erreichen, waren sehr dicht um einen Punkt gestreut. Als Negativkontrolle wurde ein H3-Virus verwendet, das wie vermutet wurde eine sehr geringe Neutralisationsaktivität zeigte. Die Konzentration des Antiserums lag, um eine 50 %-ige Plaqueeinhibition zu erreichen, um 2 log-Stufen höher ( $4,8 \times 10^1$ ). Das Patientenserum aus dem Jahr 2002 zeigte ein leicht differenzierteres Bild. Auch durch dieses Serum wurden alle H1-Viren ähnlich gut neutralisiert. Unter den H1-Viren benötigte jedoch das Wildtyp-H1N2-Isolat A/Sachsen/1816/02 die höchste Serumkonzentration (und mußte im Mittel 1:12.700 verdünnt werden) um eine 50 %-ige Plaqueneutralisation zu erreichen. Im direkten Vergleich war für die A/NewCaledonia-Viren eine Verdünnung des Patientenserums ab 1:18.300 zur 50 %-igen Plaquereduktion ausreichend. Als Negativkontrolle wurde in diesem Fall das H3-Virus A/Moscow/10/99 verwendet. Um für dieses Virus eine 50 %-ige Plaquereduktion zu erreichen war eine mehr als eine 10-fach höhere Serumkonzentration erforderlich (im Mittel wurde das Serum 1:1000 verdünnt). Es ist nicht auszuschließen, dass der Patient auch Antikörper gegen H3-Influenza A Viren aufgrund einer vorhergehenden Infektion besaß. Ein genereller Einfluss der N2-Neuraminidase auf die Neutralisierbarkeit der Viren konnte in diesem Experiment nicht nachgewiesen werden. Die verminderte Neutralisationsfähigkeit des WT-H1N2-Isolats durch das H1-Patientenserum wurde jedoch unter Replikationsbedingungen näher untersucht. Ein solches Experiment sollte eventuelle Rückschlüsse auf den als „*Herd immunity*“ bezeichneten Immunstatus der Bevölkerung bezüglich der Neutralisation durch H1-Antikörper zulassen.

### 3.9.2 Replikationskurve unter Einfluss des H1-Patientenserums

Wie unter Punkt 3.8.1 gezeigt, wurden sowohl die H1N1-, als auch die H1N2-Viren gut durch das Patientenserum neutralisiert. Um jedoch ein differenzierteres Bild der Neutralisierung unter Replikationsbedingungen zu zeigen und die Unterschiede zwischen H1N1 und H1N2-Viren genauer zu betrachten wurden Replikationskurven erstellt. Sie wurden unter Bedingungen angefertigt, die parallel die Replikation in Gegenwart oder Abwesenheit des Antiserums zeigen. Dabei wurde die eingesetzte Serumkonzentration so gewählt, dass für alle H1-Viren eine 50 %ige Plaqueneutralisation erreicht werden konnte. Anhand der Daten aus Bild 3.21 B wurde eine Serumverdünnung von 1:10.000 ausgewählt. Getestet wurden in diesem Fall neben zwei Kontrollen, eines älteren H1N1-Stammes (A/PR/8/34) und eines H3N2-Virus (A/Moscow/10/99) die H1 Viren A/NewCaledonia/20/99 (H1N1), A/Sachsen/1816/02 und das rekombinante rNC4-P7-M (beide H1N2). Die Bilder 3.22 und 3.23 (Kontrollviren) zeigen die Neutralisierbarkeit der Viren unter Replikationsbedingungen. Die Replikationskurven wurden wie zuvor beschrieben angefertigt. MDCK II-Zellen wurden durch die entsprechenden Viren

## Ergebnisse

mit einer MOI=0,01 im 35 mm-Format (ca.  $10^6$  Zellen) infiziert. TPCK-Trypsin-haltiges Medium wurde zu allen nach der Infektion zugegeben. Parallel dazu wurde bei einer weiteren Gruppe zu diesem Medium das Patientenserum in einer Verdünnung von 1:10.000 zugegeben. Nach der Probenentnahme im Abstand von 12 h wurden die Infektionsansätze mit dem jeweiligen entnommenen Volumen Medium aufgefüllt. Die Auswertung zeigt die Mittelwerte aus zwei Replikationskurven, die jeweils in Doppelbestimmung angefertigt wurden. Die Bilder zeigen Aufnahmen der Zellkulturschalen zum Zeitpunkt des Versuchsendes nach 48 h.



**Bild 3.22: Die Replikation der H1-Viren A/NewCaledonia/20/99 (H1N1), A/Sachsen/1816/02 (H1N2) und rNC4-P7-M (H1N2) in Anwesenheit eines humanen H1-Antiserums.** Die Viren des Stammes A/NewCaledonia/20/99 zeigen in Anwesenheit des Antiserums ein deutlich eingeschränktes Replikationsverhalten. Ebenso wird die Replikation des rekombinanten H1N2-Virus deutlich eingeschränkt. Das Wachstum des wt-Isolates A/Sachsen/1816/02 (H1N2) dagegen zeigt eine weniger starke Beeinflussung und repliziert in Anwesenheit des Serums verzögert, erreicht aber nach 48 h die Endtiter der Kontrollgruppe. Die Konzentration des Antiserums im Medium betrug 1:10.000. Infektion der MDCK-Zellen mit MOI=0,01. Die Replikationskurven zeigen Mittelwerte aus zwei Experimenten, die jeweils in Doppelbestimmung angefertigt wurden. Die rote Linie im Diagramm zeigt die methodisch bedingte Nachweisgrenze von Viruspartikeln.

## Ergebnisse

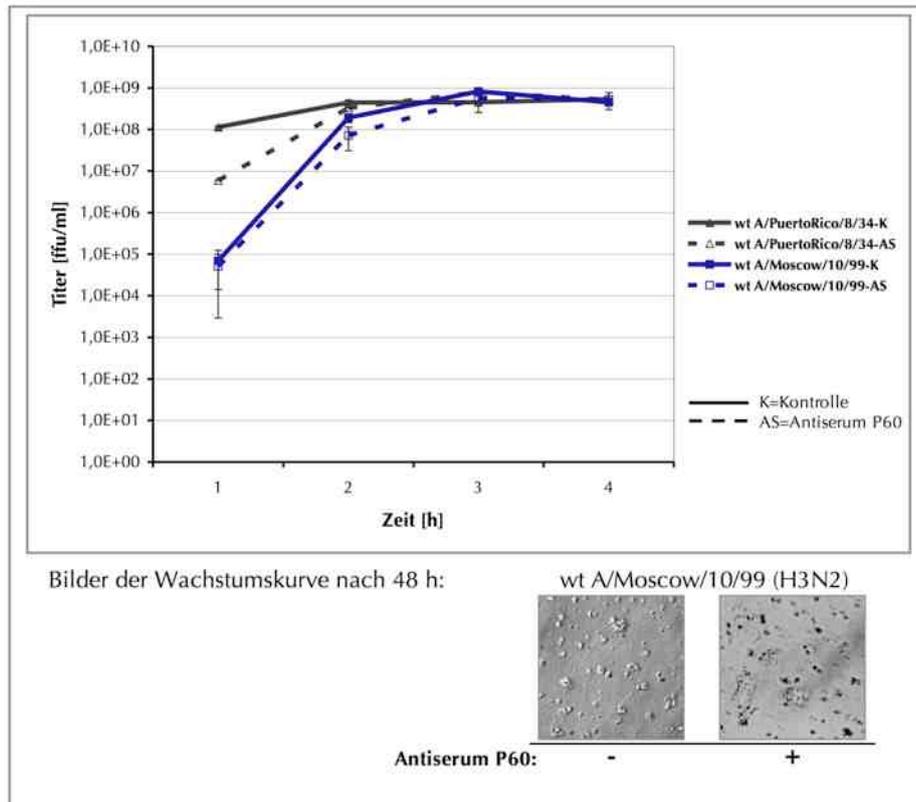


Bild 3.23: **Die Replikation der Kontrollviren A/PR/8/34 (H1N1) und A/Moscow/19/99 (H3N2) in Anwesenheit eines humanen H1-Antiserums.** Beide Virusstämme vermehren sich in Anwesenheit des H1-Antiserums ohne Beeinträchtigung (H3N2) bzw. mit nur leichter Verzögerung bis zu einem Zeitraum von 24 h (H1N1). Konzentration des Antiserums im Medium betrug 1:10.000. Die Replikationskurven zeigen Mittelwerte aus zwei Experimenten, die jeweils in Doppelbestimmung angefertigt wurden

Die Gruppe der neueren H1-Viren zeigte ein deutlich inhomogeneres Replikationsverhalten in Gegenwart des H1-Antiserums als die Plaqueneutralisationstests. Die Inhibition der Replikation des A/NewCaledonia/20/99-Virus entsprach nach 24 h über fünf log-Stufen, nach 36 h über 2 log-Stufen und nach 48 h um noch eine log-Stufe. Vergleicht man dazu den Stamm A/Sachsen/1816/02 so entsprach die Differenz zwischen Kontroll- und Serumgruppe nach 24 h nur etwa 2 log-Stufen, nach 36 h einer log-Stufe und erreichte nach 48 h den gleichen Endtiter wie die Kontrollgruppe. Das „Referenzvirus“ rNC4-P7-M zeigte ebenso wie A/NewCaledonia/20/99 nach 24 h eine Differenz von ca. 5 log-Stufen zur Kontrollgruppe, die sich nach 48 h auf 6 log-Stufen erhöht. Das rekombinante H1N2-Virus wurde durch das H1-Serum am stärksten neutralisiert. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte eine im Vergleich zum A/NewCaledonia/20/99-Virus geringere HA-Expression auf der Zelloberfläche sein, die bei hoher Antikörperkonzentration, v.a. in den ersten 24 h die starke Replikationsinhibition verursacht. Dagegen könnten die in Tabelle 3.1 beschriebenen Aminosäureveränderungen in den antigenen Bereichen von HA und NA den WT H1N2-Viren einen Vermehrungsvorteil im Sinne eines Antigen-Drifts verschafft haben.

### **3.10 Die Erkennung Influenza A-Virus infizierter Zellen durch reaktive Komponenten des Immunsystems, die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und deren Rezeptoren**

#### 3.10.1 Die spezifische Lyse Influenza A-Virus infizierter Zellen durch NK-Zellen

Natürliche Killerzellen (NK) erkennen und lysieren virusinfizierte Zellen und maligne, entartete körpereigene und körperfremde Zellen. Sie sind Effektorzellen der angeborenen Immunität und werden direkt nach Pathogenkontakt vor der zellulären und humoralen Immunantwort aktiv. Die CD56/ CD16-positiven und CD3-negativen großen granulären Lymphozyten stammen von hämatopoetischen Vorläufer-Stammzellen aus dem Knochenmark ab, differenzieren sich im Blut weiter und können aus PBMCs (periphere Monozyten aus Blut) isoliert werden.

Die Durchführung dieses Experiments geht zurück auf eine Veröffentlichung des Jahres 2007 (Owen, Yamada et al. 2007). Darin wurde gezeigt, dass ältere H3N2-Stämme, die weniger Glykosylierungsstellen im HA als neuere Stämme besitzen, weniger effizient durch NK-Zellen lysiert werden können. Die Hypothese besagt demnach, dass die Zunahme der Glykosylierungsstellen und Veränderungen in antigenen Bereichen von HA und auch NA zu einer weniger effizienten Erkennung der Influenza A-Virus-infizierten Zelle durch NK-Zellen führen. Diese Evasion gegenüber Immunzellen wiederum würde einen Vermehrungs- und Verbreitungsvorteil für das Virus bedeuten. Die Erkennung der Zielzellen durch NK-Zellen erfolgt durch Interaktion des exprimierten HA auf der Oberfläche der infizierten Zelle mit Sialinsäuren der NK-Zellrezeptoren NKp46 und NKp44 (Arnon, Lev et al. 2001; Mandelboim, Lieberman et al. 2001). Diese Rezeptoren sind mit  $\alpha$ 2-3- und  $\alpha$ 2-6-Sialinsäuren konjugiert, die Rezeptoren des Hämagglutinins sind. Für H1N1-Viren wurde eine solche Studie bislang nicht durchgeführt. Ziel war es daher zu untersuchen, in welchem Maße auch H1N1-infizierte Zellen von NK-Zellen lysiert werden. Weiterhin stellte sich die Frage, ob H1N2-infizierte Zellen im Vergleich zu H1N1- und auch H3N2-infizierten Zellen möglicherweise unterschiedlich effizient von NK-Zellen erkannt werden. Bislang ist nicht geklärt, ob auch die Expression der Neuraminidase bei der Interaktion der NK-Rezeptoren mit den Glykoproteinen der Zielzelle eine Rolle spielt. Das HA1 aktueller H1N1-Viren besitzt ca. sieben potentielle Glykosylierungsstellen (Motif N X S/T). Das HA1 der derzeitigen H3N2-Viren dagegen ca. elf potentielle Glykosylierungsstellen (Chutinimitkul, Chieochansin et al. 2008). Für H1N2 sind keine weiteren spezifischen Glykosylierungsstellen im HA1 bekannt, es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass auch Mutationen antigenere Bereiche, zum Beispiel an den Positionen V196A oder A193T im HA1 der H1N2-Viren zu Veränderungen der Erkennung durch NK-Zellen geführt haben könnten.

## Ergebnisse

---

Die Isolierung von PBMCs erfolgte aus *Buffy Coat* (Lymphozytenkonzentrat aus abzentrifugiertem Vollblut, enthält wenig Blutplasma und wenige Erythrozyten) über Dichtegradienten-Leukozytenseparation mit Ficoll-Hypaque. Aus der daraus gewonnenen Population von Lymphozyten und Monozyten wurden NK-Zellen per MACS (magnetische Zelltrennung mit Antikörper-Magnetpartikel-Konjugaten) isoliert. Die frisch gewonnenen NK-Zellen wurden über Nacht in einer Zellkulturflasche in Medium aufbewahrt. Zeitlich parallel dazu erfolgte die Infektion einer Suspensionszelllinie (K562, humane Erythroleukämiezelllinie) über Nacht mit den Influenza A-Viren: A/Moscow/10/99 (H3N2), A/NewCaledonia/20/99 (H1N1) und den H1N2-Viren A/Sachsen/1816/02, rNC4-P7-M und rNC4-P6/7-M. Die Zellen wurden nach 16 h Inkubationszeit mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE Minuten gefärbt. Anschließend wurden die K562- und NK-Zellen in verschiedenen Verhältnissen (1/5) 1/10; 1/20 (1/40) für 3h bei 37°C im Brutschrank in einer Zellkulturplatte inkubiert, an deren Boden sich die Zellen nur minimal anhafteten konnten (*low attachment*). Das Zellgemisch wurde dann zentrifugiert, fixiert und die Zellen zum Nachweis der Infektion mit einem Influenzavirus  $\alpha$ NP-Antikörper gefärbt. Die Analyse lysierter und nicht lysierter CFSE-gefärbter Zellen erfolgte im Durchflusszytometer und wurde anhand der CFSE-Fluoreszenz prozentual ausgewertet und daraus die Lyse infizierter und nicht infizierter Zellen durch NK-Zellen abgeleitet. Für die Durchführung des NK-Experiments wurde in der vorliegenden Arbeit der nicht-toxische Farbstoff CFSE verwendet und ersetzte das übliche Verfahren des „*Chromium Release Assays*“ durch ein nicht-radioaktives Verfahren. Bild 3.24 dokumentiert die Charakterisierung von isolierten NK-Zellen durch FACS-Analyse. Die mit hohem Reinheitsgrad aus der PBMC-Population isolierten NK-Zellen wurden durch Oberflächenmarker als CD3-negative und CD56-positive Immunzellen identifiziert.

## Ergebnisse

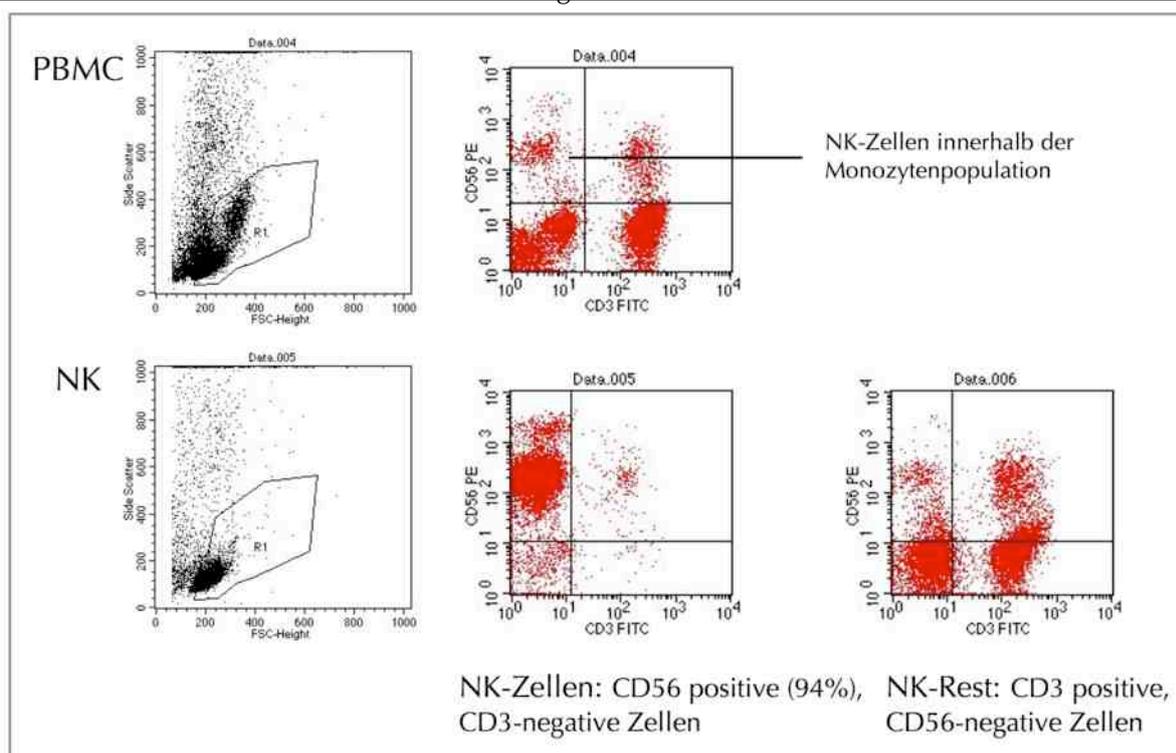


Bild 3.24: **Die Isolation von NK-Zellen aus PBMCs.** Das Punktediagramm (FSC/SSC-dot plot) oben links zeigt die Aufnahme von peripherer Monozyten, die aus Blut isoliert wurden. Die x-Achse gibt die Fluoreszenzintensität an, die y-Achse die Anzahl der Ereignisse. Werte über 10 gelten jeweils als positiv. CD56-positive und gleichzeitig CD3-negative Zellen konnten innerhalb dieser Population (R1) als NK-Zellen identifiziert werden (oben rechts). Reihe unten: Nach der Isolation der NK-Zellen per MACS/ *NK cell Isolation Kit* (Milteny Biotec) wurde die Reinheit der NK-Zellen durch CD56-positive/ CD3-negative Zellen bestimmt (Diagramm unten mitte), die restlichen Zellen nach der MACS-Isolation sind demzufolge zumeist CD56-negativ und CD3-positiv (Diagramm unten rechts).

Im nachfolgenden Bild 3.25 sind die Kontrollfärbungen infizierter und nicht-infizierter K562-Zellen sowie der isolierten NK-Zellen des nachfolgenden Experiments gezeigt. Die Bilder 3.26 A-E zeigen dann die Punktediagramme (FSC/SSC-dot plot) und Histogramme eines repräsentativen Einzel-experiments mit den entsprechenden Infektionskontrollen (Nachweis durch  $\alpha$ NP-Färbung). In diesen Diagrammen ist M1 ein Maß für lysierte Zellen, M2 für nicht lysierte Zellen. Im Histogramm der Infektionskontrollen gibt M1 den Anteil Influenza A-infizierter K562-Zellen an. Bild 3.26 zeigt vergleichend für fünf Viren die Zytotoxizität durch NK-Zellen für die K562/NK-Verhältnisse 1/10 und 1/20 (Zusammenfassung aus fünf Experimenten). Bei Zellen von Spendern treten individuell z.T. große Varianzen auf. Daher wurde je Spender (*Buffy Coat*) ein Experiment durchgeführt. Fünf Experimente gehen dementsprechend auf fünf Ansätze aus je einer Blutspende zurück.

## Ergebnisse

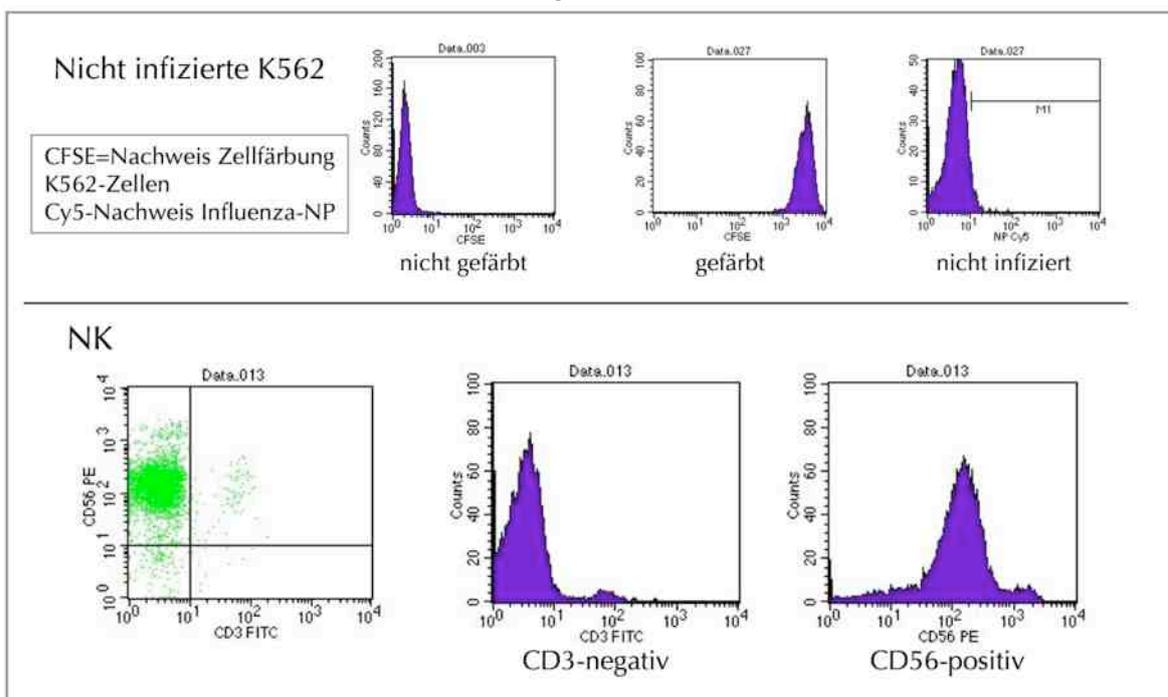
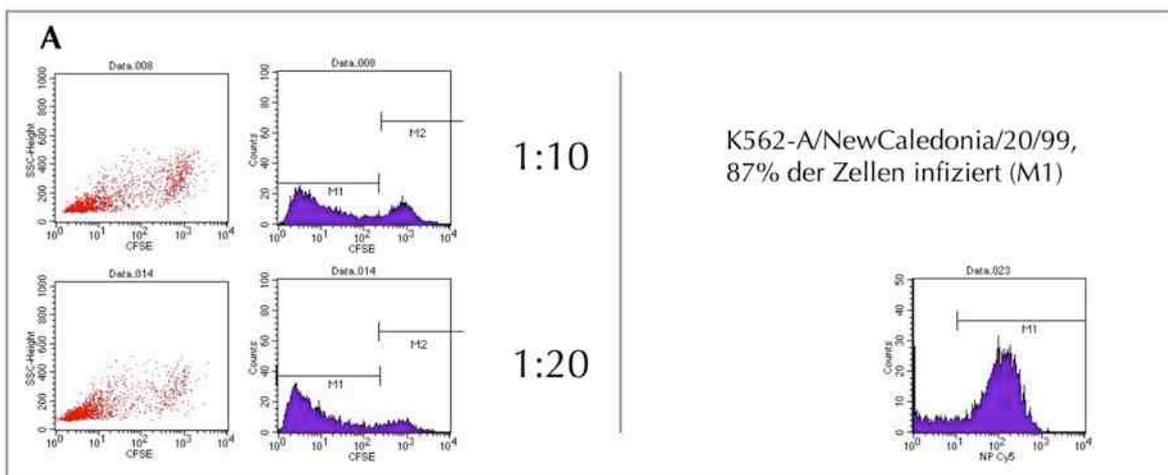
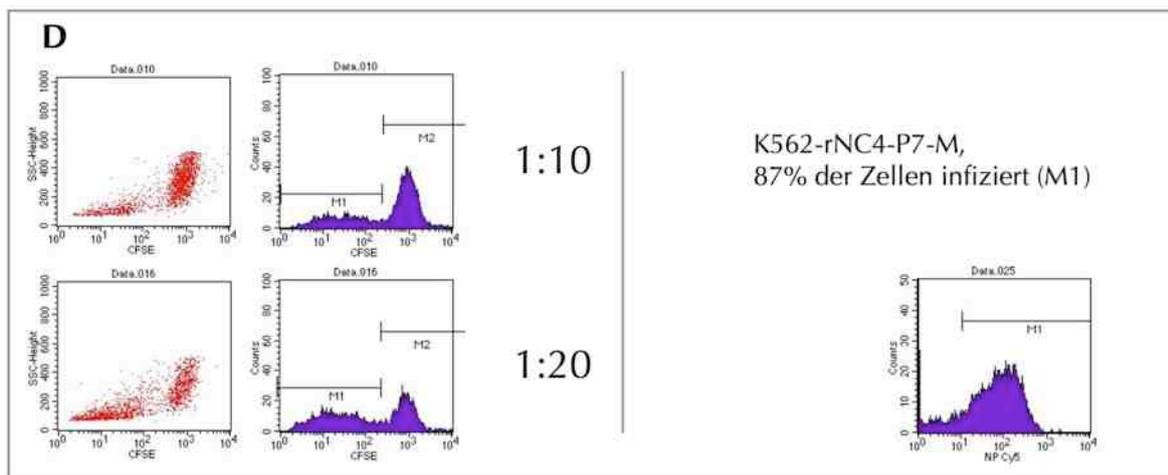
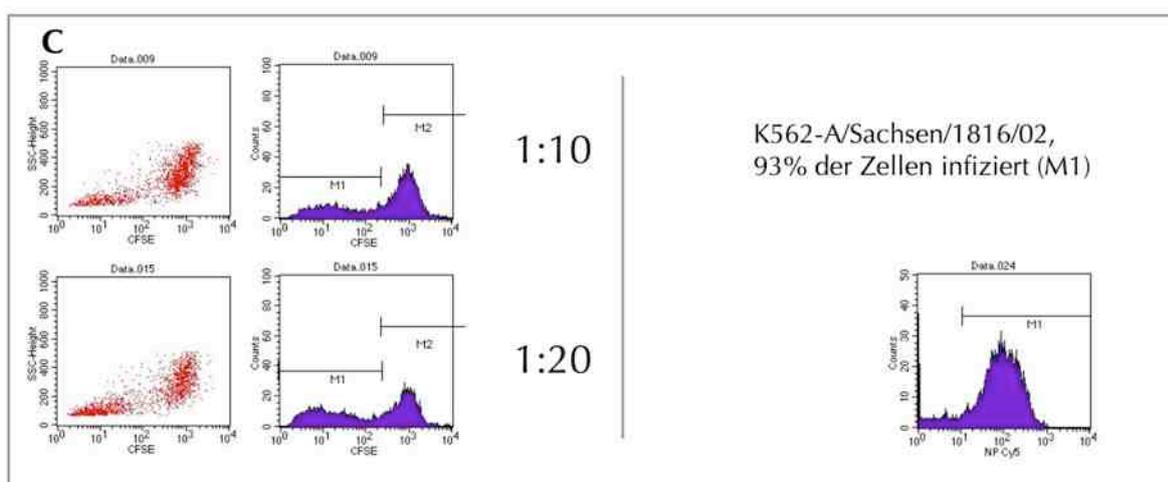
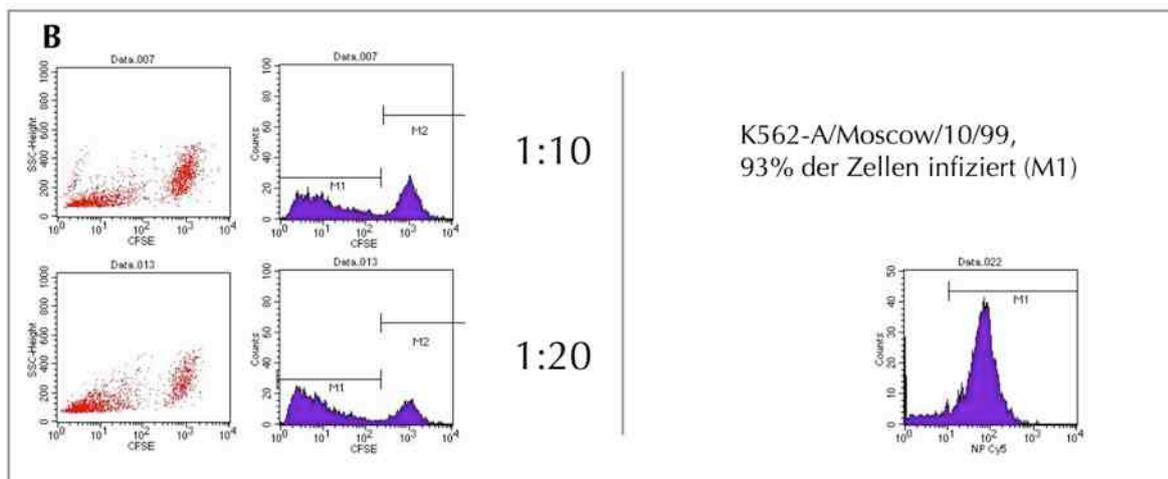


Bild 3.25: **FACS-Kontrollen für ein ausgewähltes Experiment.** Gezeigt sind Kontrollfärbungen nicht infizierter K562-Zellen, gefärbt (CFSE-positiv) und nicht gefärbt, sowie die Kontrollfärbung der NK-Zellen (Reihe unten) für Experiment #6, gezeigt als FSC/SSC-Punktediagramm (links) und als Histogramme für die Marker CD3 (mitte) und CD56 (rechts).



Ergebnisse



## Ergebnisse

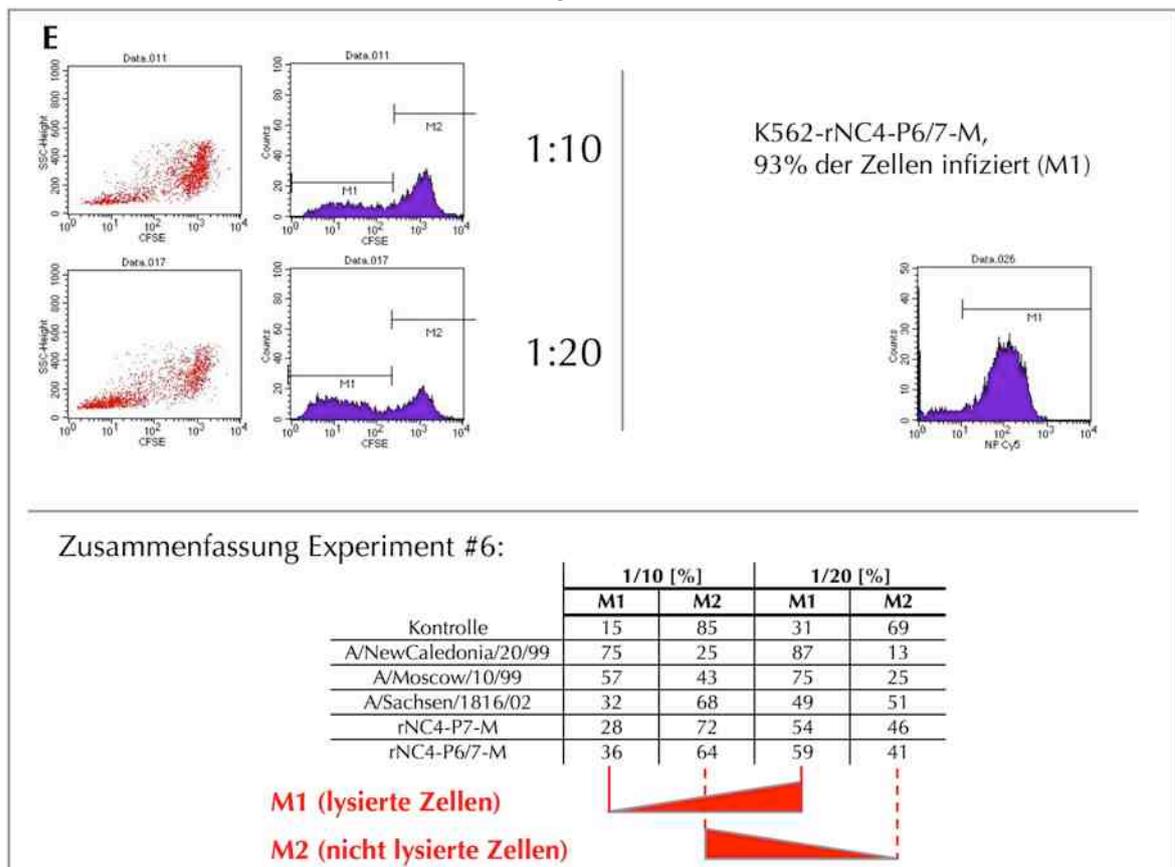


Bild 3.26: **Influenza A-Virus-infizierte K562-Zellen werden durch NK-Zellen lysiert (ausgewähltes Experiment).** Lyse Influenza A-Virus infizierter K562-Zellen. Die Infektion erfolgte laut Reihenfolge mit den Viren: **A:** A/NewCaledonia/20/99 (H1N1); **B:** A/Moscow/10/99 (H3N2); **C:** A/Sachsen/1816/02; **D:** rNC4-P7-M; **E:** rNC4-P6/7-M (H1N2), eingesetzt wurden  $2 \times 10^5$  K562 Zellen, NK  $2 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$ . Gezeigt sind jeweils auf der linken Seite die Punktediagramme und Histogramme (gleiches Ereignis) für die Verhältnisse von K562-Zellen zu NK-Zellen 1 zu 10 und 1 zu 20 sowie rechts der Nachweis der Infektion der K562-Zellen durch NP-Antikörper. Die Fluoreszenzintensität des CFSE-Farbstoffes ist auf der x-Achse sichtbar. Die Fluoreszenzintensität lysierter K562-Zellen nimmt gegenüber intakten Zellen deutlich ab. Die Anzahl lysierter K562-Zellen mit steigender Zahl der NK-Zellen zu.

Die Tabelle in 3.26 E gibt prozentual an, in welchem Maß infizierte Zellen durch NK-Zellen lysiert (M1) bzw. nicht lysiert (M2) wurden. Sichtbar wurde, dass durch die NK-Zellen deutlich mehr infizierte, als nicht infizierte Zellen erkannt und lysiert wurden. Mit ansteigender Zahl der natürlichen Killerzellen im Verhältnis K562- zu NK-Zellen, stieg auch das Maß der lysierten K562-Zellen (M1) an. Je nach Virusinfektion der K562-Zellen, dass bedeutet auch, je nachdem welche Glykoproteine auf der Zelloberfläche exprimiert wurden, unterschied sich die Erkennung und Lyse der infizierten Zellen durch die NK-Rezeptoren. Bild 3.27 zeigt die Zusammenfassung aus fünf Experimenten für die K562/NK-Verhältnisse 1/10 und 1/20.

## Ergebnisse

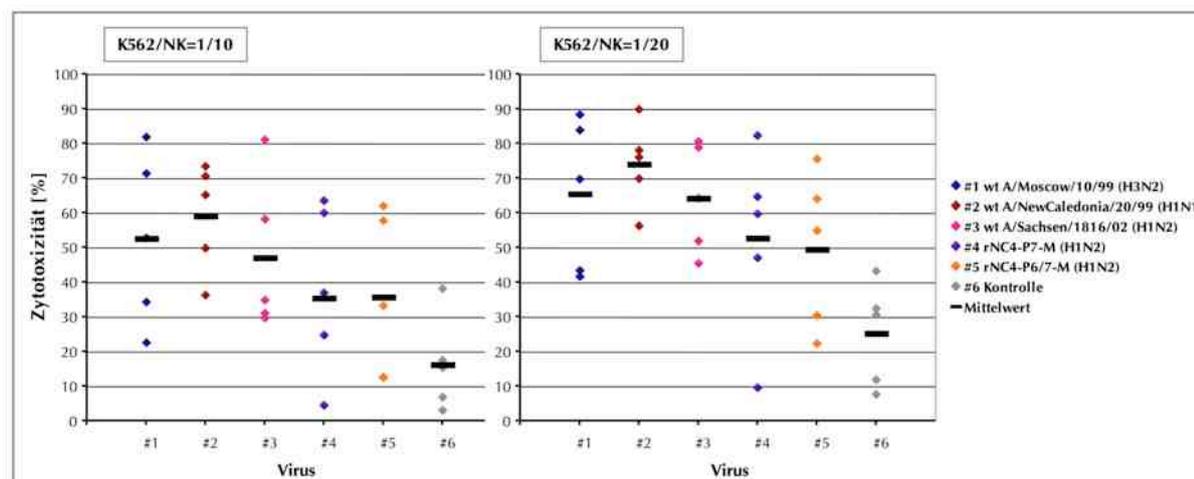


Bild 3.27: **Die Lyse Influenza A-infizierter K562-Zellen durch NK-Zellen.** Gezeigt sind die Einzelwerte der Zytotoxizität von NK- gegenüber Suspensionszellen. Die NK-Zellen wurden für jedes Experiment neu aus Buffy Coats gesunder Spender isoliert (MACS). K562-Zellen wurden mit einer MOI=1 infiziert mit folgenden Viren: A/Moscow/10/99 H3N2, blau); A/NewCaledonia/20/99 (H1N1, rot); A/Sachsen/1816/02 (H1N2, pink); rNC4-P7-M (H1N2, violett); rNC4-P6/7-M (H1N2, orange). Die Färbung der infizierten K562-Zellen und nicht infizierten Kontrollzellen erfolgte durch CFSE. Die Zytotoxizität wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrischen Messung (FACS) CFSE-gefärbter Zellen bestimmt. Der Nachweis der Infektion erfolgte durch die Färbung der Zellen mit dem Primärantikörper  $\alpha$ -NP (1:1000) und dem Sekundärantikörper Cy5 (1:500). Mit schwarzen Balken sind die Mittelwerte der Lyse aus fünf unabhängigen Experimenten angegeben.

Die Zusammenfassung aus fünf Experimenten zeigte, dass Influenza A-Virus infizierte Zellen im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollzellen verstärkt durch NK-Zellen erkannt wurden. Im Mittel wurden H1N1-infizierte K562-Zellen am stärksten durch NK-Zellen lysiert. Daran schließt sich die Zytotoxizität gegenüber A/Moscow/10/99 (H3N2)-infizierten Zellen an, H1N2-Viren zeigten dagegen den geringsten Prozentsatz spezifischer Lyse durch NK-Zellen. Mit steigendem Verhältnis der NK-Zellen zu ihren K562-Zielzellen stieg auch der Prozentsatz der Zytotoxizität. Die große Streuung der Ergebnisse ist vermutlich auf individuelle Unterschiede zwischen den Spendern zurückzuführen. Das Ergebnis dieses Experiments schloss einen Einfluss der Neuraminidase auf die Interaktion mit NK-Zellen nicht aus. Die Zytotoxizität der NK-Zellen war in diesen Experimenten im Durchschnitt gegenüber N2-Viren geringer als bei Interaktion mit dem N1-Virus. Möglich ist, dass eine höhere Aktivität der N2-Neuraminidase die Bindung an die Sialinsäuren auf den NK-Rezeptoren behinderte. Außerdem könnten Unterschiede in der HA-Expression auf den infizierten Zielzellen zu Unterschieden in der Lyse durch NK-Zellen geführt haben.

### 3.10.2 Die Erkennung und Wechselwirkung des Influenza A-Virus Hämagglutinins durch die NK-Rezeptoren NKp44 und NKp46

Um die Ergebnisse aus den Zytotoxizitäts-Experimenten genauer zu bewerten, wurde die Interaktion der Viren mit den aktivierenden NK-Rezeptoren NKp44 und NKp46, analysiert. Für die-

## Ergebnisse

sen Test wurden rekombinant exprimierte Ig-Fusionsproteine aus humanen Zellen eingesetzt, die freundlicherweise von Prof. C. Watzl (Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt wurden (Byrd, Hoffmann et al. 2007). Da die Rezeptor-Ig-Fusionsproteine aus humanen Zellen gewonnen wurden, enthalten sie die für die Bindung humaner Hämagglutinine notwendigen  $\alpha$ 2-6-Sialinsäuren. Beide Rezeptoren vermitteln durch HA-Erkennung/-Bindung spezifisch die Lyse Influenza A-Virus infizierter Zellen (Arnon, Lev et al. 2001; Mandelboim, Lieberman et al. 2001). Um die Bindungsaffinität der Rezeptoren per ELISA zu bestimmen, wurden statt kristalliner HA-Rosetten, die gleichen Viren verwendet wie im NK-Zytotoxizitätsexperiment (3.9.1) (Arnon, Achdout et al. 2004). 96-Kalotten-Platten wurden mit je 64 HA-Einheiten des gereinigten Virus beschichtet und für 24 h bei 4°C inkubiert. Für den Nachweis spezifischer Bindung wurden 0,1  $\mu$ g, 0,2  $\mu$ g und 0,5  $\mu$ g der Ig-Fusionsproteine zugegeben und abermals über Nacht bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurde ein Biotin-markierter Sekundärantikörper gegen humanes IgG (der Ig-Fusionsproteine) verwendet. Die Affinität der Rezeptoren wurde per Farbumschlag über die Bindung von Streptavidin-alkalischer-Phosphatase durch Umsetzung des Substrats ABTS photometrisch bei 405 nm bestimmt. Bild 3.28 zeigt Mittelwerte aus zwei Bindungsexperimenten.

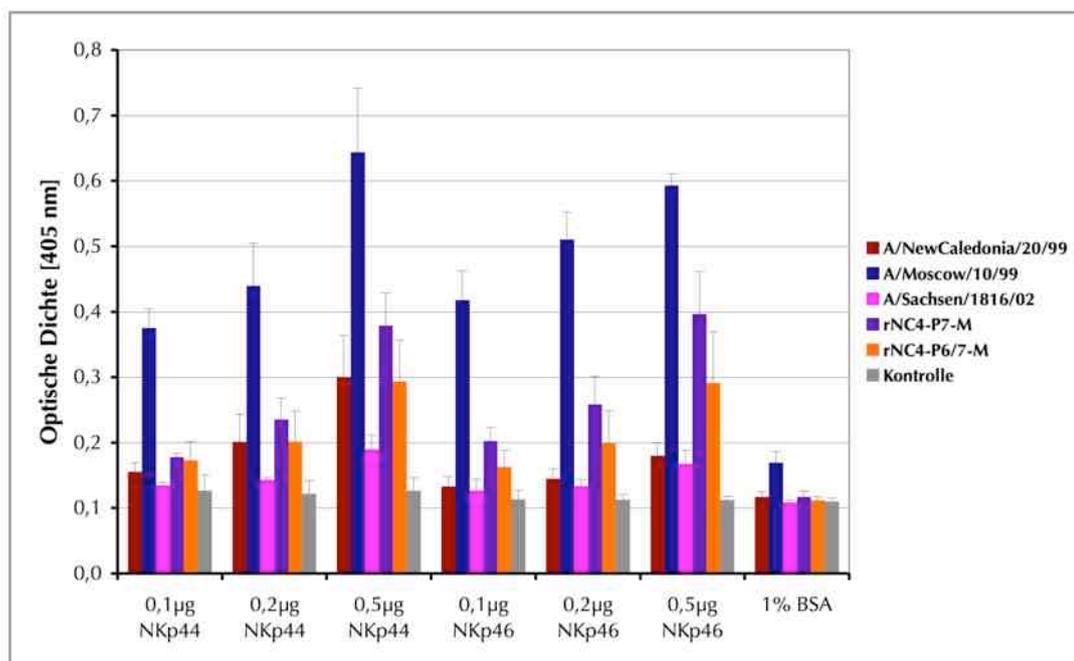


Bild 3.28: **Die Bindung der NK-Rezeptoren NKp44 und NKp46 an Influenza A-Viren.** 64 HA-Einheiten gereinigtes Virus wurden mit 0,1, 0,2 oder 0,5  $\mu$ g des Rezeptors (Ig-Fusionsproteine) inkubiert und die Bindung über Koppelung eines humanen  $\alpha$ -Fc-IgG-Biotin-Antikörpers (1:1000), Streptavidin-POD und ABTS nachgewiesen. Die Optische Dichte wurde bei 405 nm in Dreifachbestimmung gemessen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte STABWN von zwei Experimenten.

Die Bindung der NK-Rezeptoren an das Virus stieg erwartungsgemäß mit zunehmender Menge der Ig-Fusionsproteine, d.h. der Menge des gebundenen Rezeptors an. Alle getesteten Viren

konnten durch die Rezeptoren über dem Grenzwert von 0,1 (BSA-Kontrolle) spezifisch gebunden werden. Das Bindungsniveau ist aufgrund einer höheren Anzahl von Sialinsäuren auf der Oberfläche des NKp44-Rezeptors höher als bei NKp46 (Arnon, Achdout et al. 2004). Das höchste Bindungsniveau an beide Rezeptoren zeigte das Virus A/Moscow/10/99 (H3N2). Vergleicht man die Wildtyp-Viren A/NewCaledonia/20/99 (H1N1) und A/Sachsen/1816/02 (H1N2), so war die Bindung des Rezeptors NKp44 an das H1N2-Isolat schwächer als an das H1N1-Virus. Dieser Unterschied wurde durch das rekombinante H1N2-„Referenzvirus“ rNC4-P7-M nicht sichtbar. Möglicherweise begünstigten die H1N2-spezifischen Mutationen des Hämagglutinins und möglicherweise auch der Neuraminidase des Wildtyp-H1N2-Virus die veränderte Bindung an den Rezeptor NKp44. In der Affinität zum Rezeptor NKp46 waren diese Unterschiede nicht erkennbar. Dieses Ergebnis deckte sich nur teilweise mit der Beobachtung des NK-Lyse-Experiments. Für das Wildtyp-Virus A/Sachsen/1816/02 konnte die geringere Reaktivität gegenüber NK-Zellen durch die schwächere Bindung an den NK-Rezeptor NKp44 erklärt werden. Für die getesteten rekombinanten H1N2-Viren traf diese Erklärung nicht zu. Die Bindung an die NK-Rezeptoren NKp44 und NKp46 war verglichen mit A/NewCaledonia/20/99 (H1N1) mit identischem HA-Protein gegenüber dem Rezeptor NKp44 unverändert bzw. näherte sich gegenüber NKp46 dem Bindungsniveau des H3N2-Virus A/Moscow/10/99 (H3N2) an. Aufgrund dieser Beobachtung konnte ein genereller Einfluss der N2-Neuraminidase auf die Reaktivität gegenüber NK-Zellen nicht ausgeschlossen werden. Nicht auszuschließen war weiterhin, dass neben NKp44 und NKp46 weitere NK-Rezeptoren die Reaktivität der NK-Zellen gegenüber zellulär exprimierten viralen Proteinen beeinflussten.

## 4 Diskussion

Die Influenzaaktivität in Europa während der Saison 2001/02 war mild bis moderat. Der Vergleich des europäischen Influenza-Netzwerks EISS (*European Influenza Surveillance Scheme*) mit historischen Daten beschrieb die Intensität als niedrig in sechs europäischen Ländern, als mittelstark in elf Ländern und als hoch in einem Land (Spanien) (Paget, Meerhoff et al. 2002). In Europa dominierten Influenza A-Viren des Subtyps H3N2. Die aus medizinischer Sicht eher „unauffällige“ Saison war jedoch aus virologischer Sicht durch zwei Reassortierungsereignisse gekennzeichnet: das Auftreten von reassortierten Influenza B-Viren der B/Victoria-Line und des neuen Subtyps H1N2 der Influenza A-Viren aufgrund eines Reassortierungsereignisses der Subtypen H1N1 und H3N2 (Lin, Gregory et al. 2004). Seit dem Wiederauftreten der H1N1-Viren 1977 koziirkulieren diese Viren. Es bestand demnach seit diesem Jahr die Möglichkeit, dass durch genetische Reassortierung H1N2-Viren aus einer Doppelinfektion von Menschen mit beiden Subtypen hervorgehen. In den 24 Jahren bis zum Auftreten der 2001/02-H1N2-Influenza A-Viren wurden derartige Stämme in einem Einzelfall 1983 (Nishikawa and Sugiyama 1983) und 1988/89 in 19 Fällen in sechs chinesischen Städten beschrieben (Guo, Xu et al. 1992). Diese wenigen Zahlen belegen die Seltenheit eines solchen Ereignisses. Gleichzeitig beschreiben sie auch die virologische Bedeutung der Entstehung von Virusreassortanten eines neuen Subtyps, der sich innerhalb kürzester Zeit über vier Kontinente verbreiten konnte und anhand von 890 untersuchten Viren in 51 Fällen in 41 Ländern nachgewiesen wurde (Xu, Smith et al. 2002). Aus einer Publikation im Jahre 2006 geht hervor, dass zu diesem Zeitpunkt Sequenzen von 56 H1N2-Viren aus Datenbanken verfügbar waren, die Daten weiterer 65 H1N2-Viren wurden in eine umfassendere Studie (siehe 4.9) mit einbezogen (Chen, La et al. 2006). Insgesamt wurden diese Viren also in geringer Anzahl, jedoch weltweit verbreitet isoliert.

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, den aus epidemiologischer Sicht besonderen Fall einer aus drei humanpathogenen Virusstämmen entstandenen Reassortante mit Hilfe molekularbiologischer Methoden zu untersuchen. Dabei war es wichtig, spezifische Eigenschaften von H1N2-Viren zu charakterisieren, die möglicherweise hinsichtlich ihrer weltweiten Verbreitung von Vorteil waren. Dafür sollten eigens hergestellte Virusreassortanten, in denen Segmente ursprünglich verschiedener Virusstämmen und Subtypen kombiniert wurden, zunächst anhand ihrer Replikationseigenschaften analysiert werden. Von Interesse war in diesem Zusammenhang, ob deren spezifische Komposition die Grundlage neuer Eigenschaften bildete. Als geeignete Methode für dieses Vorhaben, wurde die Generierung rekombinanter Influenza A-Viren mittels reverser Genetik gewählt. Es wurden drei revers-genetische Systeme für die parentalen

Stämme etabliert, aus denen H1N2-Viren entstanden waren. Mit Hilfe dieser „Acht-Plasmid-Systeme“ (ein Plasmidkonstrukt je Segment) konnten Viren generiert werden, die den natürlich auftretenden Stämmen entsprachen (rek A/NewCaledonia, rek A/Moscow und rek A/Panama). Sie wurden innerhalb dieser Arbeit als „rekombinante Wildtyp“-Viren bezeichnet. Im Falle des Subtyps H1N2 wurde das rekombinante Virus rNC4-P7-M als „Referenzvirus“ zum Wildtyp-Isolat A/Sachsen/1816/02 hergestellt.

#### **4.1 Die Herstellung von drei revers-genetischen Systemen aus den parentalen Referenzstämmen zur Gewinnung „rekombinanter Wildtyp“-Viren**

Zur Gewinnung „rekombinanter Wildtyp“-Viren aus Negativstrang-RNA-Viren wurde aus der RNA der drei parentalen Stämme von H1N2-Viren A/NewCaledonia/20/99 (H1N1), A/Moscow/10/99 (H3N2) und A/Panama/2007/99 (H3N2) jeweils ein Plasmidkonstrukt mit entsprechendem cDNA-Segment 1-8 erzeugt. Diese Plasmidkonstrukte waren die Voraussetzung für die Herstellung und Veränderung von „rekombinanten Wildtyp“-Viren und rekombinanten H1N2-Viren mittels reverser Genetik. Aus den vollständigen Acht-Plasmidsystemen der parentalen Virusstämme wurden die „rekombinanten-Wildtyp“-Viren rek A/Moscow (H3N2), rek A/Panama (H3N2) und rek A/NewCaledonia (H1N1) gewonnen. Um sicherzustellen, dass die Vermehrungsfähigkeit der rekombinanten Viren denen der Wildtyp-Viren entsprach, wurde ihre Replikationsfähigkeit miteinander verglichen. Die Replikationskurven der Abbildungen 3.4 A-C zeigten, dass die Replikationseigenschaften der drei „rekombinanten Wildtyp“-Viren sich nicht signifikant von denen der Wildtyp-Perreger unterschieden. Damit konnten Mutationen innerhalb der Segmente ausgeschlossen werden und sie konnten als Vergleichsviren zu anderen rekombinant erzeugten Viren eingesetzt werden. Für alle drei Plasmidsätze liegen vollständige Sequenzen vor, die anders als viele zu diagnostischen Zwecken sequenzierten Proben auch die vollständigen nichtkodierenden Regionen der Segmente (NCRs) enthalten. Sie wurden für die Stämme A/Moscow/10/99 und A/Panama/20/99 in der Influenza Datenbanken Los Alamos (FluLANL) eingereicht und sind über NCBI verfügbar (*Accession*-Nummern DQ486029; DQ487327–DQ487341).

#### **4.2 Das Einkreuzen der A/NewCaledonia-Polymerasesegmente und des NP-Segments in den Stamm A/Panama (H3N2) verändert dessen Replikationseigenschaften**

Die „Fitness“ eines Virus unterliegt verschiedenen polygenetischen Einflüssen. Neben der Antigen-*Drift* der beiden Glykoproteine HA und NA, der Rezeptorbindungsspezifität des Häm-

agglutinins und der Balance der Aktivitäten von HA und NA zueinander, bestimmt die Interaktion der anderen Influenzaproteine zueinander und mit ihren Wirtszellen diese virale Fitness. Neben der konkreten Fallstudie, die Eigenschaften der Viren des Subtyps H1N2 zu untersuchen, war es mit Hilfe der eigens hergestellten Plasmidsysteme möglich, den Einfluss einzelner Subtyp-fremder Gensegmente auf die Vermehrungsfähigkeit eines Virus zu analysieren. Dazu wurden Reassortanten aus Segmenten von Viren der Subtypen H3N2 und H1N1 hergestellt, deren Segmentaustausche nicht die Oberflächenglykoproteine HA und NA betrafen. Seit der Zirkulation von H1N1- und H3N2-Viren ab 1977 wurden sporadisch Reassortanten isoliert, die Gensegmente beider Subtypen enthielten (Young and Palese 1979; Nakajima, Cox et al. 1981; Guo, Xu et al. 1992). Beispielsweise zirkulierte von 1978-1980 eine H1N1-Reassortante mit den Polymerase- und NP-Genen, die von einem H3N2-Virus abstammten (Young and Palese 1979). Da jedoch im Fall des Subtyps H1N2 nur das HA-Segment von einem H1N1-Virus entstammte und sich in das Genom eines H3N2-Virus einfügte, wurden daran angelehnt die internen Gensegmente des parentalen H1N1-Stammes in zwei Viren des Subtyps H3N2 eingekreuzt. Die Reassortanten (Bild 3.5) mit Gensegmenten abstammend vom Stamm A/NewCaledonia (H1N1) wurden mittels reverser Genetik hergestellt und mit den Gensegmenten der Stämme A/Moscow bzw. A/Panama rekombiniert. Nur die internen Segmente NP, M, NS oder der Polymerasesatz PB2, PB1, PA zusammen mit dem NP-Segment wurden jeweils durch homologe Segmente des Stammes A/NewCaledonia (H1N1) ersetzt. Die Gewinnung von zwei Viren, die nur die Segmente PB2, PB1 und PA, nicht aber das NP-Segment von A/NewCaledonia enthalten sollten, gelang indes nicht. Um zu erklären, ob dieser Umstand auf eine verminderte Aktivität der A/NewCaledonia-Polymeraseproteine in Anwesenheit eines A/Moscow- oder A/Panama-NP-Proteins zurückzuführen ist, wurden wie unter Punkt 4.3 diskutiert Luziferase-Expressions-Experimente mit den Polymerase- und NP-Segmenten der Stämme durchgeführt.

Die Herstellung der Reassortanten sollte zunächst klären, ob die Segmente überhaupt zueinander kompatibel sind und damit die Gewinnung replikationsfähiger Viren gelingt. Darauf folgend wurde das Replikationsverhalten aller erzeugten Reassortanten mit den „rekombinanten Wildtyp“-Viren verglichen. Die Replikationskurven (Bild 3.9 A+B) zeigten deutlich, dass je nach H3N2-„Hintergrund“ kein einheitliches Replikationsverhalten der auf A/Moscow- oder A/Panama-basierenden Reassortanten vorliegt. Die H3N2-Reassortanten des Stammes A/Moscow (Bild A) wichen in ihrer Replikationskinetik nicht mehr als eine halbe log-Stufe (rNC7-M) bzw. gar nicht vom „rekombinanten Wildtypvirus“ rek A/Moscow ab. Da der Mittelwert der maximalen Titer des Virus rNC7-M bei annähernd  $10^9$  ffu/ml liegt, wurde das Replika-

tionsverhalten der Virusreassortante nicht als eingeschränkt bewertet. Ein sehr viel differenzierteres Bild zeigten dagegen die Virusreassortanten mit H1N1-Segmenten innerhalb des verwandten A/Panama-Virus (H3N2). Die „inter-Subtyp-Reassortanten“ (d.h. die Virusreassortanten setzen sich aus Gensegmenten zusammen, die Viren **unterschiedlicher** Subtypen entstammen, z.B. Segmenten aus A/H1N1- und A/H3N2-Viren), die entweder das Nukleoproteinsegment oder die Polymerasesegmente zusammen mit dem NP-Segment des H1N1-Virus enthielten, zeigten eine verminderte Replikationsfähigkeit verglichen mit dem rek A/Panama-Virus. Das Virus mit eingekreuztem A/NewCaledonia-NP-Segment (rNC5-P) erreichte über den Zeitraum von 24-48 h nur zehnfach niedrigere Virustiter als der „rekombinante Wildtyp“. Die Virusreassortante mit Polymerase- und NP-Segmenten des A/NewCaledonia-Virus (rNC1/2/3/5-P) zeigte ein noch stärker verzögertes Wachstum, das 24 h nach der Infektion 100-fach unter dem Virustiter des Wildtyps lag. Der Einfluss der H1N1-Polymerasesegmente und des NP-Segments schien sich in diesem Fall zu addieren. Ebenfalls war durch den Einfluss des A/NewCaledonia-NS-Segments ein verzögertes Replikationsverhalten des A/Panama-Stammes bis zu einem Zeitpunkt von 24 h erkennbar. Diese Reassortante (rNC8-P) erreichte jedoch nach 36 h die gleichen Virustiter wie der „rekombinante Wildtyp“. Generell lassen beide Experimente die eindeutige Aussage zu, dass die „Inter-Subtyp-Reassortanten“ mit internen homologen Gensegmenten des H1N1-Stammes A/NewCaledonia meist zu ähnlichen Titern wie der Wildtyp, teilweise mit leichter Einschränkung replizieren konnten. Keine der Virusreassortanten war replikationsdefizient. Die Subtyp-fremden Gensegmente beeinflussten das Replikationsverhalten jedoch in keinem Fall positiv, das heißt sie führten im Vergleich zum Wildtyp in keinem Fall zu einem höheren Virustiter. Nur sehr selten konnten bislang H1N1-Subtyp-Reassortanten mit den internen Gensegmenten PB2, PB1, PA, NP eines H3N2-Virus isoliert werden. Diese Tatsache stützt die Vermutung, dass durch den Austausch Subtyp-fremder interner Gensegmente selten Virusreassortanten entstehen, die sich epidemiologisch gegenüber Reassortanten mit Gensegmenten des gleichen Subtyps durchsetzen können. Im Gegensatz dazu können „intra-Subtyp-Reassortanten“ (d.h. die Virusreassortanten setzen sich aus Gensegmenten zusammen, die Viren des **gleichen** Subtyps entstammen), großen Einfluss auf die Intensität der jährlichen Influenzaepidemien, sowohl bei H1N1-, als auch bei H3N2-Viren ausüben (Schweiger, Bruns et al. 2006; Nelson, Viboud et al. 2008). So ergaben genetische Analysen für beide Subtypen, dass eine Vielzahl phylogenetischer Gruppen (*clades*) und Untergruppen bzw. Stämme eines Subtyps häufig kozirkuliert und reassortiert. Dadurch ist die genetische Reassortierung neben der Antigen-*Drift* ein wichtiger Schlüsselmechanismus der genetischen Evolution der Viren. Durch die hohe Variabilität kozirkulierender Viren kommt es innerhalb eines Subtyps zu einem häufigen Austausch von Gensegmenten, die interne und externe Proteine kodieren und daher

zu einem schnellen Voranschreiten der genetischen Evolution der Viren. Diese schnelle Weiterentwicklung führt bei „intra-Subtyp-Reassortanten“ schnell zu einem Zustand der „besten evolutionären Fitness“ (Schweiger, Bruns et al. 2006), der durch die seltene Aufnahme interner Gensegmente eines anderen Subtyps kaum erreicht werden kann. Auffällig war weiterhin der Einfluss der H1N1-Segmente je nach Virus-„Hintergrund“. Reassortanten des Stammes A/Panama zeigten ein abweichendes Replikationsverhalten, während der Einfluss der H1N1-Segmente auf das rek A/Moscow-Virus auf Replikationsebene kaum erkennbar war. Die funktionelle Interaktion war damit nicht nur vom Subtyp, sondern den genetischen Besonderheiten des einzelnen Stammes abhängig. Man kann daher schlussfolgern, dass durch das Einkreuzen eines bestimmten Segments, z.B. des A/NewCaledonia-NP-Segments in ein H3N2-Virus keine einheitliche Charakterisierung abgeleitet werden kann.

### **4.3 Die Nukleoproteine der Stämme A/Moscow und A/Panama (H3N2) reduzieren die Aktivität des H1N1-Polymerasekomplexes des Stammes A/NewCaledonia**

Die Replikation und Transkription eines vRNA-ähnlichen Reportergenkonstrukts (Luziferase) wird durch die viralen Proteine PB2, PB1, PA und NP bestimmt. Um das Maß der Kompatibilität zwischen den Polymeraseproteinen und dem Nukleoprotein zwischen den einzelnen Subtypen zu bestimmen, wurden 293T-Zellen sowohl mit dem NP-Plasmid des gleichen Stammes, als auch mit den beiden NP-Plasmiden der Subtypen A/Moscow und A/Panama (beide H3N2) transfiziert. Die Messergebnisse zeigten, dass die Aktivität der drei Polymeraseproteine zusammen mit dem A/Moscow- oder A/Panama-Nukleoprotein zu einer um ca. 50 % reduzierten Expression des Reporterenzym Luziferase führten. Das Zusammenwirken der viralen Polymeraseproteine mit dem H3N2-Nukleoprotein war demnach funktionell, führte aber nicht zu einer optimalen Replikation des vRNA-ähnlichen Konstrukts. Da Viren mit dieser Segmentkonstellation (rNC1/2/3-M und rNC1/2/3-P) auch nach mehrfacher Transfektion von funktionellen cDNA-Plasmiden nicht erzeugt werden konnten, wird spekuliert, dass sich die suboptimale Replikation und Transkription der einzelnen vRNAs negativ auf die Gewinnung solcher Reassortanten auswirkte. Grundsätzlich ist deren Erzeugung anhand der um 50 % eingeschränkten, aber vorhandenen Replikationsfähigkeit nicht auszuschließen. Die Messergebnisse bezogen sich auf die Gewinnung von Viren aus der Zellkultur. Die Entstehung ähnlicher Reassortanten unter natürlichen Bedingungen unterliegt vielfältigen Einflüssen. Bisher wurden in der Literatur nur einmal Reassortanten des Subtyps H1N1 mit einer derartigen Genkonstellation beschrieben: Die H1N1-A/California/10/78-ähnlichen Isolate der Saison 1978/79 (Young and Palese

1979; Nakajima, Cox et al. 1981) enthielten ebenfalls die Polymeraseproteine und das Nukleoprotein eines Virus vom Subtyp H3N2. Sie entstanden vermutlich durch natürliche Rekombination aufgrund einer Doppelinfection mit den zwei Influenza A-Virus-Subtypen. Da es nicht gelang, Reassortanten des Subtyps H3N2, die nur die drei Polymeraseproteine, nicht jedoch das Nukleoprotein des A/NewCaledonia-Stammes enthielten herzustellen, war ein Vergleich mit den Replikationseigenschaften der Reassortanten die zusätzlich das A/NewCaledonia-NP-Segment enthielten nicht möglich.

#### **4.4 Die Replikationseigenschaften von Wildtyp- und rekombinanten Viren des Subtyps H1N2 unterscheiden sich aufgrund genetischer Mutationen**

Um Eigenschaften der H1N2-Viren, die in den Jahren 2001-2003 zirkulierten näher zu analysieren, wurde zunächst ein „Abbild“ eines Wildtyp-H1N2-Isolates generiert. Aus den cDNA-Plasmidkonstrukten für die Segmente PB2 (1), PB1 (2), PA (3), NP (5), NA (6) und NS (8) des H3N2-Stammes A/Moscow, dem Konstrukt des M-Segments (7) des H3N2-Stammes A/Panama und dem HA-Segment (4) des H1N1-Stammes A/NewCaledonia, wurde das rekombinante „Referenzvirus“ rNC4-P7-M (H1N2) hergestellt.

Über die Replikationseigenschaften von H1N2-Viren war zu Beginn dieser Arbeit nichts bekannt. In Veröffentlichungen waren H1N2-Viren bis dato aufgrund diagnostischer und epidemiologischer Fragestellungen lediglich anhand ihrer Neutralisierbarkeit durch H1- und H3-Antisera im Hämagglutinations-Hemmtests (HHT) bewertet worden. Replikationskinetiken anzufertigen, war daher ein wichtiger erster Schritt zur Einschätzung ihres pathogenen Potentials verglichen mit den parentalen Stämmen A/Moscow (H3N2) und A/NewCaledonia (H1N1). Die Replikationskurve (Bild 3.11 A) zeigte bemerkenswert hohe Virustiter von ca.  $10^9$  ffu/ml für das Wildtyp-H1N2-Isolat A/Sachsen/1816/02 und das rekombinante A/Moscow-Virus (H3N2). Das rekombinante „Referenzvirus“ rNC4-P7-M erreichte nur geringfügig geringere Titer von bis zu  $4 \times 10^8$  ffu/ml und entsprach damit eher dem Replikationsverhalten des parentalen H1N1-Virus, wenn auch bis zu einem Zeitpunkt von 24 h *p.i.* mit einem um ca. 0,5 log-Stufen niedrigeren Titer. Beide parentalen H3N2-Viren replizierten auf MDCK II-Zellen zu höheren Titern als Viren des Stammes A/NewCaledonia (H1N1).

Das rekombinante „Referenzvirus“ rNC4-P7-M besaß demnach in Zellkultur zwar ähnliche Vermehrungseigenschaften wie das natürliche Isolat der H1N2-Viren, jedoch keine identischen. Hergestellt wurde dieses Virus aus den einzelnen Segmenten der parentalen Stämme, denen jedes Segment anhand der Stammbaumanalyse (Gregory, Bennett et al. 2002; Xu, Lind-

strom et al. 2004; Al Faress, Cartet et al. 2005) am ähnlichsten war. Alle H1N2-Isolate der Jahre 2001-2003 hatten spezifische Mutationen gemeinsam, die in verschiedenen Segmenten manifestiert waren und die sie von ihren parentalen Stämmen unterscheidbar machten. Das **HA**-Segment des Isolates A/Sachsen/1816/02 enthielt die typischen Mutationen: **V196A**, **A193T** und **A218T**. Es waren weitere Mutationen aus Isolaten anderer H1N2-Stämme bekannt, sie traten jedoch nur vereinzelt auf, während diese drei Mutationen in nahezu allen H1N2-Isolaten verankert waren. Für die **Neuraminidase** gelten die Mutationen P267L (die jedoch auch bei anderen H3N2-Viren abgeleitet von A/Moscow z.B. A/Singapore/15/01 (H3N2) schon auftraten), **E199K** und **K431N** als spezifisch. Weiterhin identifiziert wurde (siehe Tabelle 3.1) die Mutation K83E. Die Aminosäureaustausche im M1: R174K und A218T traten auch im Segment A/Panama auf und symbolisieren, anders als in einigen Publikationen beschrieben, die nähere Verwandtschaft des M-Segments der H1N2-Viren zum Stamm A/Panama (Gregory, Bennett et al. 2002; Goddard, Joseph et al. 2004). Die Mutation der Aminosäure Cystein im **M2**-Ionenkanal zu Tyrosin (**C17T**) ist spezifisch für humanpathogene H1N2-Viren, jedoch nicht assoziiert mit einer Resistenzbildung gegen Adamantane. Diese insgesamt sechs Aminosäureaustausche verteilt über drei Segmente der H1N2-Wildtypisolate, führten auf Replikationsebene zu ca. zehnfach höheren Titern gegenüber dem rekombinanten „Referenzvirus“. Wahrscheinlich ist daher, dass sie eine Veränderung der HA- zu NA-Balance bewirkten (Wagner, Matrosovich et al. 2002; Lu, Zhou et al. 2005), die wiederum zu einer verbesserten Vermehrungsfähigkeit der Wildtyp-H1N2-Isolate führte und damit zur weltweiten Verbreitung der Viren beitrug.

#### **4.5 Der Austausch des NA- oder M-Segments oder des Virushintergrundes verändert die Replikationseigenschaften des rekombinanten „Referenzvirus“ rNC4-P7-M (H1N2)**

Um den Einfluss der spezifischen Zusammensetzung der H1N2-Viren aus drei parentalen Stämmen auf deren Vermehrungsfähigkeit zu untersuchen, wurden weitere H1N2-Reassortanten generiert. Die Segment- bzw. Genkombination des „Referenzvirus“ wurde dazu nach drei Fragestellungen verändert:

**(1)** Welchen Einfluss hat der Austausch des Oberflächenglykoproteins Neuraminidase durch ein NA-Segment des gleichen Subtyps, aber eines anderen Stammes (N2)? Um diese Frage beantworten zu können, wurde eine Reassortante erzeugt, die das N2-NA-Segment des Stammes A/Panama anstatt des NA-A/Moscow enthielt (rNC4-**P6**/7-M). Die genetische Reassortierung, gilt als wichtiger Faktor der genetischen Evolution von Influenza A-Viren. Da der Austausch zwischen NA-Segmenten von H3N2-Stämmen bislang häufig nachgewiesen wurde, symboli-

sierte diese Reassortante eine genetische Weiterentwicklung der damaligen H1N2-Isolate und ermöglichte den Vergleich der HA- zu NA-Balance des H1N2-Referenzvirus mit dem N2-NA eines anderen Stammes (Xu, Cox et al. 1996; Al Faress, Ferraris et al. 2008). Durch das seltene Auftreten der H1N2-Viren und den dadurch geringen Vergleichsmöglichkeiten zu anderen H1N2-Isolaten mit abweichender Genkonstellation, konnte anhand dieses Austauschs die Funktionalität des H1-HA zum N2-NA durch Replikationskinetiken näher untersucht werden. Die Bestimmung der Rezeptoraffinität des HA-Proteins und Substratspezifität des NA-Proteins ermöglichten darüber hinaus einen direkten Vergleich mit anderen Eigenschaften des „Referenzvirus“ rNC4-P7-M.

**(2)** Welche Bedeutung hat die Verwandtschaft des M-Segments der WT-H1N2-Viren zum Stamm A/Panama/10/99 (H3N2)? Mit dem Ersatz des A/Panama-M-Segments durch homologe M-Segmente sollte untersucht werden, ob die weltweite Verbreitung einer „6+1+1-Reassortante“ eher als spezifische Selektion oder als Produkt eines zufälligen Reassortierungsereignisses eines H1-HA mit einer H3N2-inter-Subtyp-Reassortante einzuschätzen ist. Erzeugt wurde ein rein A/Moscow-basiertes Virus des Subtyps H1N2, die „7+1-Reassortante“ rNC4-M. Das Virus rNC4/7-M ersetzte im Gegensatz dazu das A/Panama-M-Segment passend zum ebenfalls in der Virushülle verankerten HA durch das des Stammes A/NewCaledonia („6+2-Reassortante“).

Bei drei weiteren Viren wurden ausgehend vom „Referenzvirus“ rNC4-P7-M weitere interne A/Moscow-Segmente (PB2/PB1/PA; NP bzw. NS) neben dem M-Segment durch die des A/Panama-Stammes ersetzt (rNC4-P1/2/3/7-M; rNC4-P5/7-M; rNC4-P7/8-M). Anhand dieser Viren sollte der spezifische Einfluss der Gensegmente des A/Panama-Stammes und die Kompatibilität von H3N2-basierten-inter-Subtyp-Reassortanten mit dem H1-HA nachvollzogen werden.

**(3)** Wie wirkt sich die Veränderung des H3N2-Virus-„Hintergrundes“, der das H1-HA adaptierte auf die Replikationsfähigkeit des Virus aus? Dazu wurde das Virus rNC4-P generiert. Es enthielt sieben Gensegmente des H3N2-Stammes A/Panama anstelle der dominant A/Moscow-basierten internen Gensegmente des „Referenzvirus“. Hinter dem Vorhaben die Reassortante rNC4-P zu generieren, stand weiterhin die Absicht, die Wahrscheinlichkeit einer natürlichen Entstehung von A/Panama-Viren mit adaptiertem H1-HA damals zirkulierender Stämme einzuschätzen.

Von diesen sieben H1N2-Reassortanten bewirkten die Austausche in vier Viren ein abweichendes Replikationsverhalten im Vergleich zum „Referenzvirus“ (Bild 4.1). Der Austausch des

## Diskussion

A/Moscow-NA-Segments durch das homologe A/Panama-NA (rNC4-P6/7-M) führte ebenso zu höheren Virustitern wie der Ersatz des A/Panama-M-Segments durch das homologe A/Moscow-M-Segment (rNC4-M). Dagegen führte das Einkreuzen des A/NewCaledonia-M-Segments zu leicht verringerten Titern (rNC4/7-M). Das H1N2-Virus rNC4-P, basierend auf einem A/Panama-„Hintergrund“ zeigte sich im Vergleich zum „Referenzvirus“ stärker eingeschränkt.

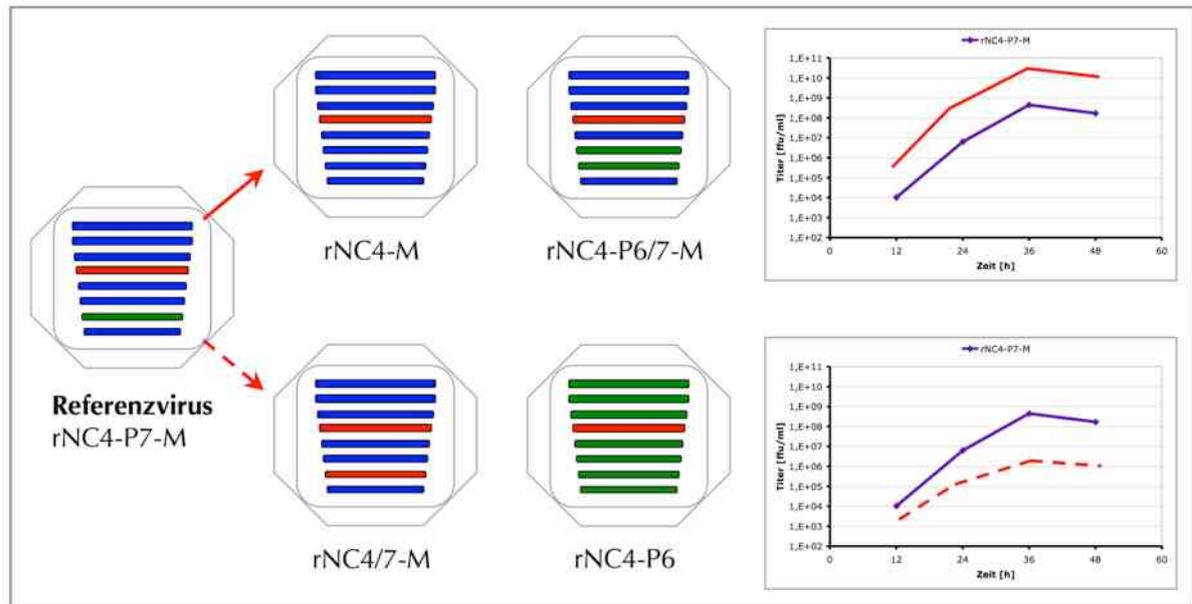


Bild 4.1: **Der Einfluss homologer Gensegmente auf die Replikationseigenschaften des rekombinanten „Referenzvirus“ rNC4-P7-M (H1N2).** Das Einkreuzen des A/Moscow-M-Segmentes an Stelle des A/Panama-M-Segments und das Ersetzen der A/Moscow-Neuraminidase durch die N2-Neuraminidase des Stammes A/Panama verbesserten die Replikationsfähigkeit der jeweiligen H1N2-Reassortante im Vergleich zum „Referenzvirus“. Dagegen erreichte eine Reassortante, die statt des A/Panama-Segments das homologe A/NewCaledonia-Segment enthielt etwas niedrigere Endtitern als das „Referenzvirus“. Noch stärker eingeschränkt war die Replikationsfähigkeit der H1N2-Reassortante, deren Genom aus sieben Segmenten des Stammes A/Panama und dem H1-HA des Stammes A/NewCaledonia rekombiniert wurde.

Bemerkenswert war zunächst die bessere Replikationsfähigkeit des Virus rNC4-P6/7-M, dem H1N2-Virus mit dem A/Panama-NA-Segment (Bild 3.11 B). Die Neuraminidase-Segmente der Stämme A/Moscow/10/99 und A/Panama/2007/99 unterscheiden sich auf Aminosäureebene in acht Aminosäuren und besitzen eine Sequenzidentität von 98,4 Prozent. Es zeigte sich anhand dieser H1N2-Variante deutlich, dass das HA-Segment von A/NewCaledonia/20/99 grundsätzlich mit beiden Neuraminidase-Segmenten der 1999-dominanten H3N2-Stämme kompatibel war. Zusätzlich gestützt wurde diese These durch das Auftreten eines einzelnen H1N2-Isolats im Jahr 2003 in Frankreich. Dabei handelte es sich um die Adaption eines A/Moscow-ähnlichen N2-NA, abstammend von einem damals zirkulierenden H1N2-Virus durch ein H1N1-Virus. Es entstand somit eine „7+1-Reassortante“ mit sieben Segmenten eines H1N1-Virus und einem N2-NA-Gen (Al Faress, Ferraris et al. 2008). Anhand des Replikationsvergleichs der beiden H1N2-Reassortanten rNC4-P7-M und rNC4-P6/7-M, die sich ausschließ-

lich im NA-Segment unterschieden wurde deutlich, dass die Rezeptor-zerstörende Komponente des A/Panama-NA dem H1N2-Virus zu einer besseren Vermehrungsfähigkeit verhalf. Anhand der Substratspezifität der Neuraminidasen beider Viren hinsichtlich der Affinität zu  $\alpha$ 2-6-verbundenen Sialinsäuren, waren keine Unterschiede erkennbar (Bild 3.19 und 4.7). Der Grund für die erhöhte Replikationsfähigkeit des Virus rNC4-P6/7-M kann demzufolge in der spezifisch veränderten Balance des HA zu NA-Verhältniss vermutet werden. Möglicherweise führten die AS-Unterschiede der Neuraminidase zu einer erhöhten NA-Aktivität des Virus rNC4-P6/7-M. Wie von Lu *et al.*, beschrieben, sind schon wenige Aminosäure-Veränderungen in den Oberflächenglykoproteinen HA und NA ausreichend, um deren Balance zueinander signifikant zu verändern. Die in diesem spezifischen Fall für das Virus A/Fujian/411/02 (H3N2) beschriebenen Aminosäuren E119Q, Q136K und H347Y sind allerdings in den Neuraminidase-Segmenten der Stämme A/Moscow/10/99 und A/Panama/2007/99 konserviert (Lu, Zhou *et al.* 2005). Auch Wagner *et al.*, zeigten in ihrer Studie, dass Aminosäureaustausche in (N2)-Neuraminidasen die Replikationsfähigkeit von Viren deutlich beeinflussen können. Die sogenannten kompensatorischen Mutationen beeinflussen das sensible Gleichgewicht der antagonistischen Funktionen von HA und NA. So können Mutationen des Neuraminidasegens die Replikationsfähigkeit eines Virus mit verminderter Rezeptorbindungsfähigkeit des HA durch verringerte NA-Aktivität kompensieren. Desweiteren wurde gezeigt, dass N2-Neuraminidasen eine höhere Aktivität als N1-Neuraminidasen besitzen (Wagner, Wolff *et al.* 2000; Wagner, Matrosovich *et al.* 2002). Die Aminosäure-Unterschiede zwischen NA-Moscow und NA-Panama betrafen keine Glykosylierungsstellen.

Ebenfalls signifikant wirkte sich neben dem Austausch des NA-Segments der Austausch des M-Segments aus, das für das Matrixprotein (M1) und den Ionenkanal (M2) kodiert. Deutlich zeigte sich, dass der Ersatz des A/Panama-M-Segments durch das A/Moscow-M-Segment hin zu einer „7+1“-Reassortante, d.h. bestehend aus Segmenten von nur zwei statt drei Virussubtypen, zu einer schnelleren Replikation mit 1,5 bis 2 log-Stufen höheren Titern nach 24 h führte (Bild 3.12). Beachtenswert ist in diesem Zusammenhang, dass auch die in China im Jahr 1989 isolierten H1N2-Viren „7+1-Reassortanten“ waren (sieben Segmente eines H3N2-Virus, die ein H1-HA adaptierten) (Guo, Xu *et al.* 1992). Die zwischen 2001 und 2003 zirkulierenden „6+1+1-Reassortanten“ (bestehend aus Segmenten, die drei Stämmen zugeordnet werden konnten) waren demnach zwar hochreplikative H1N2-Viren, das A/Panama-ähnliche-M-Segment verschaffte dem H1N2-Virus jedoch höchstwahrscheinlich keine weiteren replikativen Vorteile. Einen Hinweis auf die Gründe, warum diese Genkonstellation dennoch entstand, gibt die Arbeit von Schweiger *et al.*, die intra-Subtyp-spezifische Reassortierungen von H3N2-Viren dieser

Zeit untersucht. Darin wird beschrieben, dass das A/Panama-M-Segment in der Zeit der Entstehung von H1N2-Viren, in den Jahren 1999-2000 in allen H3N2-Viren vorherrschend war, während M-Moscow-Gensegmente die Saison 1998-1999 dominierten (Schweiger, Bruns et al. 2006). Es ist deshalb davon auszugehen, dass die weltweite Verbreitung einer „6+1+1-Reassortante“ entstand, indem eine H3N2-intra-Subtyp-Reassortante das HA-Segment des Stammes A/NewCaledonia aquirierte. Die spezifische Genkonstellation, die eine Verwandtschaft zu drei Referenzstämmen des Jahres 1999 zeigte, hatte daher keinen positiven Einfluss auf die Replikationsfähigkeit der H1N2-Viren. Trotz der insgesamt sehr hohen Replikationsfähigkeit der H1N2-Viren, kann daher kein unmittelbarer Zusammenhang zwischen der spezifischen Kombination der Segmente aus ursprünglich drei Stämmen und der weltweiten Verbreitung der Viren hergestellt werden.

Das Hämagglutinin auf der Virusoberfläche ist über seinen cytoplasmatischen Teil mit dem M1-Matrixprotein verbunden. Daher wurde getestet, inwiefern sich der Austausch des A/Panama-M-Segments durch das des Stammes A/NewCaledonia/10/99 auf die Replikationsfähigkeit des Virus rNC4/7-M auswirkt. Die Replikationskurve in Bild 3.13 zeigte deutlich, dass sich durch diese Gensegmentkonstellation im Vergleich zum Referenzvirus rNC4-P7-M keine replikativen Vorteile ergaben. Das Virus rNC4/7-M erreichte Titer, die geringfügig (0,5 log-Stufen) unter der des „Referenzvirus“ lagen. Damit stellte sich heraus, dass der genetische „Hintergrund“ des A/Moscow-Stammes (H3N2) die höchste Kompatibilität zum H1-HA des Stammes A/NewCaledonia zeigte. Das Einkreuzen eines weiteren subtyp-fremden internen Gensegments führte auch hier zu einer leichten Verminderung der Replikationsfähigkeit. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Beobachtung aus Punkt 3.4. Auch hier zeigte keine Reassortante eine verbesserte Replikationsfähigkeit bei Einführung eines Subtyp-fremden internen M-Segments bzw. A/NewCaledonia-Gensegments allgemein.

Anhand der grundsätzlichen Kompatibilität des H1-HA zum N2-NA stellte sich zusätzlich die Frage, ob ein H1N2-Virus ebenso durch Kombination eines H1-HA mit sieben Segmenten des A/Panama-Stammes (H3N2) hätte entstehen können. Die Replikationskurve eines solchen Virus (rNC4-P) zeigte allerdings, dass es zu deutlich geringeren Titern als Viren mit A/Moscow-dominiertem Genkonstellation (rNC4-P7-M und rNC4-M) replizierte. Die maximalen Titer blieben nach 36 h um 1,5 log-Stufen im Vergleich zu rNC4-P7-M bzw. 2 log-Stufen zu rNC4-M zurück. Dieses Replikationsverhalten legt nahe, dass ein solches Virus sich gegenüber anderen H1-Viren vermutlich nicht hätte behaupten können. Etwa 70 % der in der Saison 1998/99 isolierten H3N2-Stämme waren Reassortanten mit drei dominierenden Linien (*clades*). In der darauf folgenden Saison 99/00, waren die Referenzstämme A/Moscow/10/99 (*clade B*) und

A/Panama/20/99 (*clade C*) vorherrschend (Schweiger, Bruns et al. 2006). Aufgrund der Tatsache, dass die meisten der untersuchten H3N2-Viren der Saison 1998/99 aus verschiedenen Virus-„Linien“ reassortiert waren, ist es um so unwahrscheinlicher, dass H1N2-Virusreassortanten mit einem reinen A/Panama-„Hintergrund“ entstanden wären.

#### **4.6 Die schwächere Expression der viralen Proteine PB1, NP, M1 und NS1 des rekombinanten „Referenzvirus“ rNC4-P7-M (H1N2) korreliert mit dessen verzögerter Replikation im Vergleich zum Wildtyp H1N2-Virus**

Unter Punkt 3.5 wurden im Ergebnisteil die Replikationskurven der beiden H1N2-Viren A/Sachsen/1816/02 und des rekombinanten „Referenzvirus“ rNC4-P7-M vergleichend dargestellt. Es konnte dabei gezeigt werden, dass das rekombinante Virus im zeitlichen Verlauf nach 12 h 1,5 log-Stufen, zum Zeitpunkt des höchsten erreichten Titters (nach 36 h) nur noch 0,5 log-Stufen unter dem Titer des Wildtyp Virus liegt. Um zu überprüfen, ob diese Beobachtung im Zusammenhang mit Expression viraler Proteine steht, wurden die Expressionslevel der Proteine PB1, NP, M1 und NS1 quantitativ verglichen. Dazu wurden Zellen mit gleicher Multiplizität (MOI=1) mit H1N1, H3N2 und H1N2-Wildtyp-Viren sowie den beiden rekombinanten Viren, dem H1N2-„Referenzvirus“ (rNC4-P7-M) und der Mutante infiziert, welche das NA-Segment des Stammes A/Panama enthielt (rNC4-P6/7-M). Die Expressionslevel wurden anhand von Zelllysaten im zeitlichen Verlauf von vier bis acht Stunden im Western Blot analysiert (Bild 3.16). Es zeigte sich, dass im direkten Vergleich des Wildtyp-H1N2-Virus A/Sachsen/1816/02 zum rekombinanten „Referenzvirus“ rNC4-P7-M, die viralen Proteine PB1, NP und M1 deutlich schwächer und das NS1-Protein leicht vermindert exprimiert wurde. Das Matrixprotein zeigte im zeitlichen Verlauf weiterhin gleichbleibende, jedoch keine ansteigenden Expressionslevel. Die Expression des zellulären Proteins Tubulin war hingegen vergleichbar. Das Nukleoprotein ist ebenso wie das Polymeraseprotein PB1 essentieller Bestandteil der Virusreplikation und wird schon in sehr frühen Phasen der Infektion benötigt. Das Matrixprotein dagegen wird in späteren Replikationsphasen (ab 2,5 h) des Virus verstärkt exprimiert und ist unabdinglich für die Verpackung der Viruspartikel. Das NS1-Protein, welches als wichtiger Faktor das Interferonsystem der Wirtszelle antagonisiert, hat ebenfalls großen Einfluss auf die Replikationsfähigkeit des Virus. Die (innerhalb von 48 h) verzögerte Replikation des rekombinanten „Referenzvirus“ korreliert in diesem Fall mit der schwächeren Expression aller vier analysierten viralen Proteine.

#### **4.7 Die Bindungsaffinität des Hämagglutinins und die Substratspezifität der Neuraminidase der getesteten H1N1- und H1N2-Viren unterscheiden sich gegenüber den (künstlichen) Rezeptoren 3'SLN, 6'SLN und 6'SL nicht signifikant**

Die Infektion der Wirtszelle durch Influenzaviren beginnt mit der Bindung des viralen HA-Glykoproteins an die endständigen Sialinsäuren der Wirtszelle. Am Ende des Infektionszyklus werden dagegen Sialinsäuren von Virus und Wirtszelle durch die Neuraminidase hydrolytisch gespalten, was zu einer effizienten Freisetzung des Virus führt. Um herauszufinden, welche Besonderheiten der H1N2-Viren zu ihrer Verbreitung beitrugen, wurden die rezeptorbindenden Eigenschaften des HA und die Substratspezifität der Neuraminidase gegenüber den Rezeptoranaloga 3'SLN, 6'SLN und 6'SL von H1N1- und H1N2-Viren verglichen. Die Rezeptoraffinität des HA der H1-Viren wurde weiterhin mit den kozirkulierenden H3N2-Viren A/Moscow und A/Panama verglichen. Wie die Ergebnisse unter Punkt 3.8.1 zeigten, entsprach die HA-Affinität der getesteten Viren dem aus der Literatur bekannten Bindungsverhalten humanpathogener Influenzaviren (Gambaryan, Tuzikov et al. 1997; Mochalova, Gambaryan et al. 2003). Sie hatten ihre stärkste Affinität gegenüber dem Rezeptor 6'SLN, eine weniger starke gegenüber 6'SL und zeigten eine schwache Bindung an 3'SLN, den bevorzugten Rezeptor aviärer Influenzaviren. Darüber hinaus variierten die verschiedenen HA-Proteine in ihrer Bindungsaffinität gegenüber dem Rezeptor, angegeben durch die Affinitätskonstante  $K_{\text{aff}}$ . So zeigte das HA des Stammes A/Panama die stärkste Bindung an 6'SLN. Die WT-Viren A/Moscow/10/99 (H3N2), A/NewCaledonia/20/99 (H1N1) und A/Sachsen/1816/02 (H1N2) unterschieden sich gegenüber den getesteten Sialylglykokonjugaten, die ihren natürlichen Rezeptoren entsprechen (6'SLN und 6'SL) nicht signifikant. Beide H1-Viren exprimierten ein ähnliches Hämagglutinin auf ihrer Virusoberfläche. Die H1N2-spezifischen Mutationen wirkten sich demnach nicht signifikant auf die Rezeptorbindung des Virus aus. Das rekombinante H1N2-„Referenzvirus“ rNC4-P7-M zeigte dagegen eine leicht erhöhte Affinitätskonstante gegenüber dem Rezeptoranalogen 6'SL. Diese nicht signifikante Abweichung könnte möglicherweise auf eine Veränderung während der Passagierung des Virus auf MDCK II-Zellen zurückzuführen sein.

Das Virus rNC4-P zeigte nur eine schwache Bindung an 6'SLN. Es replizierte als einziges gestetetes Virus schwächer als das rekombinante „Referenzvirus“ rNC4-P7-M. Obwohl beide rekombinante H1N2-Viren dasselbe HA-Segment enthielten wie das rekombinante A/NewCaledonia-Virus (H1N1), war dessen Affinitätskonstante im Vergleich ca. 50 % kleiner. Da für das Assay keine aufgereinigten HA-Proteine, sondern gereinigte Viren verwendet wurden, ist trotz des im Assay verwendeten Neuraminidasehemmers (Oseltamivir) eine sterische Hinderung der Bindung durch die Neuraminidase theoretisch denkbar. Wahrscheinlicher er-

scheint jedoch, dass auf der Virusoberfläche weniger HA-Moleküle exprimiert werden, die dieses Resultat erklären könnten.

Schlussfolgend kann daher die weltweite Verbreitung der H1N2-Viren nicht durch Veränderungen in der Rezeptorbindung im Vergleich zu H1N1-Viren erklärt werden. Parallel dazu wurden mögliche Unterschiede in der Substratspezifität von N1- und N2-Neuraminidasen anhand der WT-H1N1, WT-H1N2 und zwei rekombinanten H1N2-Viren untersucht. Obwohl für das H1N2-Virus typische Aminosäureunterschiede der Neuraminidase bekannt waren, zeigten sich durch diese Aminosäureunterschiede (Tabelle 3.1) keine Veränderungen hinsichtlich der Spaltung von 3'SLN-, 6'SLN- und 6'SL- gebundenen Sialinsäuren zwischen N1- und N2-Neuraminidasen der humanpathogenen Virussubtypen H1N1 und H1N2. Die Spezifität der Neuraminidasen entsprach den Angaben der Literatur. Demnach besitzen alle Influenza A-Viren die höchste Substratspezifität gegenüber 3'-verknüpften Sialinsäuren. Ihre Substratspezifität gegenüber 6'-Rezeptoren ist generell schwächer (Katinger, Mochalova et al. 2004). Deutlich jedoch unterschieden sich die humanpathogenen Viren vom ebenfalls getesteten aviären Virus A/CommonBussard/Berlin/1/06 (H5N1). Typisch für aviäre Viren zeigte sich die vielfach (hier fünffach) höhere Rate der Desialisierung des 3'-gebundenen Sialylglykokonjugats durch das H5N1-Virus. Dennoch zeigten auch humanpathogene Viren die höchste initiale Rate der Desialisierung gegenüber dem Rezeptor 3'SLN. Dieser Vergleich zeigte, dass Neuraminidasen im Vergleich zum HA humanpathogener Viren, deren höchste Affinität gegenüber den 6'-gebundenen Sialinsäuren der humanen Wirtszellen besteht, eine generell weniger starke Anpassung gegenüber 6'-Sialinsäuren aufweisen.

#### **4.8 Die Mutationen innerhalb der Glykoproteine HA und NA der Wildtyp-H1N2-Viren nahmen im epidemiologischen Verlauf der Zirkulation auf antigener Ebene zu**

Wie bereits unter Punkt 4.4 beschrieben, unterschieden sich die natürlich zirkulierenden H1N2-Viren von ihren parentalen Viren der Subtypen H1N1 und H3N2, vor allem durch Aminosäureaustausche innerhalb der Glykoproteine HA und NA. Die Mutationen innerhalb des HA1 erlaubten eine Einteilung der Viren in vier Linien (*clades*) während ihrer Zirkulationsdauer in den Jahren 2001 bis 2003. Diese Analyse, beschrieben in (Chen, La et al. 2006) zeigte, dass sich trotz der nur kurzen Zirkulationsdauer Aminosäureunterschiede manifestierten, die vor allem antigene Bereiche des HA veränderten. Die Beschreibung der antigenen Bereiche lässt sich anhand der vergleichenden Darstellung der Aminosäuren des HA1 diverser H1N1-Viren in der Arbeit von Chutinimitkul *et al.*, (Chutinimitkul, Chieochansin et al. 2008) sehr gut nachvoll-

## Diskussion

---

ziehen. So enthielten die *clades* der H1N2-Viren im HA1 verglichen mit A/NewCaledonia/20/99 folgende Mutationen (antigene Bereiche in Klammern):

- *Clade 1*, 2001: V169A (Ca<sub>1</sub>) / A193T (Sb) / H196N (Sb)
- *Clade 2*, 2001/02: V169A (Ca<sub>1</sub>) / A193T (Sb) / A218T (Ca<sub>2</sub>) / N190D (Sb)
- *Clade 3*, 2001-2003: V169A (Ca<sub>1</sub>) / A193T (Sb) / A218T (Ca<sub>2</sub>) / V178I
- *Clade 4*, 2003: V169A (Ca<sub>1</sub>) / A193T (Sb) / A218T (Ca<sub>2</sub>) / T93A (Entstehung einer potentiellen Glykosylierungsstelle)

Diese Veränderungen waren vermutlich die Folge zahlreicher Mutationen im HA1 der zu diesem Zeitpunkt verbreiteten neuen Variante von H1N1-Viren. Die Saison 2000/01 wurde weltweit betrachtet von H1N1-Viren dominiert. Als Referenzstamm galt A/NewCaledonia/20/99 (H1N1). Dieser Stamm war in der Saison 1999/00 als neue H1-Variante aufgetreten, und löste damit den Referenzstamm A/Beijing/262/95 ab (Lin, Gregory et al. 2004). Die neue Variante wies eine Reihe von neuen Mutationen auf, ca. die Hälfte der Aminosäureaustausche lag in Bereichen des HA, die an der Rezeptorbindung beteiligt sind (Deletion der AS133, T136S, S186P, E165G, I194L). Diese Mutationen im HA begünstigten höchstwahrscheinlich die Kompatibilität zwischen rezeptorbindendem H1 und rezeptorspaltendem N2 (Lin, Gregory et al. 2004).

Auch für das Neuraminidaseprotein der H1N2-Viren waren zwei Mutationen charakteristisch, die Aminosäureaustausche E199K und K431N. Beide Aminosäuren gelten als nicht konserviert, das heißt ihre Veränderungen betrafen die Enzymaktivität der Neuraminidase nicht. Dennoch finden sich für beide Mutationen Hinweise auf Antikörper-reaktive Bereiche. So beschreibt eine Publikation aus China im antigenen Bereich der Aminosäuren 431 bis 434 häufige Mutationen innerhalb von N2-Neuraminidasen von H3N2-Viren in den Jahren 1996-2005 (Huang, Dong et al. 2007). Aminosäure 199 liegt innerhalb eines antigenen Bereiches (AS 198, 199, 220 und 221) in direkter Nachbarschaft zu einer potentiellen Glykosylierungsstelle. Diese Antikörper-reaktive Region befindet sich benachbart zum enzymreaktiven Zentrum, jedoch gegenüber des antigenen Bereichs, gegen den sich monoklonale NA-Antikörper früherer N2- und auch N9-Neuraminidasen (AS 329-403) richteten (Xu, Cox et al. 1996; Gulati, Hwang et al. 2002; Venkatramani, Bochkareva et al. 2006). Erstaunlicherweise wiesen auch frühere N2-Neuraminidasen, so beispielsweise von Referenzstamm A/Hong Kong/8/68 (H3N2), an Position 199 die Aminosäure Lysin auf, die bei vielen H3N2-Stämmen der Jahre 1989-95 zu Glutaminsäure mutierte. Der Austausch E199K ist demzufolge eine Art „Rückmutation“ (Xu, Cox et al. 1996). Die Mutation der AS 199 der N2-Neuraminidasen setzte sich nach 1999 auch als „Drift-

Variante“ innerhalb der H3N2-Viren durch (Venkatramani, Bochkareva et al. 2006). Beide Mutationen des Glykoproteins deuten auf Veränderungen hin, die es dem Virus ermöglichen, sich der Erkennung durch neutralisierende Antikörper des Wirtes zu entziehen. Antikörper gegen NA können die Infektiosität der Viren indirekt neutralisieren, indem sie deren Enzymaktivität behindern und somit zum Schutz vor der Verbreitung der Viren beitragen. Als Schlußfolgerung der Experimente unter Punkt 3.8 schienen die Aminosäureaustausche in den HA- und NA-Proteinen keinen Einfluss auf die Rezeptoraffinität bzw. die Substratspezifität auszuüben. Darüber hinaus haben jedoch auch Wirtsfaktoren, beispielsweise das Immunsystem, einen starken Einfluss auf die Selektion von Viren. Es wurde daher der Einfluss auf antigener Ebene, in Form von Neutralisationsexperimenten mit H1-Antiseren und die Reaktivität der H1N2-Viren gegenüber dem angeborenen Immunsystem in Form von NK-Zellen weiter untersucht.

#### **4.9 Humanes anti-H1-Immuneserum diskriminiert zwischen Wildtyp und rekombinanten H1N2-Viren**

Den bisherigen Ergebnissen nach konnte für WT H1N2-Viren zunächst eine sehr gute Replikationsfähigkeit, ähnlich der von H3N2-Viren, nachgewiesen werden. Es wurde ebenso gefunden, dass die getesteten WT H1N2-Viren schneller und zu höheren Titern replizierten als das rekombinante „Referenzvirus“. Nach Analyse der Rezeptoraffinität von HA und NA gegenüber den Analoga ihrer natürlichen Rezeptoren, konnten keine signifikanten Veränderungen zwischen H1N1-, rek H1N2- und WT H1N2-Viren nachgewiesen werden. Die Analyse segment-spezifischer Mutationen der WT-H1N2-Viren gab Hinweise, dass möglicherweise Veränderungen auf antigener Ebene zur Verbreitung des Virus beigetragen haben könnten. In einem ersten Schritt wurde deshalb mit Hilfe von Plaqueneutralisationstests bestimmt, welche Konzentration eines Antiserums benötigt wird, um eine 50-prozentige Plaqueinhibition zu erreichen. Konnte das Antiserum in diesen Tests sehr hoch verdünnt werden, deutete dies auf eine sehr gute Neutralisierbarkeit hin. Wurde dagegen eine höhere Serumkonzentration benötigt, dann deutete ein solches Ergebnis auf eine schlechtere Reaktivität des Virus gegenüber neutralisierenden Antikörpern aufgrund von Antigen-*Drift* hin. Neben möglichen Unterschieden bei der Neutralisierbarkeit von H1N1, rek H1N2 und WT H1N2-Viren, stellte sich in diesem Zusammenhang auch die Frage, ob die N2-Neuraminidase der H1N2-Viren die Neutralisationsfähigkeit der H1-Antiseren beeinflusste. Verwendet wurden für die Neutralisationstests zwei Antiseren: ein Antiserum, das durch Immunisierung von Frettchen mit dem Virus A/NewCaledonia/20/99 gewonnen wurde. Ein zweites Serum stammte von einem Patienten mit nachgewiesener H1N1-Infektion und unbekannter vorhergehender Krankheitsgeschichte (Alter, vorhergehende Influen-

zainfektionen). Die Werte der reziproken Serumkonzentration des Frettchenserums für eine 50-prozentige Plaueinhibition zeigten nur geringe Unterschiede zwischen den untersuchten Viren (Bild 3.15 A). Im Mittel wurde eine etwas höhere Serumkonzentration für die Plaueinhibition der WT H1N2-Viren im Vergleich zum WT H1N1-Virus benötigt. Bei der Plaueutralisation durch das humane Antiserum zeigte sich deutlicher, dass für die Inhibition des WT H1N2-Virus (A/Sachsen/1816/02) eine höhere Konzentration des Serums benötigt wurde. Die Verdünnung betrug für A/NewCaledonia/20/99 (H1N1) im Mittel 1:18.295, für das WT H1N2-Virus im Mittel 1:12.660. Das Experiment gab demnach erste Hinweise, dass WT H1N2-Viren etwas weniger effizient durch das verwendete H1-Antiserum neutralisiert wurden. Generelle Unterschiede zwischen H1N1- und H1N2-Viren konnten jedoch nicht gefunden werden. Ein Einfluss der N2-Neuraminidase bezüglich der Neutralisation durch das Antiserum war demnach hier nicht erkennbar.

Um dem ersten Hinweis der Neutralisationseffizienz des Antiserums nachzugehen, wurden Replikationskurven der Viren A/NewCaledonia/20/99 (H1N1), A/Sachsen/1816/02 (H1N2) und rNC4-P7-M (H1N2) mit und ohne Zugabe des Antiserums angefertigt. Es wurde jeweils die gleiche Infektionsdosis pro Zelle ( $MOI=0,01$ ) verwendet. Als Konzentration wurde die Verdünnung von 1:10.000 gewählt, durch die laut Plaueutralisationstest bei allen Viren eine 50-prozentige Plaueinhibition erreicht werden konnte. Die Replikationskurven zeigten, dass unter Einfluss des verwendeten humanen Antiserums bei einer Verdünnungsstufe von 1:10.000 WT H1N2-Viren deutlich weniger effizient neutralisiert werden konnten als das WT H1N1-Virus und rek H1N2. Diese Fähigkeit ist wahrscheinlich auf Mutationen antigener Bereiche der Glykoproteine HA und zu einem gewissen Anteil möglicherweise auch im NA zurückzuführen. Liegen aufgrund vorhergehender H1-Influenzainfektionen bereits neutralisierende Antikörper im Wirtsorganismus vor, so können Polymorphismen des Wirtes und des Virus den Infektionsverlauf beeinflussen. Im Experiment wurde mit gleichen Wirtszellen der Replikationsverlauf für drei Viren unter Einfluss neutralisierender Antikörper beobachtet. Im Wirtsorganismus unterliegen H1-Viren durch neutralisierende Antikörper einem hohen Selektionsdruck. Viren, die Mutationen in antigenen Bereichen tragen, gelingt es demnach besser sich der Neutralisation durch Antikörper zu entziehen je mehr sie sich von Viren des „Erstkontaktes“ mit dem Immunsystem unterscheiden. Betrachtet man den generellen Immunstatus in der Bevölkerung als „herd immunity“, so könnte die immunevasive Wirkung der spezifischen Aminosäureaustausche in antigenen Bereichen der WT H1N2-Viren zu ihrer Verbreitung beigetragen haben.

Während der Inkubationszeit des Experiments verändert sich die Antikörperkonzentration, so dass die Effizienz der Neutralisation vermutlich innerhalb der ersten 24 h am größten war. Das

rekombinante H1N2-Virus wurde durch das H1-Antiserum am besten neutralisiert. Im Vergleich zum WT-Isolat A/Sachsen/1816/02 (H1N2) fehlen diesem Virus die bereits beschriebenen Aminosäureaustausche. Es wurde jedoch auch im Inkubationszeitraum von 24 bis 48 h deutlich besser neutralisiert als das WT H1N1-Virus mit laut Sequenzanalyse gleichem HA-Protein. Es könnte daher sein, dass die schwächere Expression des HA auf der Oberfläche der Wirtszelle, die bereits für die viralen Proteine PB1, NP, M1 und NS1 nachgewiesen wurde, zur starken Neutralisation der Viren beitrug. Weniger wahrscheinlich ist, dass dieser Effekt auf die N2-Neuraminidase zurückzuführen ist. Dennoch kann eine frühere Infektion des Serumspenders mit H3N2-Viren und damit das Vorhandensein N2-neutralisierender Antikörper nicht ausgeschlossen werden.

#### **4.10 Wildtyp H1N2-Virus-infizierte Zellen werden durch die schwächere Bindung des Hämagglutinins an den aktivierenden Rezeptor natürlicher Killerzellen NKp44 weniger stark lysiert**

Die Erkennung und Eliminierung von Virus-infizierten Zellen und Tumorzellen durch Immunzellen entscheidet darüber, ob Pathogene durch die Immunantwort des Wirtes gezielt beseitigt werden. Neben der Betrachtung der „herd immunity“ sollte deshalb der Frage nachgegangen werden, ob Mutationen antigener Bereiche des HA und NA der H1N2-Viren zu veränderten Reaktionen cytotoxischer Immunzellen gegenüber infizierten Zellen führten. Weitergehend sollten dadurch Hinweise gewonnen werden, ob solche immunevasiven Mutationen die Verbreitung der H1N2-Viren begünstigt haben könnten. Angeregt wurde diese Fragestellung durch eine Publikationen, die beschreibt, dass veränderte Bindungseigenschaften in H3N2-Viren durch die Aquire potentieller Glykosylierungsstellen im HA zu einer reduzierten Lyse infizierter Zellen durch NK-Zellen führen (Owen, Yamada et al. 2007). NK-Zellen, potente Effektor-Lymphozyten des angeborenen Immunsystems, hemmen durch die gezielte Lyse virusinfizierter Zellen die Verbreitung der Viren und verhindern somit schwere Gewebeschäden. Bereits bekannt war die Tatsache, dass die Lyse Influenzavirus-infizierter Zellen durch die Bindung der Sialinsäuren auf der Oberfläche aktivierender NK-Zellrezeptoren (NKp44 und NKp46) an das auf der Oberfläche von infizierten Zellen exprimierte HA ausgelöst wird (Arnon, Lev et al. 2001; Mandelboim, Lieberman et al. 2001; Achdout, Arnon et al. 2003). Die Studie stellte Veränderungen des HA-Glykosylierungsmusters und veränderte Bindungseigenschaften des HA an Sialinsäurerezeptoren in einen Zusammenhang mit deren Erkennung durch die NK-Rezeptoren. Daraus abgeleitet wurde deshalb innerhalb der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Veränderungen in WT H1N2-Viren ebenfalls Einfluss auf die Bindung an infizierte Zellen

durch NK-Rezeptoren hatten. Der Vergleich der Erkennung und Lyse infizierter Zellen durch NK-Zellen sollte ermöglichen, aus eventuellen Unterschieden Eigenschaften abzuleiten, die zur weiten Verbreitung von H1N2-Viren beitragen.

Für die Durchführung der Experimente wurde das klassische *Chromium-release-Assay* durch ein nicht-radioaktives Verfahren ersetzt. Das Experiment beruht auf bereits beschriebenen Verfahren, die einen Fluoreszenzfarbstoff verwendeten (McGinnes, Chapman et al. 1986; Chang, Gusewitch et al. 1993). In der vorliegenden Arbeit wurde für das NK-Lyse-Experiment statt des c'FDA ein weiterentwickelter Farbstoff verwendet. Dazu wurden K562-Zellen mit dem nicht-toxischen Fluorochrom CFSE gefärbt. Bei Lyse der Zellen konnte dessen Freisetzung durch Fluoreszenzabnahme der Targetzellen im Durchflusszytometer von der Färbung der intakten Zellen unterschieden werden. Diese Fluoreszenzabnahme der Targetzellen wurde zur Bestimmung der Zytotoxizität verwendet. Die Zusammenfassung der Experimente unter Bild 3.21 zeigte, dass die von mir untersuchten H1N2-Virus-infizierten Zellen im Mittel weniger stark durch NK-Zellen lysiert wurden als H1N1- und H3N2-virusinfizierte Zellen. Die starke Streuung der Einzelergebnisse geht dabei auf die Isolierung der NK-Zellen aus dem Blut (*Buffy Coat*) von fünf Spendern und deren individuelle Reaktivität und Zusammensetzung aus NK-Subpopulationen zurück. Die Lyse infizierter Zellen wird durch das Repertoire inhibitorischer und aktivierender NK-Rezeptoren bestimmt, das bei verschiedenen NK-Klonen signifikant variieren kann (Achdout, Arnon et al. 2003). Die starke Streuung der Ergebnisse war demnach nicht außergewöhnlich. Der Vergleich zwischen WT H1N1- und H1N2-Viren zeigte, dass Veränderungen der Interaktion zwischen den exprimierten Glykoproteinen auf der Zelloberfläche und NK-Rezeptoren zur Verbreitung der H1N2-Viren beigetragen haben könnten. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu beachten, dass in Influenzavirus-infizierten Zellen nicht zu einer reduzierten MHC I-Expression auf der Oberfläche kommt und die Zytotoxizität der NK-Zellen damit nicht durch reduzierte Signalweiterleitung inhibitorischer NK-Rezeptoren bedingt ist (Owen, Yamada et al. 2007). Die weniger gute Erkennung und reduzierte Lyse der Zellen, die mit den rekombinanten H1N2-Viren rNC4-P7-M und rNC4-P6/7-M infiziert wurden legt nahe, dass auch die N2-Neuraminidase die Erkennung infizierter Zellen durch NK-Zellen beeinflusst haben könnte. Bislang finden sich in der Literatur wenige Hinweise, dass die Neuraminidase die Bindung an Sialinsäuren der NK-Rezeptoren hydrolysiert oder durch sterische Hinderung Einfluss auf die Erkennung durch NK-Rezeptoren hat. Einen Hinweis auf derartige Unterschiede gibt jedoch die Veröffentlichung von Bauer et al., die beschreibt, dass bei H1N2-Viren bis zu vierfach höhere Konzentrationen des Neuraminidaseinhibitors Zanamivir (Relenza®) benötigt wurden, um eine Inhibition des IC<sub>50</sub>-Wertes der Neuraminidase zu erreichen als bei gleichzeitig

zirkulierenden Viren des Subtyps H1N1 (Bauer, Richter et al. 2009). Auch der bereits erwähnte antigene Bereich der AS 431 bis 434 wurde hier im Zusammenhang mit der veränderten Inhibition des NA durch Zanamivir diskutiert. Hierin wird jedoch die AS 432 als charakteristisch für die N2-Neuraminidasen der humanen H1N2 und A/Moscow/10/99-ähnlichen H3N2-Viren (vermutlich im Zusammenhang mit Mutationen gegenüber NA-Inhibitoren) bezeichnet. Möglich ist auch, dass durch schwächere HA-Expression auf der Zelloberfläche bei rekombinanten H1N2-Viren, eine reduzierte Bindung des HA an die Sialinsäuren der NK-Rezeptoren und der damit einhergehenden Lyse durch NK-Zellen stattfinden konnte. Von Owen *et al.*, wurde beschrieben, dass  $\alpha$ 2,3- und  $\alpha$ 2,6-gebundene Sialinsäuren durch Behandlung der NK-Zellen mit bakteriell exprimierten NAs gespalten werden und damit die Lyse der Targetzellen deutlich eingeschränkt wurde (Owen, Yamada et al. 2007). Denkbar ist in diesem Zusammenhang daher, dass die Aktivität der N2-Neuraminidase die Erkennung durch aktivierende NK-Rezeptoren behinderte bzw. die Bindung hydrolysiert wurde. Die höhere N2-Neuraminidaseaktivität würde in diesem Zusammenhang einer Lyse durch NK-Zellen stärker entgegenwirken als N1 (Wagner, Wolff et al. 2000).

Die aktivierenden Killerzellrezeptoren NKp44 und NKp46 sind als wesentliche Vermittler der zytotoxischen Aktivität Influenzavirus-infizierter Zellen bekannt (Arnon, Lev et al. 2001; Mandelboim, Lieberman et al. 2001). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob sich die zuvor im Zytotoxizitätsexperiment getesteten Viren bezüglich ihrer Bindung an NKp44 und NKp46 unterscheiden. Dazu wurden 293T-Zell-exprimierte Ig-Fusionsproteine eingesetzt, die auf ihrer Oberfläche die natürlichen Sialinsäuren aufweisen. In einem ELISA-Bindungsexperiment mit gereinigten Virussuspensionen wurde daher ihre Bindungsstärke an beide Rezeptoren getestet und verglichen. In Bild 3.22 konnte gezeigt werden, dass alle getesteten Viren spezifisch sowohl an NKp44-Ig als auch NKp46-Ig binden. Der Vergleich von WT H1N1-Viren zum Subtyp H1N2 zeigte jedoch, dass die Bindungsstärke des WT H1N2-Virus A/Sachsen/1816/02 an die Sialinsäuren der NKp44-Ig-Fusionsproteine deutlich geringer war als bei A/NewCaledonia/20/99 (H1N1). Bei keinem der beiden rekombinanten H1N2-Viren (rNC4-P7-M, rNC4-P6/7-M) konnte eine reduzierte Bindungsaffinität nachgewiesen werden. Aus diesem Zusammenhang heraus ergeben sich daher weitere Hinweise, dass subtypspezifische Mutationen der 2001-2003 zirkulierenden H1N2-Viren zu veränderten Bindungseigenschaften gegenüber Rezeptoren spezifischer Killerzellen führten. Gegenüber dem aktivierenden Rezeptor NKp46 waren keine Unterschiede zwischen den WT Viren der Subtypen H1N1 und H1N2 erkennbar. Nicht vollständig geklärt daher ist zu diesem Zeitpunkt, in welchem Umfang die N2-Neuraminidase die Interaktion mit den aktivierenden NK-Rezeptoren beeinflusst. Bild 4.2

zeigt dazu ein Modell der Interaktion von H1N2-Viren mit den NK-Rezeptoren NKp44 und NKp46, dass den Einfluss der spezifischen Aminosäureunterschiede in den Glykoproteinen der WT H1N2-Viren und den gleichzeitig Einfluss der N2-Neuraminidase zeigt.

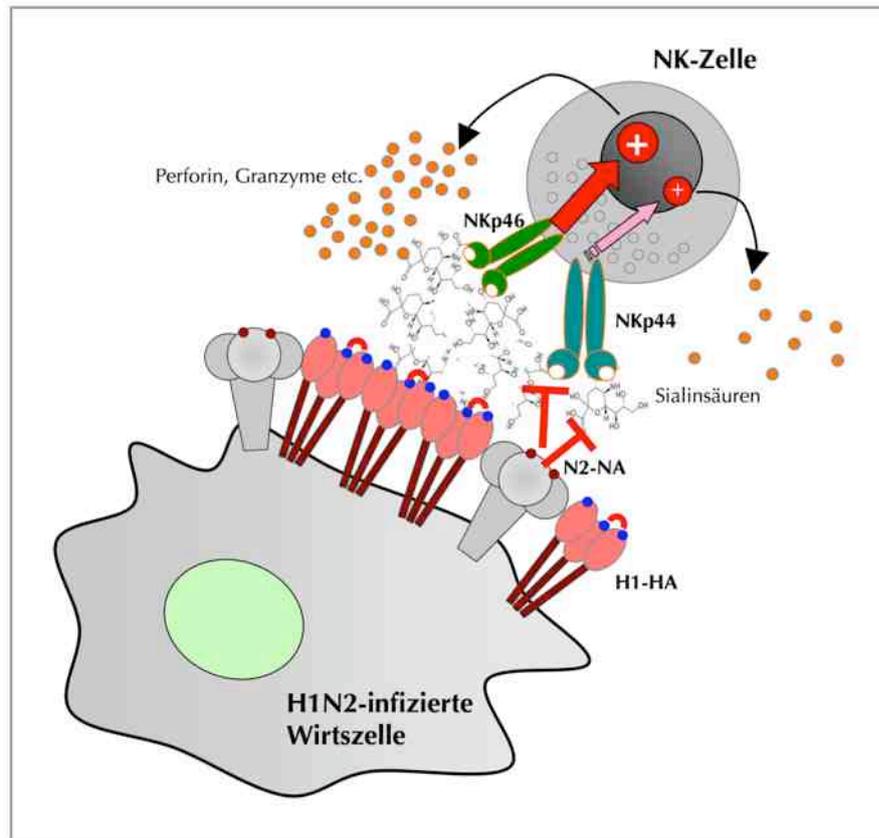


Bild 4.2: **Modell zur Interaktion einer WT-H1N2-infizierten Zelle mit einer NK-Zelle und deren aktivierenden Rezeptoren NKp44 und NKp46.** Die infizierte Zelle exprimiert die Glykoproteine HA und NA auf ihrer Oberfläche. Diese wiederum werden von den Rezeptoren der NK-Zelle erkannt. Sie interagieren über die Sialinsäuren auf der Rezeptoroberfläche mit dem Hämagglutinin und evtl. auch der Neuraminidase. Die Rezeptoren leiten daraufhin das Signal zur Freisetzung der zytoplasmatischen Granula weiter. Diese enthalten porenbildende Enzyme, welche die infizierte Wirtszelle zerstören und damit die weitere Vermehrung der Viren unterbinden. Die roten und blauen Punkte auf den HA- und NA-Proteinen symbolisieren die spezifischen Aminosäureaustausche in den WT H1N2-Viren. Diese behindern möglicherweise die Erkennung durch den Rezeptor NKp44. Möglich ist weiterhin, dass die höhere Aktivität der N2-Neuraminidase im Vergleich zu einer N1-Neuraminidase die Bindung der Sialinsäuren an das HA vermehrt hydrolysiert und die effiziente Erkennung und Lyse der infizierten Wirtszelle zusätzlich behindert.

Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Studien zur Rezeptorbindung an Sialinsäureanaloge waren keine spezifischen Unterschiede zwischen den WT Viren der Subtypen H1N1 und H1N2 erkennbar. Die Bindung virusinfizierter Zellen an NK-Zellen beruht jedoch gleichermaßen auf der Erkennung exprimierter Glykoproteine auf der Zelloberfläche als auch von Sialinsäurekonjugaten auf den Rezeptoren. Hierbei konnten Unterschiede zwischen den Viren A/NewCaledonia/20/99 (H1N1) und A/Sachsen/1816/02 (H1N2) im Bindungsexperiment an NKp44-Ig nachgewiesen werden. Darüber hinaus ist jedoch nicht geklärt, in welchem Maße eine Bindung bzw. Erkennung der Glykoproteine mit der Signalweiterleitung durch die aktivierenden NK-Rezeptoren bis hin zur Freisetzung zytoplasmatischer Granula korreliert. Weiterhin

unklar ist, ob neben NKp44 und NKp46 noch andere NK-Rezeptoren existieren, die an der Erkennung und Lyse Influenzavirus-infizierter Zellen beteiligt sind. Untersucht werden könnte diese Frage zunächst durch Bindungsexperimente mit weiteren durch Überexpression in humanem Gewebe gewonnenen NK-Rezeptor-Fusionsproteinen.

#### **4.11 Ausblick**

Insgesamt zeigten die Erkenntnisse dieser Arbeit, dass durch Neukombination von Segmenten und durch Aminosäureaustausche vor allem in HA und NA Virusreassortanten entstehen können, die im Vergleich zu ihren parentalen Stämmen neue Eigenschaften tragen. So konnte am Beispiel der H1N2-Viren gezeigt werden, dass teilweise durch den Austausch nur eines Gensegments die Replikationsfähigkeit einer Reassortante verändert wurde. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Veränderungen in antigenen Bereichen die Reaktivität gegenüber Komponenten des angeborenen Immunsystems beeinflussen. Um einzelne Eigenschaften der untersuchten Viren, vor allem zwischen dem WT H1N2-Isolat und dem rekombinanten „Referenzvirus“ rNC4-P7-M besser unterscheiden zu können, wäre die Erzeugung und Untersuchung von rekombinanten H1N2-Viren, die H1N2-spezifische Mutationen in HA bzw. NA tragen denkbar. Möglich wäre, mit Hilfe von Tiermodellen wie Frettchen oder Meerschwein Unterschiede in der Transmissionsfähigkeit von H1N2-, H1N1- und H3N2-Viren zu untersuchen (Lowen, Mubareka et al. 2006; Yen, Lipatov et al. 2007). Weiterhin denkbar wäre, die Interaktion dieser Viren, nicht nur mit NK-Zellen, sondern auch mit weiteren Immunzellen, z.B. dendritischen Zellen oder zellulären T-Zellepitopen zu analysieren. Durch die Kombination epidemiologischer und virologischer Methoden kann so die Verbreitung neuartiger Virusreassortanten, auch solcher mit Segmenten von Viren aus anderen Spezies, z.B. des neuen H1N1-Virus („Schweinegrippe“) besser charakterisiert werden. Die Entstehung dieses neuen Pandemievirus, das entgegen langjähriger Spekulationen keinen prinzipiell neuen Subtyp hatte, unterstreicht die Notwendigkeit den Einfluss interner Gensegmente auf die virale Fitness weiter zu untersuchen.

## Zusammenfassung

Reassortierungen zwischen Influenza A-Viren verschiedener Subtypen sind ein seltenes Ereignis. Selbst in Regionen, in denen Viren der Subtypen H1N1 und H3N2 ko-zirkulieren bilden sich selten Misch-Viren eines neuen Subtyps, die dauerhaft zirkulieren. Dies lässt vermuten, dass die H1N2-Viren, die in den Jahren 2001-2003 auftraten gegenüber den parentalen „Elternstämmen“ neue Eigenschaften besaßen, die erstmalig ihre weite Verbreitung ermöglichten. In dieser Arbeit wurden die Eigenschaften von WT und rekombinanten H1N2-Viren in vergleichenden Experimenten mit den parentalen Stämmen A/Moscow/10/99 (H3N2) und A/NewCaledonia/20/99 (H1N1) charakterisiert. Auffällig war eine besonders hohe Replikationsfähigkeit des WT-Isolates A/Sachsen/1816/02 (H1N2). Die Rezeptor-bindenden Eigenschaften dieses Virus, vermittelt durch das Oberflächenglykoprotein HA, entsprachen denen des parentalen H1N1-Stammes A/NewCaledonia/20/99. Die Replikationseigenschaften waren jedoch denen der untersuchten H3N2-Subtypen ähnlicher. Die Neutralisierbarkeit der H1N2-Viren durch H1-Antiseren war in hohem Maße gegeben. Dennoch waren Unterschiede in der Neutralisierbarkeit durch ein H1-Patientenserum erkennbar, die vermutlich durch punktuelle Aminosäureaustausche, vor allem im HA1 bedingt waren. Hinweise aus Experimenten mit NK-Zellen und deren Rezeptoren NKp44 und NKp46 zeigten, dass diese Mutationen auch zu immunologischen Vorteilen durch geringere Erkennung H1N2-Virus-infizierter Zellen durch NK-Zellen, bzw. deren aktivierenden Rezeptor NKp44 geführt haben könnten. Das M-Segment der WT H1N2-Isolate zeigte eine größere genetische Nähe zum Stamm A/Panama/2007/99 (H3N2), während die anderen sechs Segmente von A/Moscow/10/99 (H3N2)-ähnlichen Viren abstammten. Der Vergleich der Replikationseigenschaften rekombinanter H1N2-Viren, deren Genom sich nur durch das M-Segment unterschied zeigte, dass Viren mit dem A/Moscow-M-Segment schneller und zu höheren Titern replizierten, als Viren mit homologem A/Panama-M-Segment. Die genetische Komposition der WT H1N2-Viren, die interne Gensegmente von zwei H3N2-Stämmen vereinte, war für diese Viren demnach nicht mit replikativen Vorteilen verbunden. Weitere Reassortierungsereignisse der H1N2-Viren hätten, begünstigt durch eine längere Zirkulationsdauer möglicherweise zu beständiger Zirkulation der Viren geführt. Hinweise darauf gab eine H1N2-Reassortante mit homologem NA-Segment des Stammes A/Panama statt A/Moscow (rNC4-P6/7-M), bei der deutlich höhere Replikationstiter nachgewiesen werden konnten als beim rekombinanten H1N2-„Referenzvirus“ rNC4-P7-M. Mit diesen Ergebnissen konnte erstmals eine Studie zur Vermehrungsfähigkeit eines WT H1N2-Isolates und einer definierten Palette rekombinanter H1N2-Viren sowie deren Reaktivität gegenüber neutralisierenden Antikörpern von Immunsereen und gegenüber NK-Zellen gezeigt werden. Sie zeigen, dass die

### Zusammenfassung

---

H1N2-Viren der Jahre 2001-2003 gute Voraussetzungen besaßen, als H1-Viren aufgrund der funktionellen Balance eines H1-Hämagglutinins mit einer N2-Neuraminidase kontinuierlich zu zirkulieren. Vor allem die gute Replikationsfähigkeit und Vorteile durch Antigen-*Drift* der beiden Glykoproteine gegenüber Komponenten des Immunsystems können als Ursache für Ihre schnelle weltweite Verbreitung angesehen werden. Die Tatsache, dass diese Viren nicht mehr zirkulieren, belegt jedoch, dass sich diese Viren vermutlich nicht schnell genug veränderten, um sich gegenüber der „herd immunity“ ihrer Wirte langfristig zu behaupten und neben H1N1-Viren zu zirkulieren.

## Abstract

Reassortment between influenza A viruses of different subtypes rarely appears. Even in a community where H1N1 and H3N2 viruses co-circulate, reassortment to produce persistent viruses of mixed gene segments does not readily occur. H1N2 viruses, that circulated between 2001-2003 were considered to have arisen through the reassortment of the two human influenza subtypes H1N1 and H3N2. Due to the fact they make such a rare appearance, H1N2 viruses used to have new characteristics compared to their parental strains that enabled their widespread geographical distribution. We compared the replication properties of wt and recombinant H1N2 viruses with parental strains A/Moscow/10/99 (H3N2) and A/NewCaledonia/20/99 (H1N1). Notably, wt strain A/Sachsen/1816/02 (H1N2) replicated to very high virus titres. Whereas the receptor-binding properties corresponded to those of parental strain A/NewCaledonia/20/99 (H1N1), replication properties of the wt H1N2 strain were more common with those of A/Moscow/10/99 (H3N2)-like viruses. To determine antigenetic characteristics, neutralisation assays using a ferret antiserum generated against A/NewCaledonia/20/99 (H1N1) and a human serum were performed. H1N2 viruses were well inhibited by both antisera, although in presence of the human antiserum, they replicated to higher titres compared to reference strain A/NewCaledonia/20/99 (H1N1). Phylogenetic analysis showed that wt H1N2 viruses had signature amino acid changes in HA and NA compared to their parental strains. It was shown that characteristic substitutions, especially in HA1 allowed H1N2 viruses to partially escape antibody neutralisation. Following experiments with H1N1-, H3N2- and H1N2-infected cells and interacting Natural killer (NK) cells or their activating receptors NKp44 and NKp46 demonstrated that characteristic amino acid substitutions of wt H1N2 viruses were associated with reduced NK cell lysis of the H1N2-infected cells and reduced recognition by receptor NKp44. Genetic analysis showed that the M-gene segment of wt H1N2 viruses had a closer relationship to a second A/H3N2 strain, the A/Panama/2007/99 (H3N2) reference strain, whereas the other six gene segments were closely related to those of A/Moscow/10/99 (H3N2)-like viruses. Comparing the replication properties of two recombinant H1N2 viruses that could only be distinguished by their M-gene segment, viruses containing the A/Moscow-like M-gene segment replicated to higher virus titres. Therefore, the genetic complement out of three different strains did not lead to increased replication efficiency. Assuming that H1N2 viruses co-circulated in the human population over a longer period, it is likely that further reassortment events may have occurred. We therefore generated a recombinant H1N2 virus containing the NA-gene of the A/Panama/2007/99 (H3N2)-like strain instead of A/Moscow/10/99 (H3N2). The reassortant virus containing A/Panama-NA-gene also replicated

## Abstract

---

to increased virus titres. Thus, by replacing just one gene segment by a segment of a homologous strain, two reassortant viruses with increased replication properties compared to the 'recombinant reference virus' arose. For the first time, it was proved that a functional balance of H1-HA and N2-NA, good replication properties, antigenic drift and the ability of partial immune escape promoted the wide distribution of A/H1N2 viruses. The fact that they disappeared after two influenza seasons indicated, that their antigenic changes were not fast and distinct enough to escape the 'herd immunity' within the human population and co-circulate next to H1N1 viruses.

**Literaturverzeichnis**

- (2006). High Levels of Adamantane Resistance Among Influenza A (H3N2) Viruses & Interim Guidelines for Use of Antiviral Agents—United States, 2005–06 Influenza Season. **55**: 44-46.
- Abe, Y., E. Takashita, et al. (2004). "Effect of the addition of oligosaccharides on the biological activities and antigenicity of influenza A/H3N2 virus hemagglutinin." J Virol **78**(18): 9605-11.
- Achdout, H., T. I. Arnon, et al. (2003). "Enhanced recognition of human NK receptors after influenza virus infection." J Immunol **171**(2): 915-23.
- Air, G. M. and W. G. Laver (1989). "The neuraminidase of influenza virus." Proteins **6**(4): 341-56.
- Air, G. M., W. G. Laver, et al. (1989). "Antibody recognition of the influenza virus neuraminidase." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **54 Pt 1**: 247-55.
- Akarsu, H., W. P. Burmeister, et al. (2003). "Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2)." EMBO J **22**(18): 4646-55.
- Al Faress, S., G. Cartet, et al. (2005). "Divergent genetic evolution of hemagglutinin in influenza A H1N1 and A H1N2 subtypes isolated in the south-France since the winter of 2001-2002." J Clin Virol **33**(3): 230-6.
- Al Faress, S., O. Ferraris, et al. (2008). "Identification and characterization of a late AH1N2 human reassortant in France during the 2002-2003 influenza season." Virus Res **132**(1-2): 33-41.
- Alford, R. H., J. A. Kasel, et al. (1966). "Human influenza resulting from aerosol inhalation." Proc Soc Exp Biol Med **122**(3): 800-4.
- Antonovics, J., M. E. Hood, et al. (2006). "Molecular virology: was the 1918 flu avian in origin?" Nature **440**(7088): E9; discussion E9-10.
- Aragon, T., S. de la Luna, et al. (2000). "Eukaryotic translation initiation factor 4G1 is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus." Mol Cell Biol **20**(17): 6259-68.
- Arnon, T. I., H. Achdout, et al. (2004). "The mechanisms controlling the recognition of tumor- and virus-infected cells by NKp46." Blood **103**(2): 664-72.
- Arnon, T. I., M. Lev, et al. (2001). "Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30." Eur J Immunol **31**(9): 2680-9.
- Arora, D. J., M. Houde, et al. (1984). "In vitro enhancement of human natural cell-mediated cytotoxicity by purified influenza virus glycoproteins." J Virol **52**(3): 839-45.
- Arzt, S., F. Baudin, et al. (2001). "Combined results from solution studies on intact influenza virus M1 protein and from a new crystal form of its N-terminal domain show that M1 is an elongated monomer." Virology **279**(2): 439-46.
- Baltimore, D. (1971). "Expression of animal virus genomes." Bacteriol Rev **35**(3): 235-41.
- Barao, I. and J. L. Ascensao (1998). "Human natural killer cells." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **46**(4): 213-29.
- Barman, S. and D. P. Nayak (2000). "Analysis of the transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II transmembrane glycoprotein, for apical sorting and raft association." J Virol **74**(14): 6538-45.
- Baudin, F., C. Bach, et al. (1994). "Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent." EMBO J **13**(13): 3158-65.

- Baudin, F., I. Petit, et al. (2001). "In vitro dissection of the membrane and RNP binding activities of influenza virus M1 protein." *Virology* **281**(1): 102-8.
- Bauer, K., M. Richter, et al. (2009). "Different neuraminidase inhibitor susceptibilities of human H1N1, H1N2, and H3N2 influenza A viruses isolated in Germany from 2001 to 2005/2006." *Antiviral Res* **82**(1): 34-41.
- Baum, L. G. and J. C. Paulson (1991). "The N2 neuraminidase of human influenza virus has acquired a substrate specificity complementary to the hemagglutinin receptor specificity." *Virology* **180**(1): 10-5.
- Bergmann, M., A. Garcia-Sastre, et al. (2000). "Influenza virus NS1 protein counteracts PKR-mediated inhibition of replication." *J Virol* **74**(13): 6203-6.
- Biere, B. and B. Schweiger (2008). "[Molecular analyses of human influenza viruses. Circulation of new variants since 1995/96]." *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* **51**(9): 1050-60.
- Biswas, S. K., P. L. Boutz, et al. (1998). "Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins." *J Virol* **72**(7): 5493-501.
- Blaas, D., E. Patzelt, et al. (1982). "Identification of the cap binding protein of influenza virus." *Nucleic Acids Res* **10**(15): 4803-12.
- Blix, G., E. Lindberg, et al. (1956). "Studies on sialic acids." *Acta Soc Med Ups* **61**(1-2): 1-25.
- Bottcher, E., T. Matrosovich, et al. (2006). "Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium." *J Virol* **80**(19): 9896-8.
- Bottino, C., L. Moretta, et al. (2004). "Learning how to discriminate between friends and enemies, a lesson from Natural Killer cells." *Mol Immunol* **41**(6-7): 569-75.
- Boulan, E. R. and D. D. Sabatini (1978). "Asymmetric budding of viruses in epithelial monolayers: a model system for study of epithelial polarity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(10): 5071-5.
- Braam, J., I. Ulmanen, et al. (1983). "Molecular model of a eucaryotic transcription complex: functions and movements of influenza P proteins during capped RNA-primed transcription." *Cell* **34**(2): 609-18.
- Bright, R. A., M. J. Medina, et al. (2005). "Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern." *Lancet* **366**(9492): 1175-81.
- Bright, R. A., D. K. Shay, et al. (2006). "Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States." *JAMA* **295**(8): 891-4.
- Bullido, R., P. Gomez-Puertas, et al. (2000). "Several protein regions contribute to determine the nuclear and cytoplasmic localization of the influenza A virus nucleoprotein." *J Gen Virol* **81**(Pt 1): 135-42.
- Bullough, P. A., F. M. Hughson, et al. (1994). "Crystals of a fragment of influenza haemagglutinin in the low pH induced conformation." *J Mol Biol* **236**(4): 1262-5.
- Burgui, I., T. Aragon, et al. (2003). "PABP1 and eIF4GI associate with influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes." *J Gen Virol* **84**(Pt 12): 3263-74.
- Burmeister, W. P., R. W. Ruigrok, et al. (1992). "The 2.2 Å resolution crystal structure of influenza B neuraminidase and its complex with sialic acid." *EMBO J* **11**(1): 49-56.
- Byrd, A., S. C. Hoffmann, et al. (2007). "Expression analysis of the ligands for the Natural Killer cell receptors NKp30 and NKp44." *PLoS ONE* **2**(12): e1339.

- Cantoni, C., C. Bottino, et al. (1999). "NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily." *J Exp Med* **189**(5): 787-96.
- Chan, A. Y., F. T. Vreede, et al. (2006). "Influenza virus inhibits RNA polymerase II elongation." *Virology* **351**(1): 210-7.
- Chang, L., G. A. Gusewitch, et al. (1993). "Rapid flow cytometric assay for the assessment of natural killer cell activity." *J Immunol Methods* **166**(1): 45-54.
- Chen, B. J., G. P. Leser, et al. (2008). "The influenza virus M2 protein cytoplasmic tail interacts with the M1 protein and influences virus assembly at the site of virus budding." *J Virol*.
- Chen, M. J., T. La, et al. (2006). "Genetic and phylogenetic analysis of multi-continent human influenza A(H1N2) reassortant viruses isolated in 2001 through 2003." *Virus Res* **122**(1-2): 200-5.
- Chen, W., P. A. Calvo, et al. (2001). "A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death." *Nat Med* **7**(12): 1306-12.
- Chen, Z., Y. Li, et al. (1999). "Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery." *EMBO J* **18**(8): 2273-83.
- Chutinimitkul, S., T. Chieochansin, et al. (2008). "Molecular characterization and phylogenetic analysis of H1N1 and H3N2 human influenza A viruses among infants and children in Thailand." *Virus Res* **132**(1-2): 122-31.
- Clements, M. L., E. K. Subbarao, et al. (1992). "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* **30**(3): 655-62.
- Colman, P. M. (1994). "Influenza virus neuraminidase: structure, antibodies, and inhibitors." *Protein Sci* **3**(10): 1687-96.
- Connor, R. J., Y. Kawaoka, et al. (1994). "Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates." *Virology* **205**(1): 17-23.
- Cooper, M. A., T. A. Fehniger, et al. (2001). "The biology of human natural killer-cell subsets." *Trends Immunol* **22**(11): 633-40.
- Cros, J. F., A. Garcia-Sastre, et al. (2005). "An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein." *Traffic* **6**(3): 205-13.
- Deng, T., J. Sharps, et al. (2005). "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* **79**(13): 8669-74.
- Desselberger, U., V. R. Racaniello, et al. (1980). "The 3' and 5'-terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity." *Gene* **8**(3): 315-28.
- Dias, A., D. Bouvier, et al. (2009). "The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit." *Nature* **458**(7240): 914-8.
- Digard, P., V. C. Blok, et al. (1989). "Complex formation between influenza virus polymerase proteins expressed in *Xenopus* oocytes." *Virology* **171**(1): 162-9.
- Digard, P., D. Elton, et al. (1999). "Modulation of nuclear localization of the influenza virus nucleoprotein through interaction with actin filaments." *J Virol* **73**(3): 2222-31.
- Doms, R. W., R. A. Lamb, et al. (1993). "Folding and assembly of viral membrane proteins." *Virology* **193**(2): 545-62.
- Elton, D., M. Simpson-Holley, et al. (2001). "Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway." *J Virol* **75**(1): 408-19.

- Enami, M., W. Luytjes, et al. (1990). "Introduction of site-specific mutations into the genome of influenza virus." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(10): 3802-5.
- Engelhardt, O. G., M. Smith, et al. (2005). "Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II." J Virol **79**(9): 5812-8.
- Evans, W. A. and M. O. Heckard (1918). "The 1890 Epidemic of Influenza in Chicago and Its Influence on Mortality, 1890 to 1893 Inclusive." Am J Public Health (N Y) **8**(11): 845-8.
- Flick, R., G. Neumann, et al. (1996). "Promoter elements in the influenza vRNA terminal structure." RNA **2**(10): 1046-57.
- Floyd, D. L., J. R. Ragains, et al. (2008). "Single-particle kinetics of influenza virus membrane fusion." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(40): 15382-7.
- Fodor, E., L. Devenish, et al. (1999). "Rescue of influenza A virus from recombinant DNA." J Virol **73**(11): 9679-82.
- Fodor, E. and M. Smith (2004). "The PA subunit is required for efficient nuclear accumulation of the PB1 subunit of the influenza A virus RNA polymerase complex." J Virol **78**(17): 9144-53.
- Fortes, P., A. Beloso, et al. (1994). "Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks mRNA nucleocytoplasmic transport." EMBO J **13**(3): 704-12.
- Fouchier, R. A., P. M. Schneeberger, et al. (2004). "Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(5): 1356-61.
- Gack, M. U., R. A. Albrecht, et al. (2009). "Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I." Cell Host Microbe **5**(5): 439-49.
- Gambaryan, A. S., V. P. Marinina, et al. (1998). "Effects of host-dependent glycosylation of hemagglutinin on receptor-binding properties on H1N1 human influenza A virus grown in MDCK cells and in embryonated eggs." Virology **247**(2): 170-7.
- Gambaryan, A. S., V. E. Piskarev, et al. (1995). "Human influenza virus recognition of sialyloligosaccharides." FEBS Lett **366**(1): 57-60.
- Gambaryan, A. S., J. S. Robertson, et al. (1999). "Effects of egg-adaptation on the receptor-binding properties of human influenza A and B viruses." Virology **258**(2): 232-9.
- Gambaryan, A. S., A. B. Tuzikov, et al. (1997). "Specification of receptor-binding phenotypes of influenza virus isolates from different hosts using synthetic sialylglycopolymers: non-egg-adapted human H1 and H3 influenza A and influenza B viruses share a common high binding affinity for 6'-sialyl(N-acetyllactosamine)." Virology **232**(2): 345-50.
- Garcia, M. A., E. F. Meurs, et al. (2007). "The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control." Biochimie **89**(6-7): 799-811.
- Garcia-Sastre, A., A. Egorov, et al. (1998). "Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems." Virology **252**(2): 324-30.
- Gazit, R., R. Gruda, et al. (2006). "Lethal influenza infection in the absence of the natural killer cell receptor gene Ncr1." Nat Immunol **7**(5): 517-23.
- Ghedin, E., N. A. Sengamalay, et al. (2005). "Large-scale sequencing of human influenza reveals the dynamic nature of viral genome evolution." Nature **437**(7062): 1162-6.
- Goddard, N. L., C. A. Joseph, et al. (2004). "Epidemiological features of a new strain of the influenza A virus--influenza A (H1N2) circulating in England and its public health implications." Virus Res **103**(1-2): 53-4.
- Gomez-Puertas, P., C. Albo, et al. (2000). "Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding." J Virol **74**(24): 11538-47.

- Gonzalez, S. and J. Ortin (1999). "Characterization of influenza virus PB1 protein binding to viral RNA: two separate regions of the protein contribute to the interaction domain." *J Virol* **73**(1): 631-7.
- Gonzalez, S. and J. Ortin (1999). "Distinct regions of influenza virus PB1 polymerase subunit recognize vRNA and cRNA templates." *EMBO J* **18**(13): 3767-75.
- Gonzalez, S., T. Zurcher, et al. (1996). "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* **24**(22): 4456-63.
- Goto, H. and Y. Kawaoka (1998). "A novel mechanism for the acquisition of virulence by a human influenza A virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(17): 10224-8.
- Gregoriades, A. and B. Frangione (1981). "Insertion of influenza M protein into the viral lipid bilayer and localization of site of insertion." *J Virol* **40**(1): 323-8.
- Gregory, V., M. Bennett, et al. (2002). "Emergence of influenza A H1N2 reassortant viruses in the human population during 2001." *Virology* **300**(1): 1-7.
- Gulati, U., C. C. Hwang, et al. (2002). "Antibody epitopes on the neuraminidase of a recent H3N2 influenza virus (A/Memphis/31/98)." *J Virol* **76**(23): 12274-80.
- Gulati, U., W. Wu, et al. (2005). "Mismatched hemagglutinin and neuraminidase specificities in recent human H3N2 influenza viruses." *Virology* **339**(1): 12-20.
- Guo, Y. J., X. Y. Xu, et al. (1992). "Human influenza A (H1N2) viruses isolated from China." *J Gen Virol* **73** ( Pt 2): 383-7.
- Hara, K., F. I. Schmidt, et al. (2006). "Amino acid residues in the N-terminal region of the PA subunit of influenza A virus RNA polymerase play a critical role in protein stability, endonuclease activity, cap binding, and virion RNA promoter binding." *J Virol* **80**(16): 7789-98.
- Hara, K., M. Shiota, et al. (2001). "Influenza virus RNA polymerase PA subunit is a novel serine protease with Ser624 at the active site." *Genes Cells* **6**(2): 87-97.
- Harduin-Lepers, A., R. Mollicone, et al. (2005). "The animal sialyltransferases and sialyltransferase-related genes: a phylogenetic approach." *Glycobiology* **15**(8): 805-17.
- Hatada, E. and R. Fukuda (1992). "Binding of influenza A virus NS1 protein to dsRNA in vitro." *J Gen Virol* **73** ( Pt 12): 3325-9.
- Hatta, M., P. Gao, et al. (2001). "Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses." *Science* **293**(5536): 1840-2.
- Hay, A. J., B. Lomniczi, et al. (1977). "Transcription of the influenza virus genome." *Virology* **83**(2): 337-55.
- Hay, A. J., J. J. Skehel, et al. (1982). "Characterization of influenza virus RNA complete transcripts." *Virology* **116**(2): 517-22.
- Helenius, A. (1992). "Unpacking the incoming influenza virus." *Cell* **69**(4): 577-8.
- Helenius, A. and M. Aebi (2001). "Intracellular functions of N-linked glycans." *Science* **291**(5512): 2364-9.
- Hirst, G. K. (1941). "The Agglutination of Red Cells by Allantoic Fluid of Chick Embryos Infected with Influenza Virus." *Science* **94**(2427): 22-23.
- Ho, J. W., O. HersHKovitz, et al. (2008). "H5-type influenza virus hemagglutinin is functionally recognized by the natural killer-activating receptor NKp44." *J Virol* **82**(4): 2028-32.
- Hoffmann, E., K. Mahmood, et al. (2002). "Rescue of influenza B virus from eight plasmids." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(17): 11411-6.
- Hoffmann, E., G. Neumann, et al. (2000). "A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(11): 6108-13.

- Hoffmann, E., J. Stech, et al. (2001). "Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses." Arch Virol **146**(12): 2275-89.
- Hoffmann, E. and R. G. Webster (2000). "Unidirectional RNA polymerase I-polymerase II transcription system for the generation of influenza A virus from eight plasmids." J Gen Virol **81**(Pt 12): 2843-7.
- Holmes, E. C., E. Ghedin, et al. (2005). "Whole-genome analysis of human influenza A virus reveals multiple persistent lineages and reassortment among recent H3N2 viruses." PLoS Biol **3**(9): e300.
- Holsinger, L. J. and R. A. Lamb (1991). "Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotetramer stabilized by formation of disulfide bonds." Virology **183**(1): 32-43.
- Horimoto, T. and Y. Kawaoka (2005). "Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents." Nat Rev Microbiol **3**(8): 591-600.
- Horner, G. J. and F. D. Gray, Jr. (1973). "Effect of uncomplicated, presumptive influenza on the diffusing capacity of the lung." Am Rev Respir Dis **108**(4): 866-9.
- Hsu, M. T., J. D. Parvin, et al. (1987). "Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal panhandle." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(22): 8140-4.
- Huang, W. J., L. B. Dong, et al. (2007). "[Characteristic analysis of NA gene of human influenza viruses (H3N2) isolated from 1996 to 2005 in China]." Bing Du Xue Bao **23**(5): 345-9.
- Influenza, N. (2002). Erste Einschätzung der Influenza-Saison 2001/2002. Berlin, Robert Koch-Institut: 135-136.
- Ito, T., Y. Suzuki, et al. (1997). "Differences in sialic acid-galactose linkages in the chicken egg amnion and allantois influence human influenza virus receptor specificity and variant selection." J Virol **71**(4): 3357-62.
- Jackson, D., A. Cadman, et al. (2002). "A reverse genetics approach for recovery of recombinant influenza B viruses entirely from cDNA." J Virol **76**(22): 11744-7.
- Katinger, D., L. Mochalova, et al. (2004). "Specificity of neuraminidase activity from influenza viruses isolated in different hosts tested with novel substrates." Arch Virol **149**(11): 2131-40.
- Kato, H., O. Takeuchi, et al. (2006). "Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses." Nature **441**(7089): 101-5.
- Katz, J. D., R. Mitsuyasu, et al. (1987). "Mechanism of defective NK cell activity in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. II. Normal antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) mediated by effector cells defective in natural killer (NK) cytotoxicity." J Immunol **139**(1): 55-60.
- Kawaoka, Y., S. Krauss, et al. (1989). "Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics." J Virol **63**(11): 4603-8.
- Kelm, S. and R. Schauer (1997). "Sialic acids in molecular and cellular interactions." Int Rev Cytol **175**: 137-240.
- Khatchikian, D., M. Orlich, et al. (1989). "Increased viral pathogenicity after insertion of a 28S ribosomal RNA sequence into the haemagglutinin gene of an influenza virus." Nature **340**(6229): 156-7.
- Kida, H., T. Ito, et al. (1994). "Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs." J Gen Virol **75** ( Pt 9): 2183-8.
- Kido, H., M. Murakami, et al. (1999). "Cellular proteinases trigger the infectivity of the influenza A and Sendai viruses." Mol Cells **9**(3): 235-44.

- Kido, H., Y. Yokogoshi, et al. (1992). "Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial Clara cells. A possible activator of the viral fusion glycoprotein." J Biol Chem **267**(19): 13573-9.
- Kilbourne, E. D., B. A. Pokorny, et al. (2004). "Protection of mice with recombinant influenza virus neuraminidase." J Infect Dis **189**(3): 459-61.
- Klenk, H. D., W. Garten, et al. (1984). "Inhibition of proteolytic cleavage of the hemagglutinin of influenza virus by the calcium-specific ionophore A23187." EMBO J **3**(12): 2911-5.
- Klenk, H. D., R. Rott, et al. (1975). "Activation of influenza A viruses by trypsin treatment." Virology **68**(2): 426-39.
- Klenk, H. D., R. Wagner, et al. (2002). "Importance of hemagglutinin glycosylation for the biological functions of influenza virus." Virus Res **82**(1-2): 73-5.
- Kornfeld, R. and S. Kornfeld (1985). "Assembly of asparagine-linked oligosaccharides." Annu Rev Biochem **54**: 631-64.
- Kundu, A., R. T. Avalos, et al. (1996). "Transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II protein, possesses an apical sorting signal in polarized MDCK cells." J Virol **70**(9): 6508-15.
- Labadie, K., E. Dos Santos Afonso, et al. (2007). "Host-range determinants on the PB2 protein of influenza A viruses control the interaction between the viral polymerase and nucleoprotein in human cells." Virology **362**(2): 271-82.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Lanier, L. L. (2008). "Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition." Nat Immunol **9**(5): 495-502.
- Lanier, L. L., A. M. Le, et al. (1986). "The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes." J Immunol **136**(12): 4480-6.
- Latham, T. and J. M. Galarza (2001). "Formation of wild-type and chimeric influenza virus-like particles following simultaneous expression of only four structural proteins." J Virol **75**(13): 6154-65.
- Lazarowitz, S. G. and P. W. Choppin (1975). "Enhancement of the infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide." Virology **68**(2): 440-54.
- Lee, K. H. and B. L. Seong (1998). "The position 4 nucleotide at the 3' end of the influenza virus neuraminidase vRNA is involved in temporal regulation of transcription and replication of neuraminidase RNAs and affects the repertoire of influenza virus surface antigens." J Gen Virol **79** ( Pt 8): 1923-34.
- Leser, G. P. and R. A. Lamb (2005). "Influenza virus assembly and budding in raft-derived microdomains: a quantitative analysis of the surface distribution of HA, NA and M2 proteins." Virology **342**(2): 215-27.
- Li, M. L., B. C. Ramirez, et al. (1998). "RNA-dependent activation of primer RNA production by influenza virus polymerase: different regions of the same protein subunit constitute the two required RNA-binding sites." EMBO J **17**(19): 5844-52.
- Li, X. S., C. Y. Zhao, et al. (1992). "Origin and evolutionary characteristics of antigenic reassortant influenza A (H1N2) viruses isolated from man in China." J Gen Virol **73** ( Pt 6): 1329-37.
- Lin, S., H. Y. Naim, et al. (1998). "Mutations in the middle of the transmembrane domain reverse the polarity of transport of the influenza virus hemagglutinin in MDCK epithelial cells." J Cell Biol **142**(1): 51-7.

- Lin, Y. P., V. Gregory, et al. (2004). "Recent changes among human influenza viruses." Virus Res **103**(1-2): 47-52.
- Little, J. W., W. J. Hall, et al. (1978). "Airway hyperreactivity and peripheral airway dysfunction in influenza A infection." Am Rev Respir Dis **118**(2): 295-303.
- Long, E. O. (1999). "Regulation of immune responses through inhibitory receptors." Annu Rev Immunol **17**: 875-904.
- Lopez-Botet, M. and T. Bellon (1999). "Natural killer cell activation and inhibition by receptors for MHC class I." Curr Opin Immunol **11**(3): 301-7.
- Lowen, A. C., S. Mubareka, et al. (2006). "The guinea pig as a transmission model for human influenza viruses." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(26): 9988-92.
- Lu, B., H. Zhou, et al. (2005). "Improvement of influenza A/Fujian/411/02 (H3N2) virus growth in embryonated chicken eggs by balancing the hemagglutinin and neuraminidase activities, using reverse genetics." J Virol **79**(11): 6763-71.
- Lu, Y., M. Wambach, et al. (1995). "Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor." Virology **214**(1): 222-8.
- Ludwig, S. and T. Wolff (2009). "Influenza A virus TRIMs the type I interferon response." Cell Host Microbe **5**(5): 420-1.
- Luo, C., E. Nobusawa, et al. (1999). "An analysis of the role of neuraminidase in the receptor-binding activity of influenza B virus: the inhibitory effect of Zanamivir on haemadsorption." J Gen Virol **80** ( Pt 11): 2969-76.
- Luo, G. X., W. Luytjes, et al. (1991). "The polyadenylation signal of influenza virus RNA involves a stretch of uridines followed by the RNA duplex of the panhandle structure." J Virol **65**(6): 2861-7.
- Luytjes, W., M. Krystal, et al. (1989). "Amplification, expression, and packaging of foreign gene by influenza virus." Cell **59**(6): 1107-13.
- Mandelboim, O., N. Lieberman, et al. (2001). "Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells." Nature **409**(6823): 1055-60.
- Mandelboim, O., P. Malik, et al. (1999). "Human CD16 as a lysis receptor mediating direct natural killer cell cytotoxicity." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(10): 5640-4.
- Martin, K. and A. Helenius (1991). "Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import." Cell **67**(1): 117-30.
- Massin, P., S. van der Werf, et al. (2001). "Residue 627 of PB2 is a determinant of cold sensitivity in RNA replication of avian influenza viruses." J Virol **75**(11): 5398-404.
- Matlin, K. S., H. Reggio, et al. (1981). "Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line." J Cell Biol **91**(3 Pt 1): 601-13.
- Matrosovich, M., N. Zhou, et al. (1999). "The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties." J Virol **73**(2): 1146-55.
- Matrosovich, M. N., A. S. Gambaryan, et al. (1993). "Probing of the receptor-binding sites of the H1 and H3 influenza A and influenza B virus hemagglutinins by synthetic and natural sialosides." Virology **196**(1): 111-21.
- Matrosovich, M. N., T. Y. Matrosovich, et al. (2004). "Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium." J Virol **78**(22): 12665-7.

- Mazur, I., D. Anhlan, et al. (2008). "The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein." Cell Microbiol **10**(5): 1140-52.
- McGinnes, K., G. Chapman, et al. (1986). "A fluorescence NK assay using flow cytometry." J Immunol Methods **86**(1): 7-15.
- Medcalf, L., E. Poole, et al. (1999). "Temperature-sensitive lesions in two influenza A viruses defective for replicative transcription disrupt RNA binding by the nucleoprotein." J Virol **73**(9): 7349-56.
- Melkonian, K. A., A. G. Ostermeyer, et al. (1999). "Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated." J Biol Chem **274**(6): 3910-7.
- Mibayashi, M., L. Martinez-Sobrido, et al. (2007). "Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus." J Virol **81**(2): 514-24.
- Mitnaul, L. J., M. N. Matrosovich, et al. (2000). "Balanced hemagglutinin and neuraminidase activities are critical for efficient replication of influenza A virus." J Virol **74**(13): 6015-20.
- Mizuta, K., N. Katsushima, et al. (2003). "A rare appearance of influenza A(H1N2) as a reassortant in a community such as Yamagata where A(H1N1) and A(H3N2) co-circulate." Microbiol Immunol **47**(5): 359-61.
- Mochalova, L., A. Gambaryan, et al. (2003). "Receptor-binding properties of modern human influenza viruses primarily isolated in Vero and MDCK cells and chicken embryonated eggs." Virology **313**(2): 473-80.
- Mochalova, L., V. Kurova, et al. (2007). "Oligosaccharide specificity of influenza H1N1 virus neuraminidases." Arch Virol **152**(11): 2047-57.
- Mochalova, L. V., E. Y. Korchagina, et al. (2005). "Fluorescent assay for studying the substrate specificity of neuraminidase." Anal Biochem **341**(1): 190-3.
- Momose, F., C. F. Basler, et al. (2001). "Cellular splicing factor RAF-2p48/NPI-5/BAT1/UAP56 interacts with the influenza virus nucleoprotein and enhances viral RNA synthesis." J Virol **75**(4): 1899-908.
- Naffakh, N., P. Massin, et al. (2001). "The transcription/replication activity of the polymerase of influenza A viruses is not correlated with the level of proteolysis induced by the PA subunit." Virology **285**(2): 244-52.
- Nakajima, S., N. J. Cox, et al. (1981). "Antigenic and genomic analyses of influenza A(H1N1) viruses from different regions of the world, February 1978 to March 1980." Infect Immun **32**(1): 287-94.
- Nallagatla, S. R., J. Hwang, et al. (2007). "5'-triphosphate-dependent activation of PKR by RNAs with short stem-loops." Science **318**(5855): 1455-8.
- Nayak, D. P., E. K. Hui, et al. (2004). "Assembly and budding of influenza virus." Virus Res **106**(2): 147-65.
- Nelson, M. I. and E. C. Holmes (2007). "The evolution of epidemic influenza." Nat Rev Genet **8**(3): 196-205.
- Nelson, M. I., L. Simonsen, et al. (2009). "The origin and global emergence of adamantane resistant A/H3N2 influenza viruses." Virology **388**(2): 270-8.
- Nelson, M. I., C. Viboud, et al. (2008). "Multiple reassortment events in the evolutionary history of H1N1 influenza A virus since 1918." PLoS Pathog **4**(2): e1000012.

- Nemeroff, M. E., S. M. Barabino, et al. (1998). "Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3' end formation of cellular pre-mRNAs." Mol Cell **1**(7): 991-1000.
- Neumann, G., M. R. Castrucci, et al. (1997). "Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein." J Virol **71**(12): 9690-700.
- Neumann, G., K. Fujii, et al. (2005). "An improved reverse genetics system for influenza A virus generation and its implications for vaccine production." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(46): 16825-9.
- Neumann, G., M. T. Hughes, et al. (2000). "Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1." EMBO J **19**(24): 6751-8.
- Neumann, G., T. Watanabe, et al. (1999). "Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(16): 9345-50.
- Neumann, G., M. A. Whitt, et al. (2002). "A decade after the generation of a negative-sense RNA virus from cloned cDNA - what have we learned?" J Gen Virol **83**(Pt 11): 2635-62.
- Newman, A. P., E. Reisdorf, et al. (2008). "Human case of swine influenza A (H1N1) triple reassortant virus infection, Wisconsin." Emerg Infect Dis **14**(9): 1470-2.
- Nishikawa, F. and T. Sugiyama (1983). "Direct isolation of H1N2 recombinant virus from a throat swab of a patient simultaneously infected with H1N1 and H3N2 influenza A viruses." J Clin Microbiol **18**(2): 425-7.
- Nobusawa, E., H. Ishihara, et al. (2000). "Change in receptor-binding specificity of recent human influenza A viruses (H3N2): a single amino acid change in hemagglutinin altered its recognition of sialyloligosaccharides." Virology **278**(2): 587-96.
- O'Neill, R. E., R. Jaskunas, et al. (1995). "Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import." J Biol Chem **270**(39): 22701-4.
- O'Neill, R. E. and P. Palese (1995). "NPI-1, the human homolog of SRP-1, interacts with influenza virus nucleoprotein." Virology **206**(1): 116-25.
- Ohtsu, Y., Y. Honda, et al. (2002). "Fine mapping of the subunit binding sites of influenza virus RNA polymerase." Microbiol Immunol **46**(3): 167-75.
- Opitz, B., A. Rejaibi, et al. (2007). "IFNbeta induction by influenza A virus is mediated by RIG-I which is regulated by the viral NS1 protein." Cell Microbiol **9**(4): 930-8.
- Orlich, M., H. Gottwald, et al. (1994). "Nonhomologous recombination between the hemagglutinin gene and the nucleoprotein gene of an influenza virus." Virology **204**(1): 462-5.
- Owen, R. E., E. Yamada, et al. (2007). "Alterations in receptor binding properties of recent human influenza H3N2 viruses are associated with reduced natural killer cell lysis of infected cells." J Virol **81**(20): 11170-8.
- Paget, W. J., T. J. Meerhoff, et al. (2002). "Mild to moderate influenza activity in Europe and the detection of novel A(H1N2) and B viruses during the winter of 2001-02." Euro Surveill **7**(11): 147-57.
- Palese, P. and R. W. Compans (1976). "Inhibition of influenza virus replication in tissue culture by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA): mechanism of action." J Gen Virol **33**(1): 159-63.
- Park, Y. W. and M. G. Katze (1995). "Translational control by influenza virus. Identification of cis-acting sequences and trans-acting factors which may regulate selective viral mRNA translation." J Biol Chem **270**(47): 28433-9.
- Pende, D., S. Parolini, et al. (1999). "Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells." J Exp Med **190**(10): 1505-16.

## Literaturverzeichnis

---

- Perales, B., J. J. Sanz-Ezquerro, et al. (2000). "The replication activity of influenza virus polymerase is linked to the capacity of the PA subunit to induce proteolysis." *J Virol* **74**(3): 1307-12.
- Perez, D. R. and R. O. Donis (1998). "The matrix 1 protein of influenza A virus inhibits the transcriptase activity of a model influenza reporter genome in vivo." *Virology* **249**(1): 52-61.
- Pichlmair, A., O. Schulz, et al. (2006). "RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates." *Science* **314**(5801): 997-1001.
- Pinto, L. H., L. J. Holsinger, et al. (1992). "Influenza virus M2 protein has ion channel activity." *Cell* **69**(3): 517-28.
- Plotch, S. J., M. Bouloy, et al. (1981). "A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription." *Cell* **23**(3): 847-58.
- Pons, M. W., I. T. Schulze, et al. (1969). "Isolation and characterization of the ribonucleoprotein of influenza virus." *Virology* **39**(2): 250-9.
- Poon, L. L., D. C. Pritlove, et al. (1999). "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* **73**(4): 3473-6.
- Portela, A. and P. Digard (2002). "The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication." *J Gen Virol* **83**(Pt 4): 723-34.
- Qian, X. Y., C. Y. Chien, et al. (1995). "An amino-terminal polypeptide fragment of the influenza virus NS1 protein possesses specific RNA-binding activity and largely helical backbone structure." *RNA* **1**(9): 948-56.
- Rademacher, T. W., R. B. Parekh, et al. (1988). "Glycobiology." *Annu Rev Biochem* **57**: 785-838.
- Rambaut, A., O. G. Pybus, et al. (2008). "The genomic and epidemiological dynamics of human influenza A virus." *Nature* **453**(7195): 615-9.
- Reid, A. H., T. G. Fanning, et al. (1999). "Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus hemagglutinin gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(4): 1651-6.
- Robertson, J. S. (1979). "5' and 3' terminal nucleotide sequences of the RNA genome segments of influenza virus." *Nucleic Acids Res* **6**(12): 3745-57.
- Robertson, J. S., M. Schubert, et al. (1981). "Polyadenylation sites for influenza virus mRNA." *J Virol* **38**(1): 157-63.
- Robertson, M. J. and J. Ritz (1990). "Biology and clinical relevance of human natural killer cells." *Blood* **76**(12): 2421-38.
- Rogers, G. N. and J. C. Paulson (1983). "Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin." *Virology* **127**(2): 361-73.
- Ruigrok, R. W. and F. Baudin (1995). "Structure of influenza virus ribonucleoprotein particles. II. Purified RNA-free influenza virus ribonucleoprotein forms structures that are indistinguishable from the intact influenza virus ribonucleoprotein particles." *J Gen Virol* **76** (Pt 4): 1009-14.
- Russell, C. A., T. C. Jones, et al. (2008). "The global circulation of seasonal influenza A (H3N2) viruses." *Science* **320**(5874): 340-6.
- Sanz-Ezquerro, J. J., S. de la Luna, et al. (1995). "Individual expression of influenza virus PA protein induces degradation of coexpressed proteins." *J Virol* **69**(4): 2420-6.

- Schachter, H. (2000). "The joys of HexNAc. The synthesis and function of N- and O-glycan branches." *Glycoconj J* **17**(7-9): 465-83.
- Schauer, R., A. de Freese, et al. (1997). "Functional and biosynthetic aspects of sialic acid diversity." *Indian J Biochem Biophys* **34**(1-2): 131-41.
- Schmitt, A. P. and R. A. Lamb (2005). "Influenza virus assembly and budding at the viral budding zone." *Adv Virus Res* **64**: 383-416.
- Scholtissek, C., W. Rohde, et al. (1978). "On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2." *Virology* **87**(1): 13-20.
- Schweiger, B., L. Bruns, et al. (2006). "Reassortment between human A(H3N2) viruses is an important evolutionary mechanism." *Vaccine* **24**(44-46): 6683-90.
- Sethi, S. (2002). "Bacterial pneumonia. Managing a deadly complication of influenza in older adults with comorbid disease." *Geriatrics* **57**(3): 56-61.
- Shapiro, G. I., T. Gurney, Jr., et al. (1987). "Influenza virus gene expression: control mechanisms at early and late times of infection and nuclear-cytoplasmic transport of virus-specific RNAs." *J Virol* **61**(3): 764-73.
- Shinde, V., C. B. Bridges, et al. (2009). "Triple-reassortant swine influenza A (H1) in humans in the United States, 2005-2009." *N Engl J Med* **360**(25): 2616-25.
- Shinya, K., S. Hamm, et al. (2004). "PB2 amino acid at position 627 affects replicative efficiency, but not cell tropism, of Hong Kong H5N1 influenza A viruses in mice." *Virology* **320**(2): 258-66.
- Silverman, R. H. (2007). "Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response." *J Virol* **81**(23): 12720-9.
- Simonsen, L., M. J. Clarke, et al. (1997). "The impact of influenza epidemics on mortality: introducing a severity index." *Am J Public Health* **87**(12): 1944-50.
- Sivori, S., D. Pende, et al. (1999). "NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells." *Eur J Immunol* **29**(5): 1656-66.
- Skehel, J. J. and D. C. Wiley (2000). "Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin." *Annu Rev Biochem* **69**: 531-69.
- Smith, D. J., A. S. Lapedes, et al. (2004). "Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus." *Science* **305**(5682): 371-6.
- Smith, G. J., D. Vijaykrishna, et al. (2009). "Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic." *Nature* **459**(7250): 1122-5.
- Smith, G. L. and A. J. Hay (1982). "Replication of the influenza virus genome." *Virology* **118**(1): 96-108.
- Sprenger, M. J., P. G. Mulder, et al. (1993). "Impact of influenza on mortality in relation to age and underlying disease, 1967-1989." *Int J Epidemiol* **22**(2): 334-40.
- Stegmann, T. (2000). "Membrane fusion mechanisms: the influenza hemagglutinin paradigm and its implications for intracellular fusion." *Traffic* **1**(8): 598-604.
- Stevens, J., O. Blixt, et al. (2006). "Glycan microarray analysis of the hemagglutinins from modern and pandemic influenza viruses reveals different receptor specificities." *J Mol Biol* **355**(5): 1143-55.
- Stewart, J. J., P. Watts, et al. (2001). "An algorithm for mapping positively selected members of quasispecies-type viruses." *BMC Bioinformatics* **2**: 1.
- Stieneke-Grober, A., M. Vey, et al. (1992). "Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease." *EMBO J* **11**(7): 2407-14.

## Literaturverzeichnis

---

- Suarez, D. L., D. A. Senne, et al. (2004). "Recombination resulting in virulence shift in avian influenza outbreak, Chile." Emerg Infect Dis **10**(4): 693-9.
- Subbarao, E. K., W. London, et al. (1993). "A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range." J Virol **67**(4): 1761-4.
- Sugrue, R. J., R. B. Belshe, et al. (1990). "Palmitoylation of the influenza A virus M2 protein." Virology **179**(1): 51-6.
- Suzuki, Y. (2005). "Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses." Biol Pharm Bull **28**(3): 399-408.
- Suzuki, Y., H. Kato, et al. (1989). "Single-amino-acid substitution in an antigenic site of influenza virus hemagglutinin can alter the specificity of binding to cell membrane-associated gangliosides." J Virol **63**(10): 4298-302.
- Takahashi, T., Y. Suzuki, et al. (2001). "Duck and human pandemic influenza A viruses retain sialidase activity under low pH conditions." J Biochem **130**(2): 279-83.
- Tan, S. L. and M. G. Katze (1998). "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 **18**(9): 757-66.
- Tang, Y., F. Zaitseva, et al. (2002). "The gate of the influenza virus M2 proton channel is formed by a single tryptophan residue." J Biol Chem **277**(42): 39880-6.
- Tashiro, M., P. Ciborowski, et al. (1987). "Role of Staphylococcus protease in the development of influenza pneumonia." Nature **325**(6104): 536-7.
- Taubenberger, J. K., A. H. Reid, et al. (2005). "Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes." Nature **437**(7060): 889-93.
- Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.
- Tulip, W. R., J. N. Varghese, et al. (1992). "Refined crystal structure of the influenza virus N9 neuraminidase-NC41 Fab complex." J Mol Biol **227**(1): 122-48.
- Tumpey, T. M., C. F. Basler, et al. (2005). "Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus." Science **310**(5745): 77-80.
- Tumpey, T. M., A. Garcia-Sastre, et al. (2005). "Pathogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus: functional roles of alveolar macrophages and neutrophils in limiting virus replication and mortality in mice." J Virol **79**(23): 14933-44.
- Ulmanen, I., B. A. Broni, et al. (1981). "Role of two of the influenza virus core P proteins in recognizing cap 1 structures (m7GpppNm) on RNAs and in initiating viral RNA transcription." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(12): 7355-9.
- Vana, G. and K. M. Westover (2008). "Origin of the 1918 Spanish influenza virus: a comparative genomic analysis." Mol Phylogenet Evol **47**(3): 1100-10.
- Veit, M. and M. F. Schmidt (1993). "Timing of palmitoylation of influenza virus hemagglutinin." FEBS Lett **336**(2): 243-7.
- Venkatramani, L., E. Bochkareva, et al. (2006). "An epidemiologically significant epitope of a 1998 human influenza virus neuraminidase forms a highly hydrated interface in the NA-antibody complex." J Mol Biol **356**(3): 651-63.
- Vigerust, D. J., K. B. Ulett, et al. (2007). "N-linked glycosylation attenuates H3N2 influenza viruses." J Virol **81**(16): 8593-600.
- Vivier, E., E. Tomasello, et al. (2008). "Functions of natural killer cells." Nat Immunol **9**(5): 503-10.

- Wagner, R., D. Heuer, et al. (2002). "N-Glycans attached to the stem domain of haemagglutinin efficiently regulate influenza A virus replication." J Gen Virol **83**(Pt 3): 601-9.
- Wagner, R., M. Matrosovich, et al. (2002). "Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections." Rev Med Virol **12**(3): 159-66.
- Wagner, R., T. Wolff, et al. (2000). "Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza virus growth: a study by reverse genetics." J Virol **74**(14): 6316-23.
- Wakefield, L. and G. G. Brownlee (1989). "RNA-binding properties of influenza A virus matrix protein M1." Nucleic Acids Res **17**(21): 8569-80.
- Wang, P., P. Palese, et al. (1997). "The NPI-1/NPI-3 (karyopherin alpha) binding site on the influenza A virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear localization signal." J Virol **71**(3): 1850-6.
- Wang, T. T. and P. Palese (2009). "Unraveling the mystery of swine influenza virus." Cell **137**(6): 983-5.
- Watanabe, K., H. Handa, et al. (1996). "Mechanism for inhibition of influenza virus RNA polymerase activity by matrix protein." J Virol **70**(1): 241-7.
- Weber, F., G. Kochs, et al. (1998). "A classical bipartite nuclear localization signal on Thogoto and influenza A virus nucleoproteins." Virology **250**(1): 9-18.
- Webster, R. G., W. J. Bean, et al. (1992). "Evolution and ecology of influenza A viruses." Microbiol Rev **56**(1): 152-79.
- Wei, S., A. M. Gamero, et al. (1998). "Control of lytic function by mitogen-activated protein kinase/extracellular regulatory kinase 2 (ERK2) in a human natural killer cell line: identification of perforin and granzyme B mobilization by functional ERK2." J Exp Med **187**(11): 1753-65.
- Weis, W., J. H. Brown, et al. (1988). "Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid." Nature **333**(6172): 426-31.
- Wharton, S. A., R. B. Belshe, et al. (1994). "Role of virion M2 protein in influenza virus uncoating: specific reduction in the rate of membrane fusion between virus and liposomes by amantadine." J Gen Virol **75** ( Pt 4): 945-8.
- Whittaker, G., M. Bui, et al. (1996). "Nuclear trafficking of influenza virus ribonucleoproteins in heterokaryons." J Virol **70**(5): 2743-56.
- WHO (2002). "Influenza A (H1N2) Viruses (update)." WHO Wkly. Epidemiol. Rec. **77, 78**.
- Wiley, D. C. and J. J. Skehel (1987). "The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus." Annu Rev Biochem **56**: 365-94.
- Wiley, D. C., I. A. Wilson, et al. (1981). "Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation." Nature **289**(5796): 373-8.
- Wilson, I. A., J. J. Skehel, et al. (1981). "Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution." Nature **289**(5796): 366-73.
- Wolff, T., F. Ziebeck, et al. (2008). "Sabotage of antiviral signaling and effectors by influenza viruses." Biol Chem **389**(10): 1299-305.
- Xu, X., N. J. Cox, et al. (1996). "Genetic variation in neuraminidase genes of influenza A (H3N2) viruses." Virology **224**(1): 175-83.
- Xu, X., S. E. Lindstrom, et al. (2004). "Reassortment and evolution of current human influenza A and B viruses." Virus Res **103**(1-2): 55-60.

## Literaturverzeichnis

---

- Xu, X., C. B. Smith, et al. (2002). "Intercontinental circulation of human influenza A(H1N2) reassortant viruses during the 2001-2002 influenza season." J Infect Dis **186**(10): 1490-3.
- Yamada, H., R. Chouan, et al. (2004). "Mitochondrial targeting sequence of the influenza A virus PB1-F2 protein and its function in mitochondria." FEBS Lett **578**(3): 331-6.
- Yasuda, J., S. Nakada, et al. (1993). "Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix." Virology **196**(1): 249-55.
- Ye, Z., T. Liu, et al. (1999). "Association of influenza virus matrix protein with ribonucleoproteins." J Virol **73**(9): 7467-73.
- Yeldandi, A. V. and T. V. Colby (1994). "Pathologic features of lung biopsy specimens from influenza pneumonia cases." Hum Pathol **25**(1): 47-53.
- Yen, H. L., A. S. Lipatov, et al. (2007). "Inefficient transmission of H5N1 influenza viruses in a ferret contact model." J Virol **81**(13): 6890-8.
- Yoneyama, M., W. Suhara, et al. (1996). "Autocrine amplification of type I interferon gene expression mediated by interferon stimulated gene factor 3 (ISGF3)." J Biochem **120**(1): 160-9.
- Young, J. F. and P. Palese (1979). "Evolution of human influenza A viruses in nature: recombination contributes to genetic variation of H1N1 strains." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(12): 6547-51.
- Young, R. J. and J. Content (1971). "5'-terminus of influenza virus RNA." Nat New Biol **230**(13): 140-2.
- Yuan, P., M. Bartlam, et al. (2009). "Crystal structure of an avian influenza polymerase PA(N) reveals an endonuclease active site." Nature **458**(7240): 909-13.
- Zamarin, D., M. B. Ortigoza, et al. (2006). "Influenza A virus PB1-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice." J Virol **80**(16): 7976-83.
- Zhang, P. and C. E. Samuel (2007). "Protein kinase PKR plays a stimulus- and virus-dependent role in apoptotic death and virus multiplication in human cells." J Virol **81**(15): 8192-200.
- Zhao, H., M. Ekstrom, et al. (1998). "The M1 and NP proteins of influenza A virus form homo- but not heterooligomeric complexes when coexpressed in BHK-21 cells." J Gen Virol **79** ( Pt 10): 2435-46.
- Zurcher, T., G. Luo, et al. (1994). "Mutations at palmitoylation sites of the influenza virus hemagglutinin affect virus formation." J Virol **68**(9): 5748-54.
- Zvonarjev, A. Y. and Y. Z. Ghendon (1980). "Influence of membrane (M) protein on influenza A virus virion transcriptase activity in vitro and its susceptibility to rimantadine." J Virol **33**(2): 583-6.

## Danksagung

Bei Herrn PD Dr. Thorsten Wolff und Frau Dr. Brunhilde Schweiger am Robert Koch-Institut bedanke ich mich zunächst herzlich für die Überlassung des spannenden Themas in diesem ereignisreichen Gebiet der virologischen Forschung. Ich danke beiden für die gute Zusammenarbeit und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Insbesondere Dr. Thorsten Wolff möchte ich für die sehr gute Betreuung meiner Dissertation danken. Viele wertvolle Gedanken, Ratschläge und sein weitreichendes Wissen haben zur ständigen Weiterentwicklung und dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Professor Dr. Rupert Mutzel danke ich sehr für das Interesse an meiner Arbeit und die Bereitschaft, diese Dissertation seitens der Freien Universität Berlin zu betreuen.

Mein herzlicher Dank gilt allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Dr. Thorsten Wolff am Robert Koch-Institut in Berlin: Andrea, Anne, Bianca, Daniel, Florian, Gudrun, Gunhild, Ilia, Jana, auch Karsten besonders, Marion, Markus, Melanie, Monika, Viola, Wiebke. Es war mir eine Freude mit ihnen zusammenzuarbeiten. Dank ihrer Motivation, dem wissenschaftlichen Austausch und der angenehmen Arbeitsatmosphäre wird mir die Zeit im Labor immer in sehr schöner Erinnerung bleiben. Besonders Gudrun und Andrea danke ich für die hervorragende Organisation des Laborlebens, ihre wachsamen Augen, ihre Hilfe im Labor und auch sonst. Vor allem Markus danke ich fürs Korrekturlesen.

Ich danke auch allen Mitarbeitern des Nationalen Referenzzentrums für Influenza am RKI und Stefan Kaulfuß für ihre gute und unkomplizierte Zusammenarbeit und Hilfe bei der Durchführung meiner Experimente. Mein besonderer Dank geht dabei an Alla Heider, die mir mit Material und Wissen die Rezeptorstudien ermöglicht hat.

Ein besonders herzliches Dankeschön an meine Eltern und Freunde, die mich während der Promotion begleitet haben, ihr Interesse, ihre Motivation, ihr Dasein.

Felix: Danke für alles, das nichts mit Wissenschaft zu tun hat.

## **Lebenslauf**

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

## **Eidstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst zu haben. Sie wurde unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder ähnlichen Form bei keiner anderen Hochschule eingereicht.

Berlin, den 5. Februar 2010

---

Aline Anton