

Aus dem Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität in  
Berlin in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch-Institut in Berlin

---

Analyse molekularer Pathomechanismen des viralen NS1 Proteins  
eines Influenza A Virus vom Subtyp H5N1

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

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

vorgelegt von

**Dipl. Biol. Florian Zielecki**

aus Frankfurt am Main

Februar 2010

---

Angefertigt von April 2007 bis Januar 2010 unter der Leitung von PD Dr.  
Thorsten Wolff am Robert Koch-Institut in Berlin

1. Gutachter: Prof. Rupert Mutzel

2. Gutachter: PD Dr. Thorsten Wolff

Disputation am 25.03.2010

---

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	
1.1	Das Influenza Virus	1
1.1.1	Pathogenese und Epidemiologie	1
1.1.2	Die „Neue Grippe“ / „Schweine Grippe“ / „neue H1N1 Variante“ (H1N1)	3
1.1.3	Aviäre Influenza A Viren	5
1.1.4	Taxonomie	5
1.1.5	Morphologie	6
1.1.6	Genomorganisation und kodierte Proteine	7
1.1.7	Replikation	9
1.2	Reverse Genetik bei Influenza Viren	13
1.3	Das hoch pathogene H5N1 Influenza Virus	14
1.4	Virulenzfaktoren von Influenza Viren	15
1.4.1	Die Rolle des Hämagglutinin Proteins in der viralen Pathogenese	16
1.4.2	Anpassungen des PB2 Proteins an Säugerzellen	16
1.4.3	Das proapoptotische Protein PB1-F2	17
1.5	Das virale Nichtstrukturprotein 1	18
1.5.1	Die Struktur des NS1 Proteins	19
1.5.2	Die intrazelluläre Lokalisation des A/NS1 Proteins	20
1.5.3	Limitierung der Interferon (IFN) - Induktion durch NS1	21
1.6	Die doppelstrang-RNA-abhängige Proteinkinase R (PKR)	23
1.7	Die besonderen Eigenschaften von NS1 Proteinen des Subtyps H5N1	27
1.8	Die C-terminale PDZ Ligandendomäne des NS1 Proteins als mögliche Virulenzdeterminante	27
1.9	Das A/Vietnam/1203/04 Influenza Virus	28
1.10	Fragestellungen der Arbeit	29
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	
<b>2.1</b>	<b>Materialien</b>	<b>31</b>
2.1.1	Virusstämme	31
2.1.2	Zelllinien	31
2.1.3	Bakterienstämme	31
2.1.4	Zellkulturmedien, Zusätze und Material	32
2.1.5	Bakterienmedien und Zusätze	33
2.1.6	Plasmide	33
2.1.7	Oligonukleotide	34
2.1.8	Enzyme	35
2.1.9	Restriktionsendonukleasen	35
2.1.10	Kits	35

---

# Inhaltsverzeichnis

---

2.1.11	Primäre und Sekundäre Antikörper	36
2.1.12	Puffer und Lösungen	36
2.1.13	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	38
2.1.14	Radiochemikalien	40
2.1.15	Geräte	40
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>42</b>
2.2.1	<b>Zellkultur</b>	<b>42</b>
2.2.2	Isolation von primären Hühnerembryo-Fibroblasten	42
2.2.3	Passagieren von Zellen	42
2.2.4	Transfektion von Zellen	43
2.2.5	Infektion von Zellen	43
<b>2.3</b>	<b>Arbeiten mit dem Influenza A Virus</b>	<b>44</b>
2.3.1	Virus-Anzucht im embryonierten Hühnerei	44
2.3.2	Hämagglutinationstest (HA-Test)	45
2.3.3	Virusiterbestimmung mit dem Avicel-Plaque-Test	46
2.3.4	Isolierung und Analyse viraler RNA	46
<b>2.4</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>47</b>
2.4.1	Reverse Transkription	47
2.4.2.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	48
2.4.3	Reinigung und Aufkonzentrieren von PCR-Fragmenten	49
2.4.4	Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel	49
2.4.5	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegel	49
2.4.6	Restriktionsverdau	49
2.4.7	Ligation von DNA-Fragmenten	50
2.4.8	Konstruktion und Subklonierung der VN/1203-Gensegmente PB2, PB1, PA und NP in den Vektor pHW2000	50
2.4.9	Gezielte Mutagenese von pHW-VN/1203-NS mittels QuikChange™	52
2.4.10	Transformation kompetenter E. coli durch Hitzeschock	54
2.4.11	Plasmidpräparationen	54
2.4.12	Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	55
2.4.13	DNA-Sequenzierung nach Sanger	55
2.4.14	Herstellung rekombinanter Viren mit dem revers-genetischen-acht Plasmid-System nach Hoffmann <i>et al.</i> (2000)	56
<b>2.5.</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>57</b>
2.5.1	Analyse der Virusreplikation auf Zellkultur	57
2.5.2	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse	57
2.5.3	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)	58

---

## Inhaltsverzeichnis

---

2.5.4	Luziferase-Reporter-Gen-Studien	58
2.5.5	ELISA („Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay“)	59
<b>2.6</b>	<b>Proteinanalytische Methoden</b>	<b>59</b>
2.6.1	Herstellung von Zelllysaten	59
2.6.2	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	60
2.6.3	Immunoblot (Westernblot)	61
2.6.4	Fixieren und Trocknen von SDS-PAA-Gelen	61
2.6.5	Nachweis der Aktivierung von PKR	61
2.6.6	Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	62
2.6.7	In vitro Translation	63
2.6.8	GST-Kopräzipitation	63
<b>2.7</b>	<b>Tierexperimentelles Arbeiten</b>	<b>64</b>
2.7.1	Mausversuche	64
2.7.2	Infektion von BALB/c Mäusen mit Influenza Viren	64
2.7.3	Bestimmung der MLD <sub>50</sub>	65
2.7.4	Homogenisieren von Tierorganen	65
2.7.5	Histologische Untersuchung von infizierten Mauslungen	65
2.7.6	Infektion von Hühnern ( <i>Gallus gallus domesticus</i> ) mit Influenza A Viren	66
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	
3.1	Etablierung eines revers-genetischen Systems zur Erzeugung und Analyse rekombinanter H5N1 Influenza VN/1203 Viren	67
<b>3.2</b>	<b>Charakterisierung des Einflusses des C-terminalen ESEV Motivs im NS1 Protein auf die virale Replikation <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i></b>	<b>68</b>
3.2.1	Mutagenese des pHW-NS Plasmids zur Generierung der NS1 Mutanten ESEV und RSKV	68
3.2.2	Erzeugung rekombinanter Influenza VN/1203 Viren	69
3.2.3	Multizyklische Replikationsanalyse auf humanen, murinen und aviären Zellen	69
3.2.4	WT, ESEV und RSKV Viren zeigen ähnliche Expression viraler Proteine <i>in vitro</i>	70
3.2.5	Analyse der intrazellulären NS1 Lokalisation in transfizierten A549 Zellen	71
3.2.6	Analyse der intrazellulären NS1-Lokalisation in infizierten A549 Zellen und primären Hühnerembryo-Fibroblasten	72
3.2.7	NS1 WT und Proteinvarianten verhindern die Virus-vermittelte Aktivierung des IFN- $\beta$ Promotors	74
3.2.8	Analyse der Virus-vermittelten Sekretion von IFN- $\beta$ bei Infektion mit VN/1203 -Viren auf A549 Zellen	75
3.2.9	Charakterisierung der Virulenz der rekombinanten VN/1203 WT, -ESEV, -RSKV Viren im Tiermodell	76
3.2.9.1	Die Bestimmung der Pathogenität der VN/1203-Viren in der Maus	76

---

## Inhaltsverzeichnis

---

3.2.9.2	VN/1203-WT-, -ESEV- und -RSKV-Viren zeigen ein ähnliches Verbreitungsmuster und replizieren zu ähnliche Virustitern in BALB/c Mäusen	77
3.2.9.3	Histologische Analysen von Mauslungenpräparaten	79
3.2.9.4	Bestimmung der Virulenz des WT, ESEV und RSKV Virus in oronasal infizierten Hühnern	81
3.2.9.5	Bestimmung des intravenösen Pathogenitätsindex in Hühnern	83
<b>3.3.</b>	<b>Charakterisierung der Interaktion des VN/1203 NS1 Proteins mit PKR</b>	<b>85</b>
3.3.1	Mutagenese des pHW-VN/1203-NS Plasmids zur Generierung der NS1 Mutanten R38A-K41A, D120A-Q121A, I123A-M124A und D125A-K126A	86
3.3.2	Untersuchung der Expression und Lokalisation der NS1 Mutanten R38A-K41A, D120A-Q121A, I123A-M124A und D125A-K126A	87
3.3.3	<i>In-vitro</i> -Analyse der Interaktionsfähigkeit der NS1-Protein Varianten mit PKR	88
3.3.4	Erzeugung rekombinanter Influenza VN/1203 Viren	90
3.3.5	Multizyklische Replikationsanalyse auf humanen, murinen und aviären Zellen	90
3.3.6	Nachweis von Phospho-PKR in infizierten A549 Epithelzellen	91
3.3.7	Analyse der IFN- $\beta$ Sekretion in infizierten A549 Zellen	92
3.3.8	Die Inhibition der Virus-vermittelten Aktivierung des IFN- $\beta$ Promotors ist bei der R38A-K41A NS1 Mutante leicht reduziert	93
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	
4.1	Übersicht über die Ziele der Arbeit	95
4.2	<b>Das C-terminale PDZ-Liganden Motiv des NS1 Proteins wirkt nicht als Virulenzdeterminante im H5N1 Hintergrund</b>	<b>95</b>
4.2.1	Charakterisierung des Einflusses der NS1 Mutanten VN/1203-ESEV und -RSKV auf die virale Replikation in humaner, muriner und aviärer Zellkultur im Vergleich zum WT	96
4.2.2	Analyse der Antagonisierung von IFN- $\beta$ durch die VN/1203 NS1 Proteine im Vergleich zu einem saisonalen Isolat	98
4.2.3	Bestimmung der Virulenz der rekombinanten VN/1203-WT, -ESEV und -RSKV Viren in der Maus und dem Huhn	99
4.2.4	Zusammenfassung der ersten Fragestellung	101
4.3	<b>Untersuchungen zur Interaktion des VN/1203 NS1 Proteins mit PKR</b>	<b>106</b>
4.3.1	Analyse der Interaktion von NS1 mit PKR <i>in vitro</i> in einer GST-Kopräzipitation	107
4.3.2	Charakterisierung des Einflusses der NS1 Mutanten auf die virale Replikation	108
4.3.3	Zusammenfassung der zweiten Fragestellung	110
	Ausblick	111
	Zusammenfassung	113
	Summary	115
	Abkürzungsverzeichnis	
	Literaturverzeichnis	
	Anhang	

---

## 1. Einleitung

Viren (von lat. *virus*, *-i*, *n.* „Gift, Saft, Schleim“) werden als intrazelluläre Parasiten definiert, die keinen eigenen Metabolismus besitzen und daher auf Wirte angewiesen sind, deren zelluläre Prozesse sie sich für ihre Replikation und Verbreitung zu Eigen machen. Die Viruspartikel oder Virionen bestehen aus Proteinen und sind bei einigen Virustypen von einer Lipidmembran umgeben. Die Virionen enthalten als Genom jeweils nur eine Art von Nukleinsäure, entweder DNA oder RNA. Die Nukleinsäure kann abhängig vom Virustyp einzel- oder doppelsträngig vorliegen und linear, ringförmig oder segmentiert sein. Einzelsträngige RNA- und DNA-Genome können unterschiedliche Polarität aufweisen.

### 1.1 Das Influenza Virus

#### 1.1.1 Pathogenese und Epidemiologie

Influenza A Viren werden durch Aerosole übertragen (Wright 2007) und verursachen bei Menschen die Virusgrippe. Zu Beginn kommt es zunächst zur Infektion der Epithelzellen der Mund-, Nasen- und Rachenschleimhaut. Diese breitet sich dann abhängig vom Infektionsverlauf in den oberen und unter Umständen auch in den unteren Respirationstrakt aus. Die allgemeinen Symptome einer Virusgrippe sind Kopfschmerzen, Husten, Schüttelfrost, Muskel- und Gliederschmerzen sowie hohes Fieber (Modrow und Falke 1998). Schwere Krankheitsverläufe können z.B. zu interstitiellen Lungenentzündungen führen. Auch wird vorgeschädigtes Epithel schneller durch Bakterien infiziert, was sekundäre Pneumonien, Meningitis, Kreislaufschäden und Myokarditis verursachen kann (Modrow und Falke 1998).

Weltweit kann die Virusgrippe in Form von periodischen Epidemien oder einer globalen Pandemie auftreten und spielt daher eine bedeutende Rolle als Krankheitserreger. Die hohe Variabilität der Influenza Viren ist dadurch bedingt, dass sich ihr Genom durch zwei verschiedene Mechanismen ständig verändern kann. Am häufigsten führt die hohe Fehlerrate der viralen RNA-Polymerase zu kontinuierlichen, zufälligen Veränderungen des RNA-Genoms. Dabei entstehen Punktmutationen, die zu Aminosäuresubstitutionen führen können, die einer Variante einen Vorteil verschaffen können. Sind davon die Epitopregionen der Oberflächenproteine HA und NA betroffen, kann dies strukturelle Veränderungen der Form bzw. des Antigens zur Folge haben. Dieser Mechanismus wird als *Antigen-Drift* bezeichnet. Eine weitere Form der Veränderung kann durch Reassortierung entstehen. Hierbei kommt es zum Austausch einzelner Genomsegmente, wenn ein Wirt gleichzeitig mit zwei verschiedenen Virusstämmen infiziert ist. Am Ende des

Replikationszyklus können daher Viren assemblieren, welche Genomsegmente beider parentaler Viren tragen (Palese 1977). Sind von dem Austausch auch die HA und NA kodierenden Segmente betroffen, können Viren eines neuen Subtyps entstehen. Diese Veränderung wird als Antigen-*Shift* bezeichnet.

Die bisher dokumentierten Influenza Pandemien (1918 die „Spanische Grippe“, 1957 die „Asiatische Grippe“, 1968 die „Hongkong Grippe“ und 2009 die „Neue Grippe / Schweine Grippe“) entstanden entweder durch direkte Übertragung des Influenza Virus auf den Menschen oder durch Reassortierung verschiedener Influenza Viren. Bei der direkten Übertragung überwindet das Influenza Virus die Speziesbarriere, so dass z.B. ein aviäres Influenza Virus in der Lage ist, direkt im Menschen zu replizieren. Die bisherigen Kenntnisse der dafür nötigen Anpassungen sind in Abschnitt 1.4 beschrieben. Die Reassortierung hingegen kann zuvor in Tierspezies, z.B. dem Schwein, statt finden. In diesen sogenannten „*Mixing Vessels*“ können sowohl humane als auch Influenza Viren anderer Spezies gut replizieren. Ausschlaggebend für eine Pandemie ist letztendlich, dass es in der Bevölkerung gegen das neue Virus keine ausreichend schützende Immunität gibt und dass dieses sich effizient von Mensch-zu-Mensch verbreitet. Der Plan der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zur Vorbereitung auf eine Influenza-Pandemie stuft das Risiko des Übergangs auf den Menschen bzw. der globalen Verbreitung unter Menschen in sechs Phasen ein ([http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/phase/en/index.html](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/phase/en/index.html)):

- *Phase 1:* In Tieren, vor allem in Vögeln, können Virussubtypen zirkulieren, die auch Menschen infizieren; jedoch wurde noch keine Infektion von Menschen berichtet, so dass das Risiko als gering bewertet wird.
- *Phase 2:* Ein in Tieren zirkulierender Subtyp stellt ein erhebliches Risiko einer Erkrankung von Menschen dar, da erste Übertragungen auf den Menschen berichtet wurden.
- *Phase 3: Beginn der Alarmphase:* Vereinzelt werden Menschen infiziert, eine Übertragung des neuen Virus von Mensch-zu-Mensch ist jedoch sehr selten und tritt allenfalls bei engem Kontakt zu einem Infizierten auf.
- *Phase 4:* Eng begrenztes Ausbruchsgeschehen (jeweils weniger als 25 Personen über weniger als 2 Wochen) oder sporadische Einzelfälle ohne nachweisbaren Kontakt der Erkrankten zu Tieren.
- *Phase 5: Erhebliches Pandemierisiko:* Größere, aber noch örtlich und zeitlich eng begrenzte Ausbrüche in zwei Gebieten einer der sechs WHO-Regionen.



- *Phase 6: Verlauf der Pandemie:* Wachsende und anhaltende Übertragungen von Mensch zu Mensch in der gesamten Bevölkerung; räumlich getrenntes Ausbruchsgeschehen in mindestens zwei WHO-Regionen.

Entsprechend dieser Definition wird hierbei ausschließlich die Verbreitung bzw. Übertragung des Virus als maßgebendes Kriterium zur Einstufung in die verschiedenen Phasen verwendet, die Pathogenität und Virulenz des Erregers spielen keine Rolle.

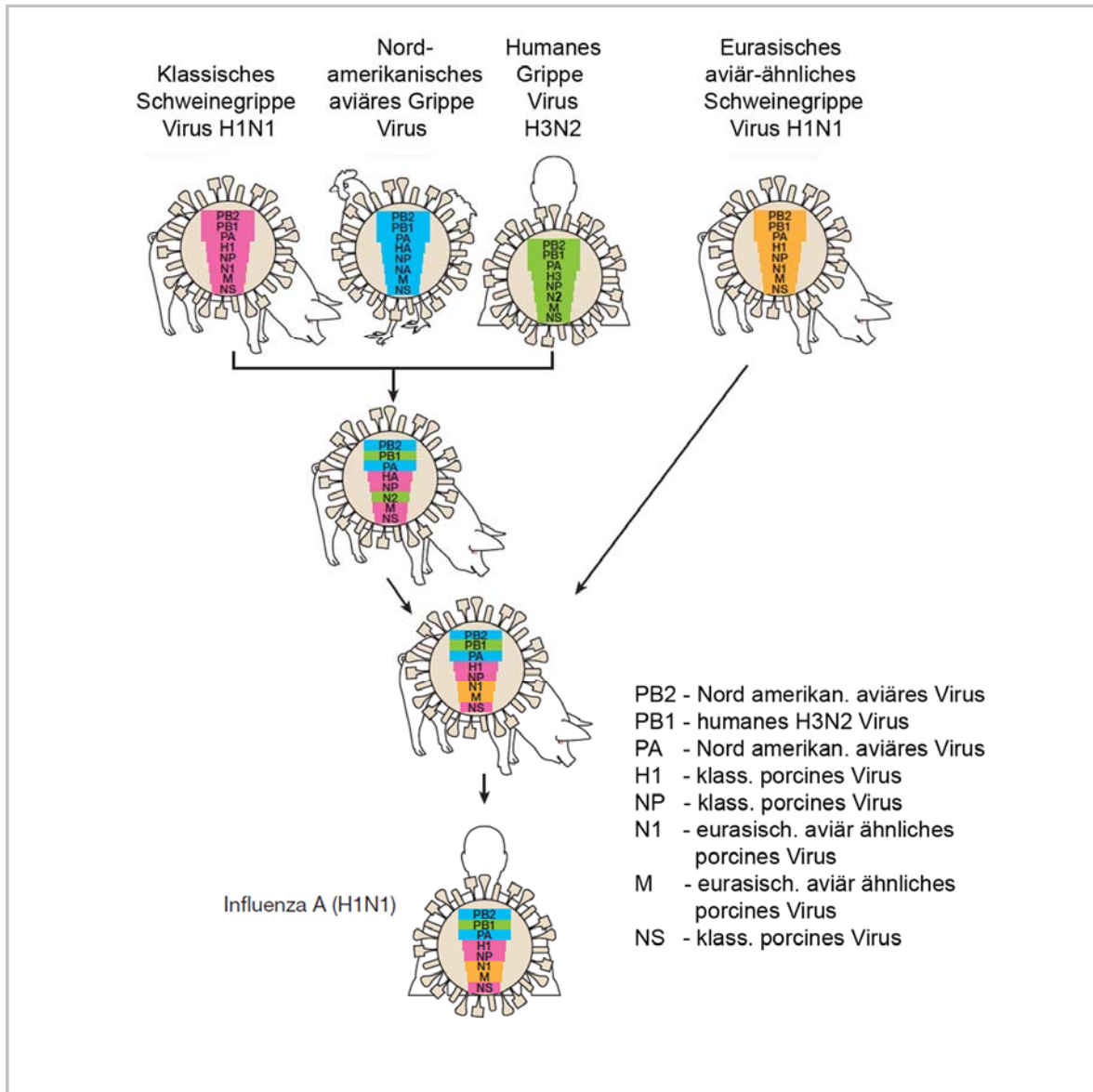
Beispiele für Influenzapandemien sind:

- Spanische Grippe (1918–1920), weltweit 500 Millionen Kranke und 25 bis 50 Millionen Tote, Subtyp A/H1N1
- Asiatische Grippe (1957), 1 bis 4 Millionen Tote, Subtyp A/H2N2
- Hongkong Grippe (1968), 1 bis 4 Millionen Tote, Subtyp A/H3N2
- Russische Grippe (1977/78), Subtyp A/H1N1 (Fallzahlen und Klassifikation als Pandemie umstritten)
- Neue A/H1N1 Grippe (2009) („Schweine Grippe“)

### **1.1.2 Die „Neue Grippe“ / „Schweine Grippe“ / „neue H1N1 Variante“ (H1N1)**

Das im März 2009 in Mexiko identifizierte „Neue Grippe“ Virus vom Subtyp H1N1 ist eine Quadruple-Reassortante. Diese entstand durch die Reassortierung eines „Eurasischen aviär ähnlichen Schweinegrippe Virus“ mit einer porcinen *Triple*-Reassortante, die in Nordamerika zirkulierte und interne Segmente eines humanen H3N2 Influenza Virus (PB1, NA), eines klassischen Schweinegrippe Virus (NS, NP, M und HA) und eines Nordamerikanischen aviären Influenza Virus (PB2, PA) enthielt. Die genaue Zusammensetzung der Quadruple-Reassortante ist in Abbildung 1.1 dargestellt. Das „Neue Grippe“ Virus überträgt sich sehr effizient von Mensch-zu-Mensch, was am 11.6.2009 zur Einstufung in die Phase 6 des WHO Pandemieplans führte. Bis heute wurden laut WHO über 526.060 Infektionen mit der neuen H1N1 Variante beim Menschen bestätigt. Jedoch liegt die tatsächliche Zahl vermutlich deutlich darüber, da mittlerweile aufgrund der hohen Fallzahlen die Länder keine individuellen Fälle mehr testen und melden müssen. Insgesamt sind mindesten 12220 Menschen an der „neuen Grippe“ verstorben (WHO 30. Dezember 2009, [http://www.who.int/csr/don/2009\\_12\\_30/en/index.html](http://www.who.int/csr/don/2009_12_30/en/index.html)). Die Ausbreitung der neuen H1N1 Variante in Deutschland fand ihren bisherigen Höhepunkt in der 46. und 47. Kalenderwoche des Jahres 2009 und ist seitdem rückläufig. Insgesamt wurden an das Robert Koch-Institut bis zum 22.12.2009 209.885

Fälle von „Neuer Influenza“ übermittelt (Wochenbericht 51/2009 der Arbeitsgemeinschaft Influenza des RKI, <http://influenza.rki.de/Wochenberichte.aspx>). Des Weiteren wurden bisher 132 Todesfälle in Zusammenhang mit der neuen H1N1 Variante in Deutschland registriert (<http://influenza.rki.de/Wochenberichte.aspx>). Die Weiterentwicklung dieser Situation kann derzeit jedoch noch nicht vorhergesagt werden.



**Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Entstehung der neuen H1N1 Variante.** In den späten 1990er Jahren kam es zu einer Reassortierung eines klassischen Schweinegrippe Virus, eines nordamerikanischen aviären Grippe Virus und eines humanen Grippe Virus vom Subtyp H3N2. Die daraus resultierenden *Triple*-Reassortanten vom Subtyp H3N2 und H1N2 zirkulierten darauf in der nordamerikanischen Schweinepopulation. Durch die Reassortierung mit einem eurasischen aviär-ähnlichen Schweinegrippe Virus kam es schließlich zur Entstehung der neuen H1N1 Variante. Modifiziert nach Neumann *et al.* 2009

### 1.1.3 Aviäre Influenza A Viren

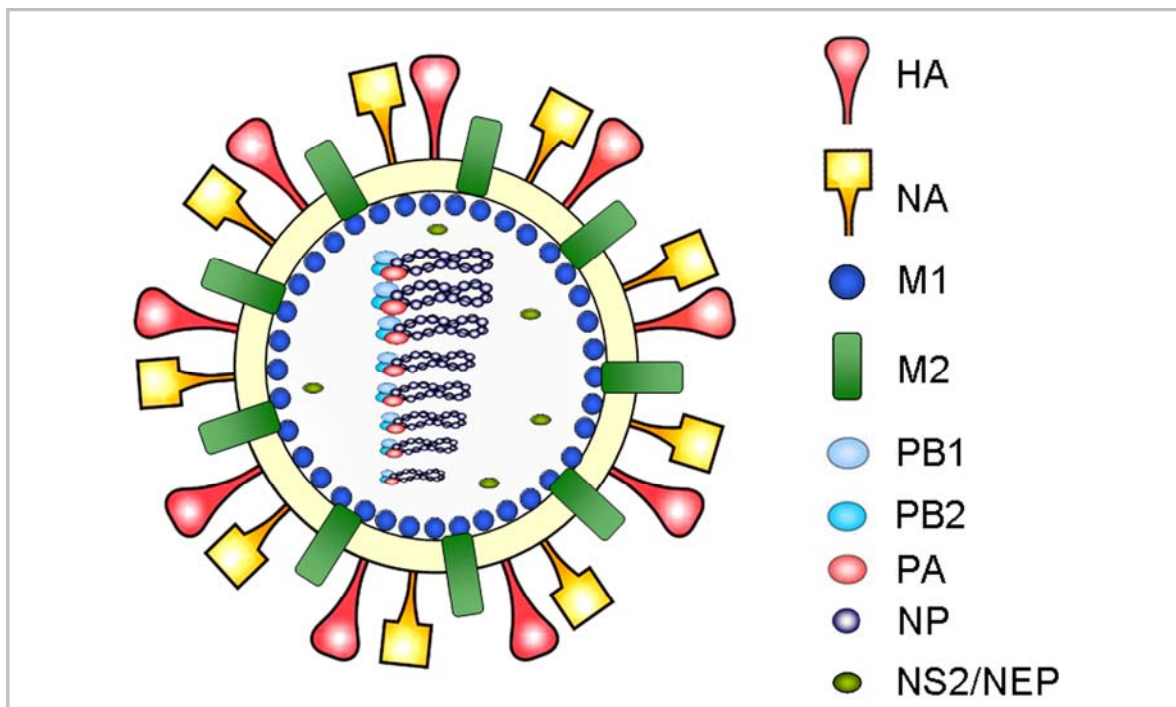
In Wildvögeln, die das Reservoir von Influenza A Viren bilden (Webster *et al.* 1992), konnten alle bisher bekannten 16 HA (H1-H16) und 9 NA (N1-N9) Subtypen von Influenza A Viren nachgewiesen werden (Fouchier *et al.* 2005). Neben der üblichen Klassifizierung, die auf dem HA und NA Subtyp basiert, werden aviäre Influenza Viren zudem auch anhand ihrer Pathogenität in Hühnern klassifiziert. Hierbei unterscheidet man niedrig- und hoch-pathogene aviäre Influenza Viren. Influenza A Viren der Subtypen H5 und H7 können nach Infektion von Geflügel zu hoch-pathogenen Formen mutieren, so dass es in Folge dessen zu Ausbrüchen hoch-pathogener aviärer Influenza Viren kommen kann (Munster und Fouchier 2009). Der Wechsel vom niedrig-pathogenen zum hoch-pathogenen Phänotyp kommt durch eine Veränderung der Spaltstelle im HA Protein zustande. Hierbei wird die monobasische Spaltstelle zu einer multibasischen Spaltstelle verändert, so dass das HA Protein von ubiquitär exprimierten Enzymen wie z.B. dem Furin gespalten werden kann. Dies ermöglicht systemische Virus Replikation und verursacht schwerwiegende Krankheiten in Geflügel mit Mortalitätsraten von bis zu 100% (Alexander 2000; Munster und Fouchier 2009) Weitere Informationen zu hoch-pathogenen H5N1 Viren sind in Abschnitt 1.3 beschrieben.

### 1.1.4 Taxonomie

Das Influenza Virus gehört zur Familie der *Orthomyxoviridae* (griech.: *ortho* = richtig; *myxo* = Schleim). Diese Familie wird in fünf Unterfamilien eingeteilt und umfasst die Influenza Virus Typen A, B und C sowie die Thogotoviren und die Isaviren (Wright 2007). Die verschiedenen Influenza Viren werden anhand der antigenen Eigenschaften des Nukleoproteins (NP) und des Matrixproteins (M1) unterschieden. Weiterhin unterteilt man Influenza A Viren aufgrund unterschiedlicher antigenen Eigenschaften ihrer Oberflächenproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) in verschiedene Subtypen. Bisher sind 16 verschiedene Hämagglutinine (H1 bis H16) und 9 verschiedene Neuraminidasen (N1 bis N9) bekannt. Die Namensgebung der Influenza Viren erfolgt nach einer von der WHO 1980 festgelegten Nomenklatur. Beginnend mit dem Virustyp (A, B oder C) folgt die Spezies, aus der das Virus isoliert wurde, der Ort der Erstisolation, die Nummer des Isolats, das Isolationsjahr und bei Influenza A Viren die Angabe des Subtyps. Bei human-pathogenen Influenza Viren entfällt die Angabe der Spezies; z. B.: A/Vietnam/1203/04 (H5N1).

### 1.1.5 Morphologie

Die Virionen der Orthomyxoviren sind membranumhüllt und enthalten ein segmentiertes negativ polarisiertes RNA-Genom, bestehend aus acht Genomsegmenten. Die Viruspartikel sind pleomorph und haben einen Durchmesser von 80-120 nm. In die Virusmembran, welche von der Wirtszelle abstammt (Kates *et al.* 1962), sind die viruskodierten, glykosylierten Oberflächenproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) eingelagert (Abbildung 1.2). Das Hämagglutinin, das Homotrimer bildet, vermittelt die Rezeptorbindung und Fusion, während die Neuraminidase als Homotetramer für die Abspaltung endständiger N-Acetyl-Neuraminsäuren verantwortlich ist. Zusätzlich findet man bei allen Influenza A Viren ein weiteres, als Homotetramer vorliegendes Transmembranprotein (M2), welches als Protonenkanal fungiert (Sugrue und Hay 1991; Pinto *et al.* 1992).



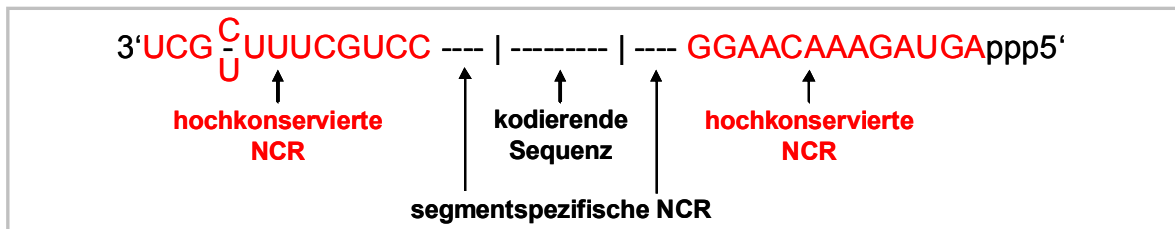
**Abb.1.2: Schematische Darstellung eines Influenza Virus Partikels.**

Das Matrixprotein M1 kleidet die Innenseite der Virusmembran aus und ist mit den viralen Ribonukleoproteinkomplexen (vRNPs) assoziiert. Letztere bestehen aus den acht viralen RNA-Genomsegmenten, welche über die gesamte Länge mit dem Nukleoprotein (NP) komplexiert sind und einen Polymerasekomplex tragen (Compans *et al.* 1972; Tiley *et al.* 1994). Weiterhin liegt im Viruspartikel eine geringe Kopienzahl des nukleären Exportproteins NS2/NEP vor (Yasuda *et al.* 1993). Das Nichtstrukturprotein NS1 ist dem Namen entsprechend nicht im Viruspartikel enthalten, sondern wird nur in infizierten

Zellen exprimiert. Weitere Informationen zu einzelnen viralen Proteinen sind in Abschnitt 1.4 beschrieben.

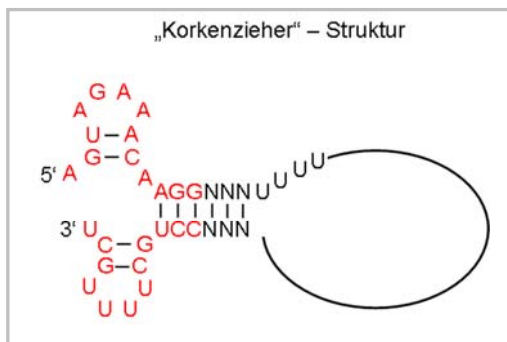
### 1.1.6 Genomorganisation und kodierte Proteine

Das Genom von Influenza A Viren ist auf acht einzelsträngigen RNA-Segmenten kodiert. Die virale RNA (vRNA) ist nach Konvention negativ orientiert, da von ihr positiv orientierte Boten-RNA (mRNA) transkribiert wird. Die kodierenden Bereiche aller vRNA-Segmente sind von nichtkodierenden Bereichen (*non-coding region* (NCR)) (Abbildung 1.3) flankiert. Diese bestehen jeweils aus Influenza A spezifischen NCRs und Segment spezifischen NCRs. Die ersten 13 Nukleotide am 5' Ende und die letzten 12 Nukleotide am 3' Ende bilden die viralen NCRs, welche zwischen verschiedenen Influenza A Virusstämmen hoch konserviert sind (Desselberger *et al.* 1980). Die segmentspezifischen NCRs variieren hingegen in ihrer Länge von 8 bis 45 Nukleotide.



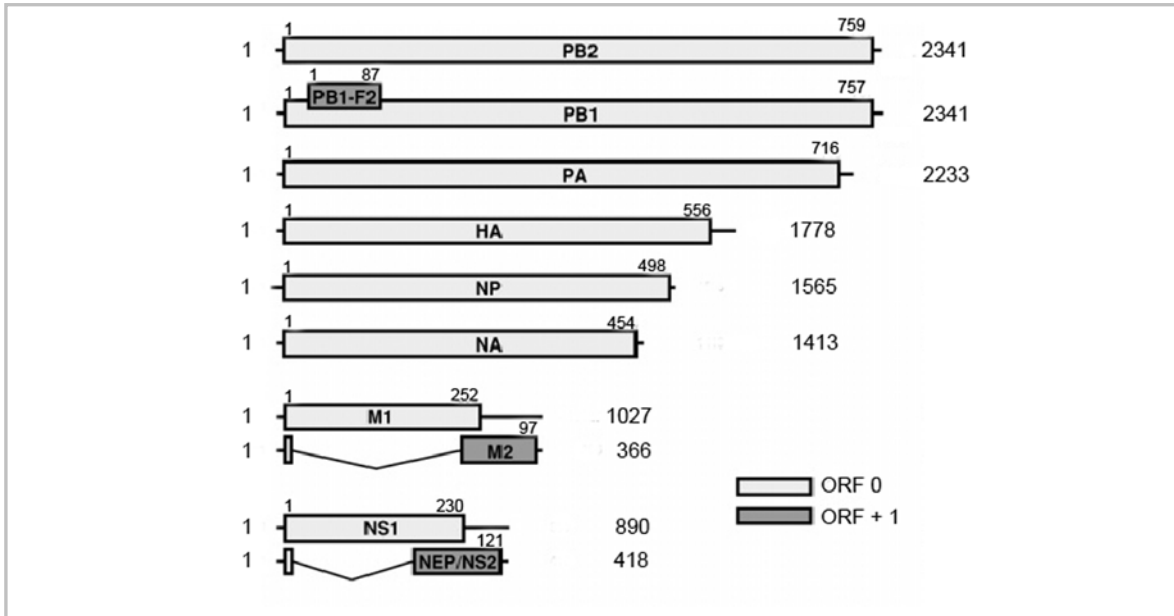
**Abb. 1.3: Promotorregionen der vRNA-Segmente.** Die terminalen 12 und 13 Nukleotide (Influenza A Virus) der nichtkodierenden Bereiche (NCR) der vRNA sind hochkonserviert und dienen als virale Promotoren.

Die NCRs bilden die Influenza Virus-spezifischen Promotorstrukturen (Flick *et al.* 1996), an welche der RNA-abhängige virale RNA-Polymerasekomplex für die Transkription und Replikation bindet. Die Polymerasekomplexe setzen sich aus den viralen Proteinen PB1, PB2 und PA zusammen. Die Bereiche der 5' und 3' Enden sind teilweise komplementär, wodurch es nach dem „Korkenzieher-Modell“ zu Basenpaarungen zwischen den vRNA-Termini und der Bildung von Haarnadelstreifen innerhalb der vRNA-Termini kommt (Abbildung 1.4).



**Abb. 1.4: Schematische Darstellung der für den RNA-Promotor vorgeschlagenen „Korkenzieher“-Struktur.** Die zueinander komplementären Basen des 5'- und 3'-Endes bilden einen Doppelstrang aus. Modifiziert nach Wright 2007.

Die „Korkenzieher“-Struktur ist maßgebend für die Aktivität des viralen Promotors, da sie die Interaktion zwischen Promotor und Polymerasekomplex stabilisiert und somit die vRNA und mRNA Synthese ermöglicht. Das gleiche Modell gilt für die copy-RNA (cRNA) (Neumann *et al.* 2004), die bei der viralen Replikation entsteht (siehe Abschnitt 1.1.7).



**Abb. 1.5: Darstellung der acht RNA-Segmente des Influenza Virus A/PR/8/34.** Von oben nach unten sind die Genomsegmente 1-8 sowie die Bezeichnung der kodierten Proteine abgebildet. Die Nukleotidanzahl befindet sich rechts jedes schematischen RNA-Segementes, während die Aminosäureanzahl rechts auf dem Segment angegeben ist. Die schwarzen Striche an den 5'-und 3'-Enden kennzeichnen die nicht kodierenden Bereiche. Das Segment 2 besitzt einen zweiten ORF (open reading frame), der für PB1-F2 kodiert. Die Proteine M2 und NEP/NS2 der Segmente 7 und 8 entstehen durch alternatives Spleißen. Die V-förmigen Linien bezeichnen die gespleißten Introns (mehr Informationen zu den Segmenten und Proteinen in Tabelle.1.1) Wright 2007.

Die acht viralen RNA-Segmente kodieren für je ein bzw. zwei virale Proteine (Abbildung 1.5). Dabei kodieren die drei größten RNA-Segmente für die viralen Polymerase-Untereinheiten PB1, PB2 und PA. Bei der Mehrzahl von Influenza A Virusstämmen ist zudem in einem alternativen Leserahmen auf Segment zwei neben dem PB1 Protein das proapoptotische Protein PB1-F2 kodiert (Chen *et al.* 2001). Das vierte und fünfte RNA-Segment kodiert entsprechend für das Hämagglutinin und das Nukleoprotein. Das sechste RNA-Segment kodiert für die Neuraminidase. Die beiden kleinsten Segmente sind bicistronisch angeordnet und kodieren je zwei Proteine. Segment Sieben kodiert das M1 und das M2 Protein. Hierbei wird das M2 Protein von einer gespleißten mRNA translatiert. Auf dem achten Segment sind das Nichtstrukturprotein NS1 und das nukleäre Exportprotein NEP/NS2 kodiert. Wie das M2 Protein wird auch das NEP/NS2 Protein von einer gespleißten mRNA translatiert. In Tabelle 1.1 sind die Eigenschaften und Funktionen der viralen Proteine zusammengefasst. Dabei wird das saisonale H1N1



## Einleitung

Influenza A/Puerto Rico/8/34 Virus (PR/8) mit dem hoch pathogenen H5N1 Influenza A/Vietnam/1203/04 Virus (VN/1203) verglichen.

**Tabelle 1.1 Eigenschaften und Funktionen viraler Proteine**

Segment	A/PR/8/34		A/VN/1203		Funktion
	vRNA (nt)	kodiertes Protein (AS)	vRNA (nt)	kodiertes Protein (AS)	
1	2341	<b>PB2</b> (759)	2341	<b>PB2</b> (759)	Untereinheit der viralen RNA-Polymerase, bindet mRNA-Kappen
2	2341	<b>PB1</b> (757)	2341	<b>PB1</b> (757)	Katalytische Untereinheit der viralen RNA-Polymerase
		<b>PB1-F2</b> (87)		<b>PB1-F2</b> (90)	Mitochondriale Lokalisation; Induktion von Apoptose
3	2233	<b>PA</b> (716)	2233	<b>PA</b> (716)	Untereinheit der viralen RNA-Polymerase, Endonukleaseaktivität
4	1778	<b>HA</b> (566)	1778	<b>HA</b> (568)	Hämagglutinin, Typ I Membranprotein, Rezeptorbindung, Membranfusion, Induktion neutralisierender AK
5	1565	<b>NP</b> (498)	1565	<b>NP</b> (498)	Nukleoprotein, Einkapsidierung von vRNA und cRNA, über NLS Kernlokalisierung der RNPs
6	1413	<b>NA</b> (454)	1398	<b>NA</b> (449)	Neuraminidase, Typ II Membranprotein
7	1027	<b>M1</b> (252)	1027	<b>M1</b> (252)	Matrixprotein, wichtig für Morphogenese
		<b>M2</b> (97)		<b>M2</b> (97)	Ionenkanal, Ansäuerung der Virionen, Schutz der HA-Konformation
8	890	<b>NS1</b> (230)	875	<b>NS1</b> (215)	Post-transkriptioneller Regulator und IFN-Antagonist, inhibiert PKR-Aktivierung
		<b>NS2/NEP</b> (121)		<b>NS2/NEP</b> (121)	Nukleärer Exportfaktor

### 1.1.7 Replikation

Für eine erfolgreiche Replikation ist das Virus von der Wirtszelle abhängig. Influenza Viren zählen zu den wenigen RNA Viren, deren Replikation und Transkription im Wirtszellkern ablaufen (Whittaker 2001). Dementsprechend ist das Virus auf nukleäre Import- und Exportfaktoren angewiesen. Einige Transkripte werden zusätzlich durch

Spleißen prozessiert und benötigen dafür den zellulären Spleißapparat. Ferner muss das Virus auf die zelluläre Translationsmaschinerie zur Proteinsynthese zurückgreifen.

Die Virusreplikation der Influenza Viren läuft in fünf Hauptschritten ab:

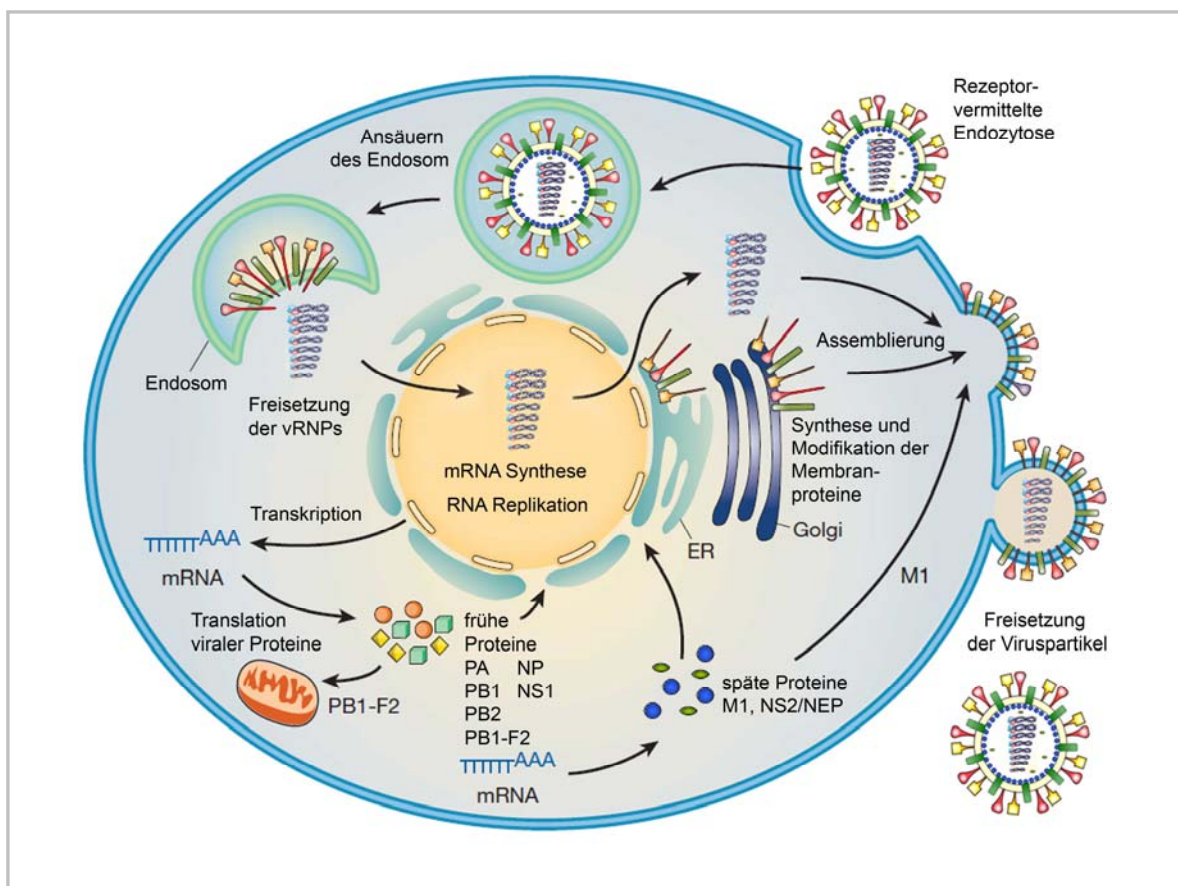
**Adsorption** der Viren an spezifische Wirtszellrezeptoren

**Penetration** in die Wirtszelle und Freisetzung der Nukleinsäure

**Replikation** der Nukleinsäure und Synthese von Virusproteinen

**Zusammenbau** der Nukleokapside

**Freisetzung** der Virionen

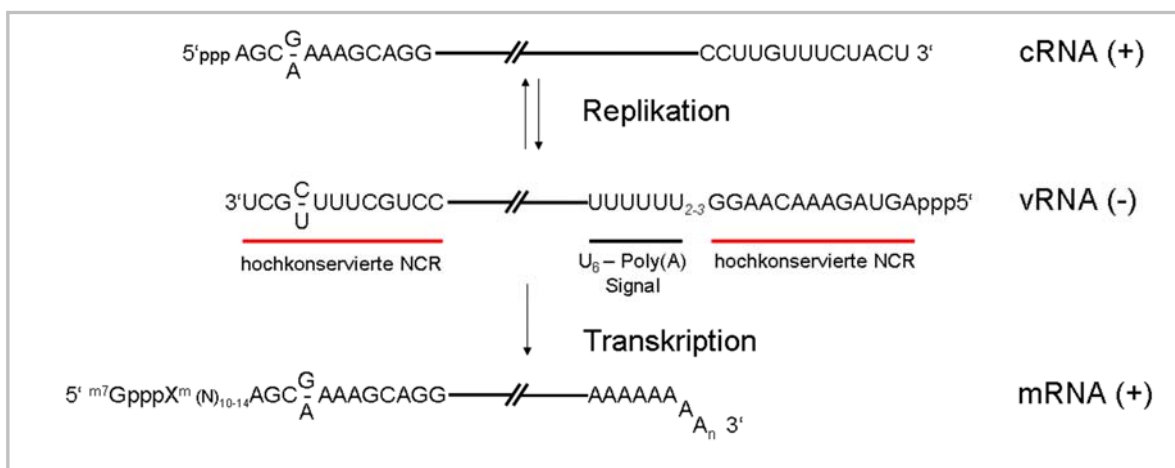


**Abb. 1.6: Schema des Replikationszyklus eines Influenza Virus. Erklärungen siehe Text.** Modifiziert nach Neumann *et al.* 2009.

Im ersten Schritt des Replikationszyklus, der Adsorption, bindet das Virus mittels des HA Proteins auf der Zelloberfläche an endständige N-Acetyl-Neuraminsäuren zellulärer Rezeptoren (Skehel und Wiley 2000). Daraufhin werden die Viren durch Rezeptor-vermittelte Endozytose internalisiert (Matlin *et al.* 1981). Die Ansäuerung in den späten Endosomen verursacht eine Konformationsänderung im HA, welche die Exposition eines hydrophoben Fusionspeptids in der HA2-Untereinheit bewirkt. Dieses dringt in die



Endosomenmembran ein und vermittelt durch weitere Umlagerungen im HA die Fusion von viraler und endosomaler Membran (Skehel und Wiley 2000). Gleichzeitig wird der pH-Wert im Inneren des Virions durch den Einstrom von Protonen über M2-Ionenkanäle weiter erniedrigt. In Folge dessen kommt es zur Destabilisierung der Bindung des Matrixproteins M1 an die vRNPs, welche daraufhin über Fusionsporen ins Zytoplasma der Zelle freigesetzt werden (Helenius 1992). Die vRNPs werden aufgrund der Kernlokalisationssequenzen (NLS) der Nukleoproteine und Polymerasen durch Importine erkannt und in den Zellkern transportiert, in dem Transkription und Replikation durch die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase stattfinden (Whittaker *et al.* 1996; Wang *et al.* 1997). Die Synthese der viralen mRNA erfolgt durch einen Primer-abhängigen Mechanismus. Die Generierung dieser Primer, die für die Initiation der viralen Transkription nötig sind, ist von der Aktivität der zellulären Polymerase II abhängig. Die PB2 Untereinheit der viralen Polymerase erkennt und bindet die  $m^7\text{Gppp}$ -Kappen neu synthetisierter zellulärer prä-mRNAs, welche ungefähr 10-13 Nukleotide von der 5'-Kappe durch die Endonukleaseaktivität der PA Untereinheit abgespalten wird (Dias *et al.* 2009). Dieser als *Cap-snatching* bezeichnete Vorgang stellt eine 5'-Kappe und ein freies OH-Ende zur Verfügung, welches zur Initiation der Transkription viraler mRNA durch die virale Polymerase dient (Abbildung 1.7) (Neumann *et al.* 2004). Die PB1 Untereinheit verlängert die Nukleotidkette, bis sie ungefähr 16 Nukleotide vor dem Ende durch sterische Hinderung an einem Polyuridin-Bereich der vRNA ins „Stottern“ gerät (Abbildung 1.7). Durch mehrfaches Kopieren dieses Bereiches kommt es zur Polyadenylierung der viralen mRNA (Luo *et al.* 1991).



**Abb. 1.7: RNA-Synthese des Influenza A Virus.** Die virale Polymerase katalysiert, ausgehend von der vRNA, drei verschiedene Polymerisierungsreaktionen (schwarze Pfeile). Mit Hilfe eines zellulären Primers wird virale mRNA synthetisiert. Für die Replikation der vRNA werden zuerst vollständige komplementäre Kopien der vRNA Segmente synthetisiert, die cRNA. Von diesen Vorlagen ausgehend werden dann neue vRNA Moleküle synthetisiert.

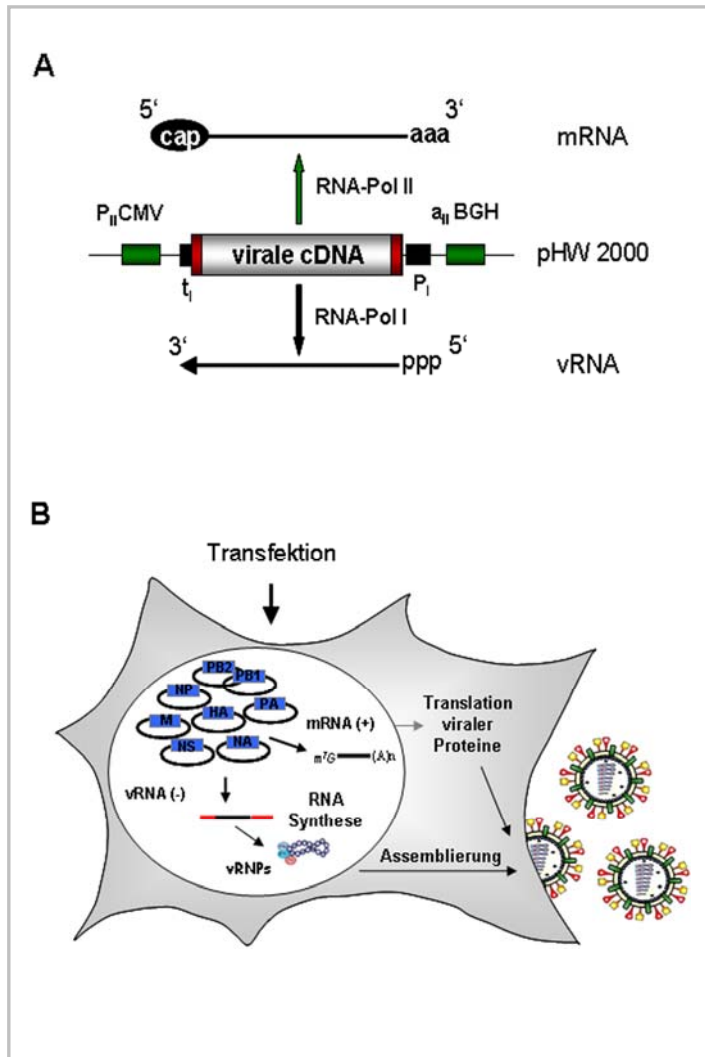
Die mRNAs der viralen Proteine M2 und NEP/NS2 werden durch zelluläre Spleißosomen erzeugt. Die viralen mRNAs gelangen über die Kernporen ins Zytoplasma. Dort werden die viralen Membranproteine am rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) synthetisiert, während die restlichen Proteine an freien Ribosomen translatiert werden. Aufgrund von karyophilen Signalen werden die Proteine PB1, PB2, PA, NP, M1 und NS1 in den Zellkern transportiert. Das Umschalten von Transkription zu Replikation wird vermutlich durch das Nukleoprotein reguliert. Liegt das Nukleoprotein in ausreichender Menge im Kern vor, verhindert es entweder das Stottern der Polymerase und somit die Polyadenylierung und/oder schützt die neusynthetisierte RNA durch Enkapsidierung vor Degradation (Skorko *et al.* 1991). Dies ermöglicht die Synthese eines vollständigen Gegenstranges der vRNA. Dieser Gegenstrang (cRNA) dient als Matrize für die Synthese neuer vRNAs. Für beide Vorgänge benötigen die viralen Polymerasekomplexe im Gegensatz zur mRNA-Synthese keinen Primer. Sowohl cRNA als auch vRNA werden im Gegensatz zur mRNA schon während ihrer Synthese vollständig mit Nukleoprotein verpackt (Neumann *et al.* 2004). Zusammen mit den Polymerasekomplexen bilden sich neue vRNPs, die in der späten Infektionsphase durch Interaktion mit dem Matrixprotein M1 und dem nukleären Exportprotein NEP/NS2 aus dem Zellkern exportiert werden (O'Neill *et al.* 1998). Das NS1 Protein kann während der viralen Infektion ebenfalls im Kern der Zelle lokalisiert sein. Dieses Protein und seine Funktionen sind im Abschnitt 1.5 näher beschrieben.

Während des Transports der viralen Membranproteine vom rER über Golgi-Apparat und Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zur Zellmembran werden verschiedene Modifikationen, wie N-Glykosylierungen mit komplexen und mannosereichen Zuckerketten sowie Palmitoylierungen, angefügt (Palese and Shaw, 2007). Die endständigen Neuraminsäuren der komplexen Zucker werden von der Neuraminidase entfernt, um eine Bindung durch das HA an diese Zuckerseitenketten und somit eine Quervernetzung zwischen Virionen zu vermeiden (Modrow und Falke 1998). Für die Initiation eines neuen Replikationszyklus ist die proteolytische Spaltung des viralen HA essentiell, da nur dann die pH-abhängige Strukturumlagerung des HA in den Endosomen möglich ist und das Fusionspeptid HA2 exponiert werden kann (Klenk und Garten 1994). Befinden sich die Membranproteine in ausreichender Menge in der Zellmembran, assemblieren dort alle weiteren Virusbestandteile und das Virus kann über Knospung freigesetzt werden. Am Knospungsprozess replikationskompetenter Virionen sind die viralen Proteine HA, NA, M1 und M2 maßgebend beteiligt (Gomez-Puertas *et al.* 2000; Chen *et al.* 2007; Chen *et al.* 2008). Die Neuraminidase-Aktivität ist für das Freisetzen der neu gebildeten Viruspartikel von der Zelloberfläche wichtig, da es dort befindliche endständige Neuraminsäuren

abspaltet und somit eine Retention der Viren durch Bindung der HA Proteine an Sialinsäuren unterbindet (Palese *et al.* 1974).

## 1.2 Reverse Genetik bei Influenza Viren

Einen bedeutenden Fortschritt bei der Bearbeitung vieler fundamentaler Fragestellungen zu Negativstrang-RNA Viren brachte in den letzten Jahren die Entwicklung von Methoden, mit deren Hilfe revers-genetische Analysen möglich sind.



**Abb. 1.8: Herstellung rekombinanter Influenza Viren. (A)** Organisation der Regulationselemente im Vektor pHW2000 des acht-Plasmidsystems: P<sub>I</sub>: humaner RNA-Polymerase I Promoter; t<sub>I</sub>: muriner Terminator; P<sub>II</sub>CMV: Cytomegalovirus RNA-Polymerase II Promotor; a<sub>II</sub>BGH: Polyadenylierungssignal des Gens für das bovine Wachstumshormon (*bovine growth hormone*) **(B)** Zellen werden mit acht Expressionsplasmiden, welche die viralen Genomsegmente des Influenza Virus kodieren, transfiziert. Aufgrund der besonderen Organisation des Vektors werden sowohl vRNAs als auch virale mRNAs durch die zellulären DNA-abhängigen RNA-Polymerasen I und II transkribiert. Nach Synthese der viralen Proteine assemblieren diese mit den vRNPs und neugebildete Virionen werden von der Zelle freigesetzt.

Solche revers-genetischen Ansätze ermöglichen es Viren zu generieren, die Gene enthalten, welche von klonierter cDNA abstammen. Dadurch können Analysen direkt im Kontext einer Virusinfektion durchgeführt werden. In revers-genetischen Studien untersucht man den Einfluss einer durch gerichtete Mutagenese eingebrachten Veränderung der Erbinformation auf den Phänotyp. Da sich über die cDNA gezielt Mutationen in virale Gene einführen lassen, ist es möglich, strukturelle und funktionelle

molekulare Mechanismen viraler Proteine und deren Einfluss auf die Pathogenität zu untersuchen (Conzelmann 2004).

Bei der *de novo* Generierung von Negativstrang-RNA Viren liegt das Hauptproblem darin, dass die genomische Nukleinsäure dieser Viren aufgrund ihrer negativen Polarität nach Transfektion in Zellen keinen Infektionszyklus initiiert. Weder von vRNA noch von cRNA lassen sich virale Proteine translatieren, so dass die vRNA zuerst zu mRNA transkribiert werden muss, wofür die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase benötigt wird. Diese wird bei Infektion vom Virus selbst in die Zelle eingeführt und ermöglicht auch das Umschreiben der vRNA in cRNA. Weiterhin müssen vRNA und cRNA für Transkription und Replikation mit Nukleoprotein enkapsidiert sein. Entsprechend sind vRNPs die kleinsten infektiösen Einheiten.

Eine der zurzeit etablierten Methoden zur *de novo* Generierung rekombinanter Influenza A und B Viren ist das bidirektionale 8-Plasmid System von Hoffmann und Kollegen (Hoffmann *et al.* 2000). Dabei werden komplette cDNA Kopien der einzelnen vRNA Segmente des Influenza A Virus jeweils in einen pHW2000 Vektor subkloniert (Abb.1.8A). Darin wird die virale cDNA einerseits von dem humanen RNA-Pol I-Promotor und dem murinen RNA-Pol I-Terminator und andererseits von einem RNA Polymerase II Promotor und einem Polyadenylierungssignal flankiert. Somit wird die cDNA in humanen Zellen sowohl in negativer Orientierung zu vRNA als auch in positiver Orientierung zu mRNA transkribiert. Die von den viralen mRNAs translatierten Proteine assemblieren mit den vRNPs und die entstandenen Virionen werden von der Zelle freigesetzt (Abbildung. 1.8B).

### **1.3 Das hoch pathogene H5N1 Influenza Virus**

Das heute noch zirkulierende Vogelgrippevirus vom Subtyp H5N1 wurde im Jahre 1997 erstmals in Hongkong direkt von infiziertem Geflügel auf einen Menschen übertragen. Hierbei starben 6 von 18 infizierten Personen (Claas *et al.* 1998; Subbarao *et al.* 1998). Nach einer Phase von lokalen und sporadischen Ausbrüchen kam es ab dem Jahr 2003 zur weiteren Verbreitung. Seitdem haben sich die H5N1 Influenza Viren von Asien bis nach Europa und Afrika ausgebreitet und wurden in vielen Geflügelpopulationen südostasiatischer Länder enzootisch (Ducatez *et al.* 2006). Die hoch-pathogenen Influenza Viren vom Subtyp H5N1 verursachen einen in der Regel schweren Krankheitsverlauf, so dass eine Infektion mit diesen Viren nicht nur in Hühnern tödlich verläuft, sondern auch zum Tode von Wasservögeln führen kann, die das natürliche Reservoir von Influenza A Viren bilden. Des Weiteren sind Influenza Viren vom Subtyp H5N1 in der Lage, in verschiedenen Säugetier-Arten wie z.B. Mäusen ohne vorherige

Adaptation zu replizieren und tödliche Infektionsverläufe zu verursachen. Zudem kommt es immer wieder zu sporadischen Übertragungen auf den Menschen, die schwere respiratorische Infektionen mit hohen Mortalitätsraten zur Folge haben. Seit 2003 gab es insgesamt 471 nachgewiesene H5N1 Infektionen beim Menschen, von denen 282 tödlich verliefen (WHO, Stand vom 28.1.2010). Die Todesrate liegt demnach bei ~ 60 %. Obwohl einige Fälle beschrieben sind, in denen mehrere Familienmitglieder mit H5N1 Influenza Viren infiziert wurden, so sind noch keine stabilen Mensch-zu-Mensch Übertragungen aufgetreten. Dementsprechend werden durch H5N1 Influenza Viren ausgelöste Ausbrüche bisher nur in Phase 3 der WHO Pandemie Warnstufen eingestuft. Einige Studien zeigten, dass hoch-pathogene aviäre H5N1 Influenza Viren im unteren Respirationstrakt von Menschen replizieren können (Tran *et al.* 2004; de Jong *et al.* 2006) und dass dabei der Krankheitsverlauf mit der Viruslast korreliert (de Jong *et al.* 2006). Humane H5N1 Infektionen können in Folge dessen schwere Pneumonien und Lymphopenien (Tran *et al.* 2004; Beigel *et al.* 2005) verursachen. Sie zeichnen sich außerdem in manchen Fällen durch erhöhte Mengen an Zytokinen und Chemokinen aus (To *et al.* 2001; Peiris *et al.* 2004; de Jong *et al.* 2006), was in *in vitro* Studien bestätigt werden konnte (Cheung *et al.* 2002; Chan *et al.* 2005). Abhängig von der Stärke der Virusreplikation kann es zu einer Hyperzytokinämie und Hyperchemokinämie kommen (de Jong *et al.* 2006).

### **1.4 Virulenzfaktoren von Influenza Viren**

Die Pathogenität von Influenza Viren wird durch das Zusammenspiel verschiedener Gene bestimmt und diese Faktoren können zwischen verschiedenen Tierarten variieren. In Vögeln wird die Virulenz hoch-pathogener aviärer Influenza Viren vor allem durch die multibasische Spaltstelle im HA Protein bestimmt (näheres hierzu ist in Abschnitt 1.4.1 beschrieben). Daneben konnten für aviäre Influenza Viren des Subtyps H5N1 zudem Aminosäurepositionen im PA Protein (T515A) (Hulse-Post *et al.* 2007) und im NS1 Protein (V149A) (Li *et al.* 2006) bestimmt werden, die die Virulenz der entsprechenden H5N1 Isolate in Enten und Hühnern modifizieren.

Im Folgenden werden die verschiedenen Virulenzdeterminanten beschrieben von denen angenommen wird, dass sie die Replikation aviärer Influenza Viren in Säugern ermöglichen und die Pathogenität beeinflussen. Jedoch ist bisher noch nicht ausreichend geklärt, auf welche genauen Eigenschaften die hohe Pathogenität der H5N1 Influenza Viren in Säugern zurückzuführen ist.

### **1.4.1 Die Rolle des Hämagglutinin Proteins in der viralen Pathogenese**

Als Oberflächenprotein vermittelt das Hämagglutinin sowohl die Bindung des Virus an die Wirtszelle, als auch die darauf folgende Fusion der viralen und endosomalen Membranen, die zur Freisetzung der vRNPs in das Zytoplasma führt. Diese Funktionen verdeutlichen die wichtige Rolle des HA Proteins im viralen Lebenszyklus.

Die Spaltstelle des HA Proteins trägt als Virulenzdeterminante wesentlich zur Pathogenität von Influenza Viren bei. Die Spaltung des HA Proteins ist essentiell für die virale Infektiosität, da die Freilegung des HA2 Fusionspeptids die Fusion zwischen der Virushülle und der endosomalen Membran bewirkt. Diese Fusion ist entscheidend für die Freisetzung der vRNPs in das Zytoplasma. Die Spaltung des HA Proteins wird durch die Aminosäuresequenz an der Spaltstelle bestimmt. Niedrig-pathogene aviäre Influenza Viren und die meisten nicht aviären Influenza Viren besitzen eine monobasische Spaltstelle, die nur durch sekretierte Proteasen (z. B. Protease Clara oder Plasmin in der Lunge) der respiratorischen und / oder intestinalen Organe gespalten wird (Kido *et al.* 1999). Dadurch ist die virale Replikation lokal begrenzt. Im Gegensatz dazu besitzen manche HA Proteine vom Subtyp H5 und H7 eine multibasische Spaltstelle (Kawaoka und Webster 1988; Hatta *et al.* 2001). Diese wird durch ubiquitär exprimierte Subtilisin-ähnliche Proteasen der Furinfamilie gespalten und kann daher zu systemischen Infektionen führen. Nach Spaltung des HA Proteins in die Untereinheiten HA1 und HA2 bleiben diese über eine Disulfidbrücke verbunden (Stieneke-Grober *et al.* 1992).

### **1.4.2 Anpassungen des PB2 Proteins an Säugerzellen**

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch der virale Replikationskomplex einen bedeutenden Einfluss auf die Pathogenität in Säugern ausübt. Dabei wurde zuerst die Aminosäureposition 627 des PB2 Proteins identifiziert, die es aviären Influenza Viren ermöglicht in Säugerzellen zu replizieren (Subbarao *et al.* 1993; Massin *et al.* 2001). Zudem beeinflusst die entsprechende Aminosäureposition die Pathogenität von H5N1 Influenza Viren in Mäusen (Hatta *et al.* 2001). Dabei waren Viren, die Lysin an Position 627 besitzen, pathogen in Mäusen, während Viren mit einem Glutaminsäurerest an dieser Stelle weniger virulent waren (Hatta *et al.* 2001). Interessanterweise ist ein Lysinrest an dieser Position in humanpathogenen Influenza Viren hoch konserviert, während in den meisten aviären Viren Glutaminsäure an dieser Position vorkommt. Weitere Studien in Mäusen zeigen, dass das Lysin keine Veränderung des Gewebstropismus bewirkt, sondern einen Einfluss auf die virale Replikationsfähigkeit in Säugern hat. Zusammengefasst lassen diese Ergebnisse vermuten, dass PB2-Lysin 627 die effiziente

Replikation sowohl im unteren also auch oberen Respirationstrakt von Säugern erlaubt und somit auch die Transmission fördert. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass ein Austausch von PB2-Lysin 627 zu Glutaminsäure die Übertragbarkeit humaner Influenza Viren im Meerschweinchen Model reduziert (Steel *et al.* 2009). Strukturanalysen (Tarendeau *et al.* 2008; Kuzuhara *et al.* 2009) des PB2 Protein zeigten zudem, dass PB2-Lysin 627 Teil einer positiv geladenen Vertiefung ist, die durch Substitution zu Glutaminsäure strukturell verändert wird. Zudem wurde Position 701 des PB2 Proteins als mögliche weitere Virulenzdeterminante identifiziert (Li *et al.* 2005; Gabriel *et al.* 2007). Diese verstärkt die Bindung von PB2 an Importin  $\alpha$  (einen zellulären Kernimport Faktor) und fördert daher vermutlich auch den Kerntransport in Säugetierzellen (Gabriel *et al.* 2008).

### 1.4.3 Das proapoptotische Protein PB1-F2

Die PB1 Segmente der meisten aviären und humanpathogenen Influenza A Viren kodieren für ein zweites Protein, das PB1-F2, welches von einem alternativen Leserahmen exprimiert wird (Chen *et al.* 2001). Das PB1-F2 Protein induziert vermutlich Apoptose durch Interaktion mit zwei mitochondrialen Proteinen (Chen *et al.* 2001; Zamarin *et al.* 2005). Zudem steigert es Entzündungen in Mäusen und erhöht das Auftreten von sekundären bakteriellen Infektionen (McAuley *et al.* 2007). Außerdem trägt es vermutlich zur Virulenz bei, indem es mit dem PB1 Protein interagiert und dieses im Zellkern für eine effiziente Replikation zurückhält (Mazur *et al.* 2008). Kürzlich konnte eine Studie zeigen, dass die Aminosäure Serin an Position 66 im PB1-F2 Protein die Pathogenität eines H5N1 Virus in Mäusen beeinflusst (Conenello *et al.* 2007). Diese Aminosäure findet sich auch im Virus der „spanischen Grippe“ von 1918 und eine Substitution an dieser Position zu Asparagin führt zur Attenuierung des rekombinanten Virus in Mäusen (Conenello *et al.* 2007).

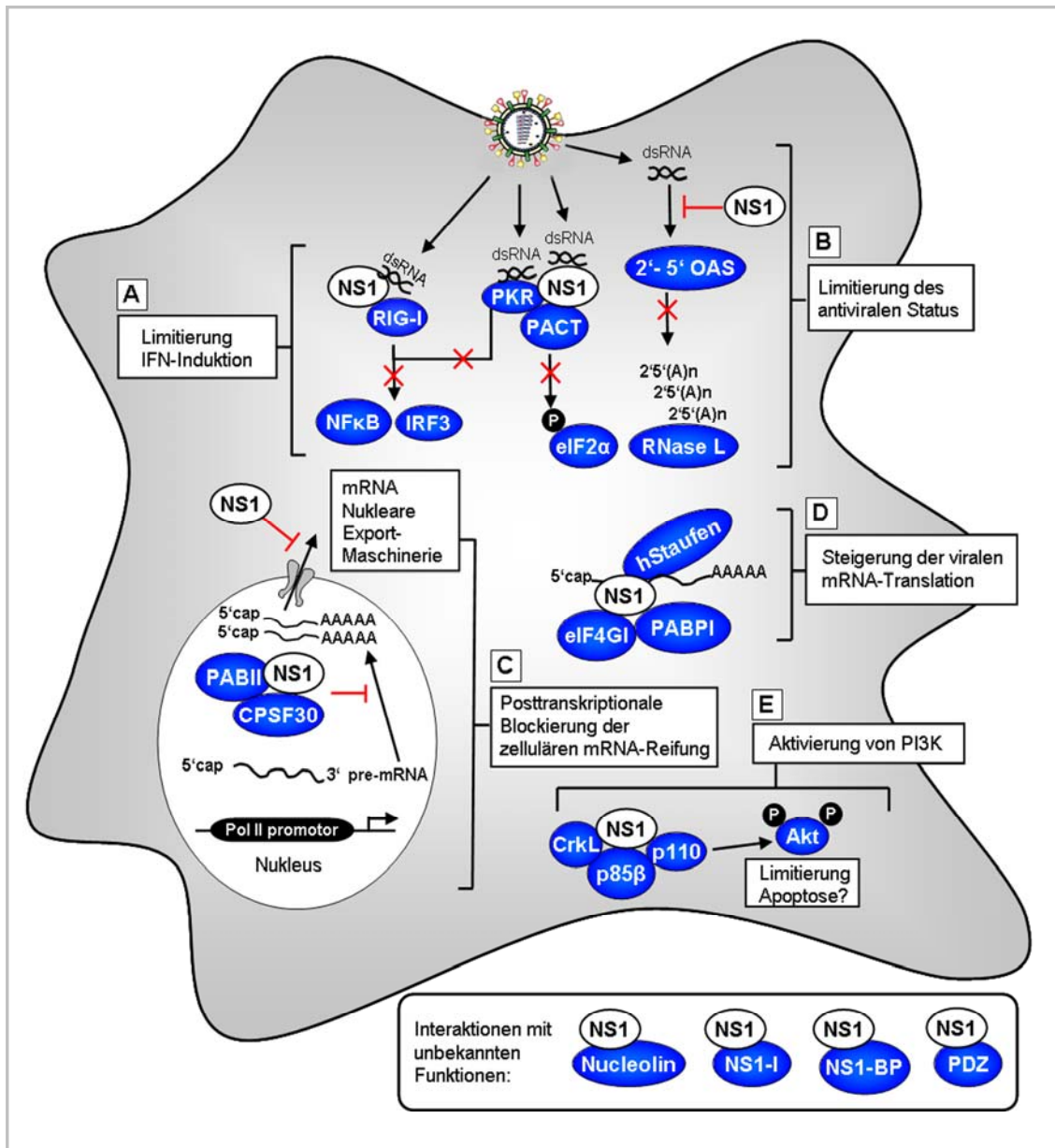
**Tabelle 1.2 Virulenzmarker in Säugern**

Protein	Position	Pathogenität		Funktion
		niedrige	Hoch	
PB2	627	Glu	Lys	Replikation in Säugern
	701	Asp	Asn	Kernimport; Replikation in Mäusen
PB1-F2	66	Asn	Ser	Apoptose Induktion
HA	Spaltstelle	monobasisch	multibasisch	HA Spaltung
NS1	92	Asp	Glu	Inhibierung der IFN Antwort?



### 1.5 Das virale Nichtstrukturprotein 1

Das virale Nichtstrukturprotein 1 (NS1) gilt allgemein als multifunktionaler Virulenzfaktor, der es Influenza Viren ermöglicht die Immunantwort des Wirtes zu antagonisieren (Egorov *et al.* 1998; Garcia-Sastre *et al.* 1998; Kochs *et al.* 2007).



**Abb. 1.9: Schematische Darstellung der verschiedenen NS1-Funktionen in infizierten Zellen. A)** Posttranskriptionelle Limitierung der IFN-Induktion. **B)** Limitierung des antiviralen Status durch PKR und OAS/RNaseL. **C)** Posttranskriptionelle Blockierung der zellulären mRNA-Prozessierung und dessen nukleären Exports. **D)** Erhöhung der viralen mRNA-Translation. **E)** Aktivierung von PI3K. In der unteren Box sind Interaktionen mit unbekanntem Folgen und/oder Lokalisationen abgebildet. Modifiziert nach Hale *et al.* 2008.

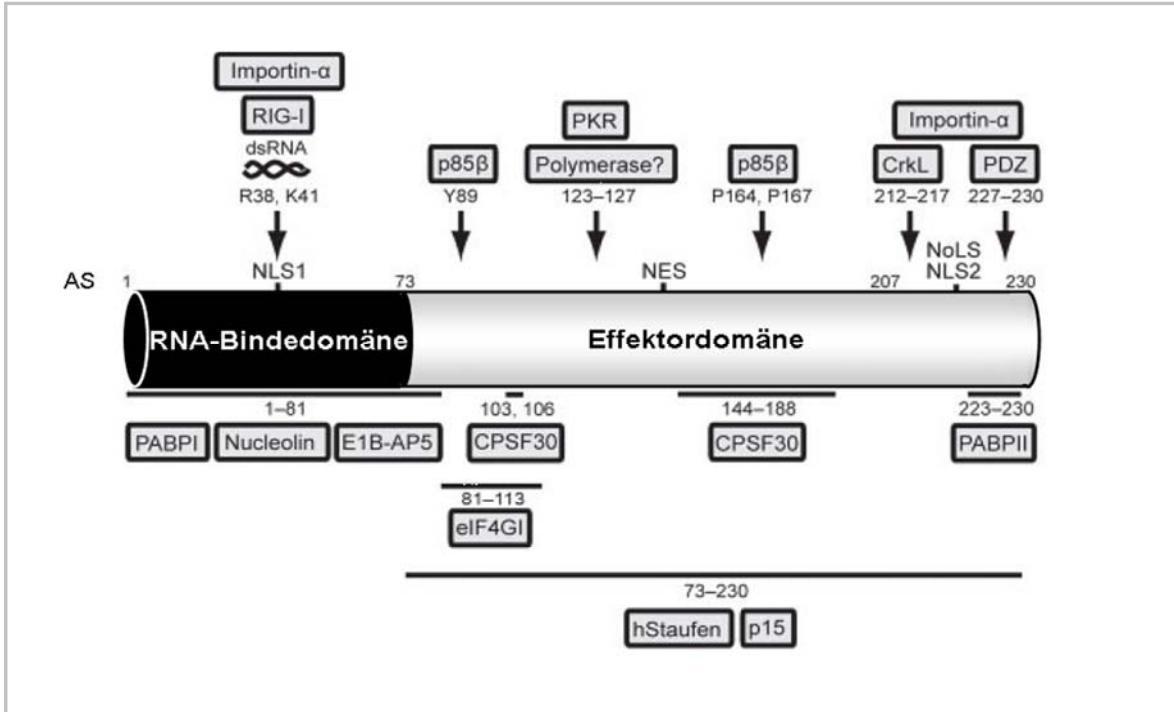


Das NS1 Protein ist für eine effiziente Virusreplikation essentiell, da u. a. die genetische Deletion des NS1 Genes zu einer starken Attenuierung der viralen Vermehrung und erhöhten Interferon (IFN)-Ausschüttung führt (Garcia-Sastre *et al.* 1998). Die Hauptaufgabe des NS1 Proteins liegt in der Inhibierung der Wirtszellimmunantwort. NS1 antagonisiert dabei vor allem die Typ I IFN-Produktion sowie die Wirkung IFN-induzierter Gene (Lin *et al.* 2007; Hale *et al.* 2008; Wolff *et al.* 2008). Hierzu interagiert das NS1 Protein mit zahlreichen zellulären Proteinen wie PKR, OAS, TRIM25/RIG-I, CPSF30, PABII und PI3K und bewirkt dadurch (i) die Kontrolle des viralen mRNA Spleißens (Alonso-Caplen und Krug 1991; Fortes *et al.* 1994; Lu *et al.* 1994; Qiu *et al.* 1995; Garaigorta und Ortin 2007); (ii) die Verstärkung der viralen mRNA Translation (de la Luna *et al.* 1995; Salvatore *et al.* 2002; Burgui *et al.* 2003); (iii) die Unterdrückung der Immunantwort und der Apoptose Induktion (Garcia-Sastre *et al.* 1998; Zhirnov *et al.* 2002; Ehrhardt *et al.* 2007; Shin *et al.* 2007; Zhirnov und Klenk 2007); (iv) die Aktivierung der Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K) (Ehrhardt *et al.* 2007; Hale und Randall 2007; Shin *et al.* 2007; Ehrhardt und Ludwig 2009). Außerdem wurde ein Stamm-abhängiger Einfluss auf die Pathogenese beschrieben (Kochs *et al.* 2007). Alle diese Funktionen des NS1 beruhen auf seiner Fähigkeit, eine Vielzahl von Protein–Protein und Protein–RNA Interaktionen einzugehen. Einen Überblick über die verschiedenen Funktionen und Interaktionspartner des NS1 Proteins geben Abbildung 1.9 und 1.10 und sind in (Lin *et al.* 2007; Hale *et al.* 2008; Wolff *et al.* 2008) zusammengefasst.

### 1.5.1 Die Struktur des NS1 Proteins

Das NS1 Protein kann in zwei funktionelle Domänen unterteilt werden. Die N-terminale RNA Bindungsdomäne (Aminosäuren 1-73, Abbildung 1.10) bindet Sequenz-unabhängig *in vitro* einzel- und doppelsträngige RNA (dsRNA) Spezies, darunter vRNA, virale mRNA, zelluläre U6 snRNA, poly(A)-Sequenzen zellulärer mRNA und synthetische dsRNA (Wang *et al.*, 2008; Qiu *et al.*, 1995; Qiu and Krug, 1994; Hatada and Fukuda, 1992; Hatada *et al.*, 1992). Die C-terminale „Effektor“-Domäne (Aminosäuren 74–230, siehe Abbildung 1.10) vermittelt überwiegend Interaktionen mit Wirtszellproteinen und stabilisiert die Bildung eines NS1 Homodimers (Wang *et al.* 2002), das für die RNA-Bindefähigkeit des NS1 Proteins essentiell ist (Wang *et al.*, 1999). Das NS1 Protein hat eine Virusstamm-spezifische Länge von 230–237 Aminosäuren, und eine molekulare Masse von ca. 26 kDa (Palese & Shaw, 2007). Allerdings sind auch NS1 Proteine mit natürlich auftretenden C-terminalen Verkürzungen von ~15–30 Aminosäuren beschrieben worden (Suarez und Perdue 1998). Das NS1 Protein liegt in der Wirtszelle als Homodimer vor (Nemeroff *et al.*

1995). Die Bildung des Homodimers (Wang *et al.* 1999) sowie die beiden basischen Aminosäuren Arginin (R) 38 und Lysin (K) 41 sind für die RNA-Bindung essentiell (Abb. 1.10).



**Abb. 1.10: Schematische Darstellung des NS1 Proteins und seiner bekannten zellulären Interaktionspartner.** Das NS1 Protein ist mit seiner N-terminalen RNA-Bindedomäne sowie der C-terminalen „Effektor“-Domäne dargestellt. NS1 beinhaltet zwei nukleäre Lokalisationssignale (NLS1 und 2) und ein nukleäres Exportsignal (NES). Einige Virusstämme haben zusätzlich ein nukleoläres Lokalisationssignal (NoLS), das von dem NLS2 gebildet wird. Die Aminosäurereste R38 und K41, die für die RNA-Bindung zuständig sind, spielen u.a. auch eine Rolle in der Inhibierung von RIG-I (retinoic acid inducible gene I). Daneben besitzt NS1 u.a. Bindungsstellen für PABPI (*poly(A) binding protein I*), p85β, Importin-α, Nucleolin, eIF4GI (eukaryotischer Initiationsfaktor), hStaufen, CPSF30 (*cleavage and polyadenylation specificity factor*), PABPII (*poly(A) binding protein II*) und PDZ-Domänen-beinhaltende Proteine. Modifiziert nach Hale *et al.* 2008.

### 1.5.2 Die intrazelluläre Lokalisation des A/NS1 Proteins

Zahlreiche Studien berichten über verschiedene intrazelluläre Lokalisationsmuster des NS1 Proteins. So konnte für das NS1 Protein des Influenza A/PR/8/34 Virus (H1N1) gezeigt werden, dass es sowohl 72 Stunden (Std.) nach Transfektion in COS-1 Zellen (durch SV40 immortalisierte CV-1 Zellen) als auch 72 Std. nach Infektion in CV-1 Zellen („normal African Green Monkey Kidney Fibroblast“) im Zellkern akkumuliert (Greenspan *et al.* 1988). Während die NS1 Proteine des A/WSN/33 (H1N1) Virus und des A/Udm/73 (H3N2) Virus drei Stunden nach Infektion in MDCK Zellen im Zellkern lokalisieren, ist das NS1 Protein des A/WSN/33 in mTEC Zellen hingegen 3 Tage nach Infektion überwiegend im Zytoplasma zu finden (Newby *et al.* 2007). Weitere Untersuchungen zeigen zudem für

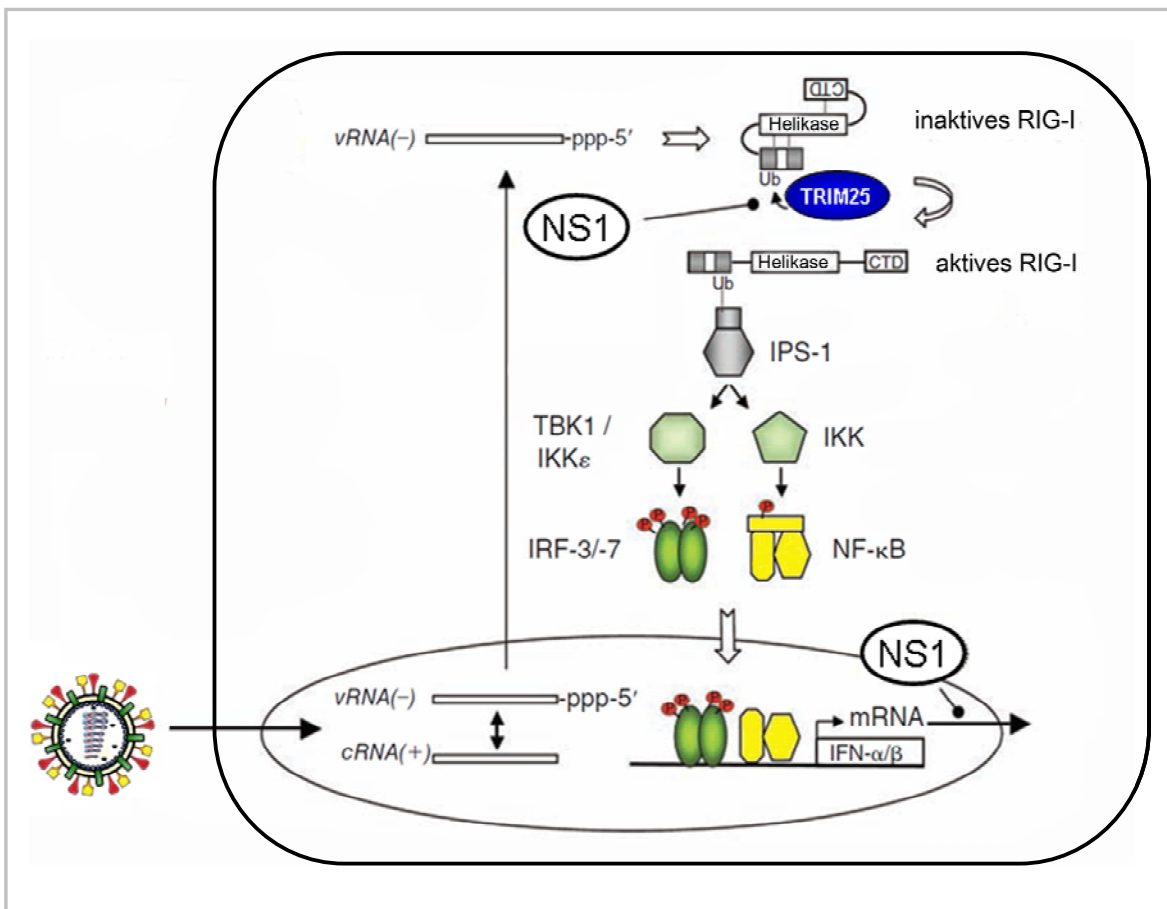
das NS1 Protein des A/WSN/33 Virus neben einer nukleären auch eine nukleoläre Lokalisation 6 und 12 Stunden nach Infektion in A549 Zellen. Die unterschiedliche Verteilung der NS1 Proteine hängt hierbei vermutlich von verschiedenen Faktoren wie dem Virenstamm, dem verwendeten Zelltyp und der Zeit nach Infektion ab.

Die aktive Translokation in den Nukleus wird durch Bindung zweier nukleärer Lokalisationssignale (NLS1 und 2) (Abb.1.10) an das zelluläre Importin- $\alpha$  vermittelt (Melen *et al.* 2007). Das NLS1 beinhaltet die Aminosäuren R35, R38 und K41, die auch für die dsRNA-Bindung nötig sind. Dagegen ist das NLS2 im C-Terminus einiger NS1 Proteine lokalisiert und konnte durch Melen und Kollegen auf die Aminosäuren 203-230 in den NS1 Proteinen der Influenza Viren A/WSN/33 und A/Udorn/72 eingegrenzt werden. Hierbei wurden abhängig vom Isolat die Aminosäuren K219, R220, R224 und K229 als wichtig für die Kernlokalisierung beschrieben. Da das NS1 Protein des VN/1203 Virus neben der C-terminalen Verkürzung auch eine interne Deletion von 5 Aminosäuren (AS 80-84) besitzt, finden sich in diesem Protein die für das NLS2 beschriebenen Aminosäuren an Position K213 und R214. Es werden drei Mechanismen zur Regulation der zytoplasmatischen Lokalisation diskutiert (Hale *et al.* 2008a). Zum einen könnte ein zelluläres oder virales Protein NS1 im Zytoplasma sequestrieren, welches dann das NLS des NS1 Proteins maskiert. Zum anderen wird ein nukleäres Exportsignal (NES) in NS1 beschrieben, welches „alleine“, ohne Beteiligung des NLS, den Transport vermittelt (Abb.1.8 A) (Li *et al.* 1998). Das NES liegt innerhalb der Aminosäuresequenz 138 bis 147 und wird normalerweise durch die Aminosäuren 148 bis 161 maskiert. Der dritte Mechanismus beschreibt einen „Konkurrenzkampf“ zwischen NES und NLS. Sofern das NLS durch einen NS1-Bindungspartner maskiert ist, wird das NES aktiv und der zytoplasmatische Transport des NS1 Proteins beginnt (Hale *et al.* 2008a). Neben den nukleären Lokalisationssignalen des NS1 Proteins wurde für das NS1 Protein des A/Udorn/72 (H3N2) auch ein nukleoläres Lokalisationssignal (NoLS) bestimmt, das mit dem NLS2 überlappt (Melen *et al.* 2007). Es sei angemerkt, dass es bei der Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von Proteinen, abhängig vom Zell-Fixierungsprotokoll, zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen kann.

### **1.5.3 Limitierung der Interferon - Induktion durch NS1**

Die Typ I-IFN Antwort der Wirtszelle ist ein wirksamer antiviraler Mechanismus, der die Replikation und Verbreitung von Viren verhindern kann. Typ I Interferone, wie z. B. IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$ , sind lösliche Zytokine, die als Antwort auf eine Virusinfektion von Zellen synthetisiert und sekretiert werden. Diese Zytokine können autokrin sowie parakrin

wirken, um die Expression von mehr als 300 IFN-abhängigen Genen zu regulieren (Randall und Goodbourn 2008). Zur Aktivierung dieser angeborenen Immunantwort kommt es, wenn Pathogen-assoziierte Strukturen (*pathogen associated molecular patterns* - PAMPS) wie z.B. virale dsRNA von membran-assoziierten Rezeptormolekülen, wie den *Toll-like* Rezeptoren (TLR), oder intrazellulären Sensormolekülen als fremd erkannt werden. Zu den intrazellulären Sensormolekülen gehören das *Retinoic acid-induced Gen 1* (RIG-I) und das *Melanoma differentiation-associated Gen 5* Produkt (MDA5) (Andrejeva *et al.* 2004; Yoneyama *et al.* 2004).



**Abb. 1.11: Schematische Darstellung der Induktion und Inhibition der RIG-I-Signalkaskade durch Influenza Viren.** Das virale Genom wird im Zellkern infizierter Zelle repliziert. Später im Replikationszyklus werden die viralen Gensegmente mit ihren 5'-triphosphat Gruppen in das Zytoplasma transportiert, wo sie zur Aktivierung der RNA Helikase RIG-I führen. Nach der Erkennung von viraler RNA durchläuft RIG-I Konformationsänderungen, die eine Bindung an den mitochondrialen IFN-β Promotor Stimulator-1 (IPS-1) ermöglichen. Dies bewirkt im Folgenden die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF-3/-7 und NF-κB, die die Typ I IFN Gene induzieren. Die Bindung von RIG-I an IPS-1 benötigt die Ubiquitinierung der zweiten „caspase recruitment domain“ (CARD) des RIG-I durch die Ubiquitin Ligase „tripartite motif protein 25“ (TRIM25). Das NS1 Protein bildet einen Komplex mit TRIM25, wodurch die Ubiquitinierung des RIG-I Proteins und in Folge dessen die Induktion von IFN gehemmt wird. Das NS1 Protein von Influenza A Viren inhibiert zudem den Export zellulärer poly(A)-RNA in das Zytoplasma. Modifiziert nach Wolff und Ludwig 2009.

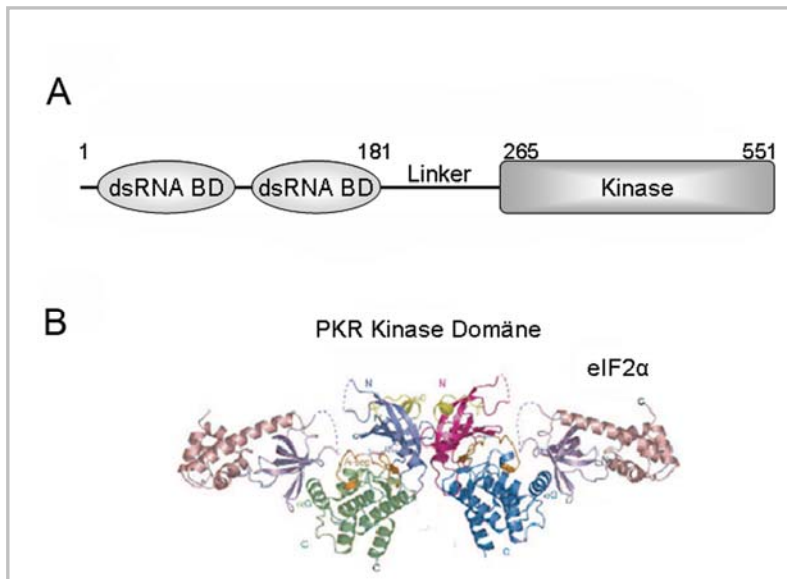
Während einer Influenza Virus Infektion erkennt RIG-I virale RNA-Moleküle vermutlich aufgrund von strukturellen dsRNA-Bereichen und/oder einer Triphosphatgruppe am 5'-Ende der vRNA. Dies führt zur Aktivierung des RIG-I Signalweges. Hierbei wird RIG-I durch TRIM25 (*tripartite motif protein 25*) aktiviert und interagiert mit dem mitochondrial gebundenen Adapterprotein IPS-1 (auch als MAVS oder VISA bekannt). Dies führt zur Aktivierung verschiedener zellulärer Proteinkinasen wie z.B. TBK1 (*tank binding kinase*) und IKK (I $\kappa$ B Kinase-Komplex). Diese Kinasen aktivieren die Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B und IRF3/7, welche daraufhin im Zellkern die Transkription der Typ I IFN-Gene vermitteln (Abbildung 1.11). IFN  $\alpha/\beta$  bewirkt über weitere Signalkaskaden die Expression einer Vielzahl antiviraler Proteine, wie z.B. der dsRNA abhängigen Protein Kinase R (PKR) und der 2',5'-Oligoadenylatsynthetase (OAS). Dies führt zur Etablierung eines antiviralen Status in der Zelle (Platanias 2005; Borden *et al.* 2007). Als Interferonantagonist (Garcia-Sastre *et al.* 1998; Garcia-Sastre 2001) hemmt das NS1 Protein auf unterschiedliche Weise sowohl die Aktivierung von RIG-I, als auch von OAS und PKR (für PKR siehe auch Abschnitt 1.6).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des RIG-I Proteins durch Interaktion des Influenza NS1 Proteins mit TRIM25 inhibiert wird. Dadurch wird die Ubiquitinierung der zweiten CARD Domäne des RIG-I Proteins verhindert (Gack *et al.* 2009). Dies hemmt die Aktivierung des RIG-I Signalweges und somit die IFN-Induktion. Neben der Antagonisierung der IFN-Induktion inhibiert das NS1 Protein auch die Aktivität IFN-stimulierter Genprodukte, indem es z. B. die Autophosphorylierung und somit die Aktivierung von PKR unterdrückt. PKR spielt eine wichtige Rolle in der angeborenen antiviralen Immunabwehr und wirkt als Signalvermittler in vielen zellulären Prozessen. Der folgende Abschnitt soll einen Überblick über das Protein geben, da die Wechselwirkung zwischen dem NS1 Protein des Influenza A/VN/1203/04 Virus und PKR ein Teil dieser Arbeit ist.

### **1.6 Die doppelstrang-RNA-abhängige Proteinkinase R**

Die dsRNA-abhängige Proteinkinase R (PKR) wird konstitutiv in Vertebraten-Zellen auf einem niedrigen Grundniveau exprimiert und liegt dabei latent als Monomer im Zytoplasma der Zelle vor. Als Regulator der Translation ist PKR in seiner aktiven Form an den Ribosomen lokalisiert (Garcia *et al.* 2006). Durch Typ I IFN-Behandlung kann die Expressionsmenge von PKR in Zellen deutlich gesteigert werden. Das 551-Aminosäure (AS) lange Protein besteht aus drei Domänen: der N-terminalen dsRNA-Bindedomäne (AS 1-180), der C-terminalen Kinase-Domäne (AS 266-551) und der Linker-Domäne (AS

181-265), die den N- und C-Terminus miteinander verbindet (Bonnet *et al.* 2006). Der N-Terminus setzt sich aus zwei dsRNA-Bindedomänen mit einer Länge von jeweils 65-68 AS zusammen (Nanduri *et al.* 1998). Die enzymatische Domäne ist eine Serin/Threonin-Kinase, die zwei distinkte Kinaseaktivitäten besitzt: Autophosphorylierung und Phosphorylierung der  $\alpha$ -Untereinheit des Substrates eIF2 $\alpha$  (eukaryotischer Initiationsfaktor 2 $\alpha$  der zellulären Translation). In der Abbildung 1.12 (A und B) ist die schematische und dreidimensionale Struktur des humanen PKR Proteins dargestellt.



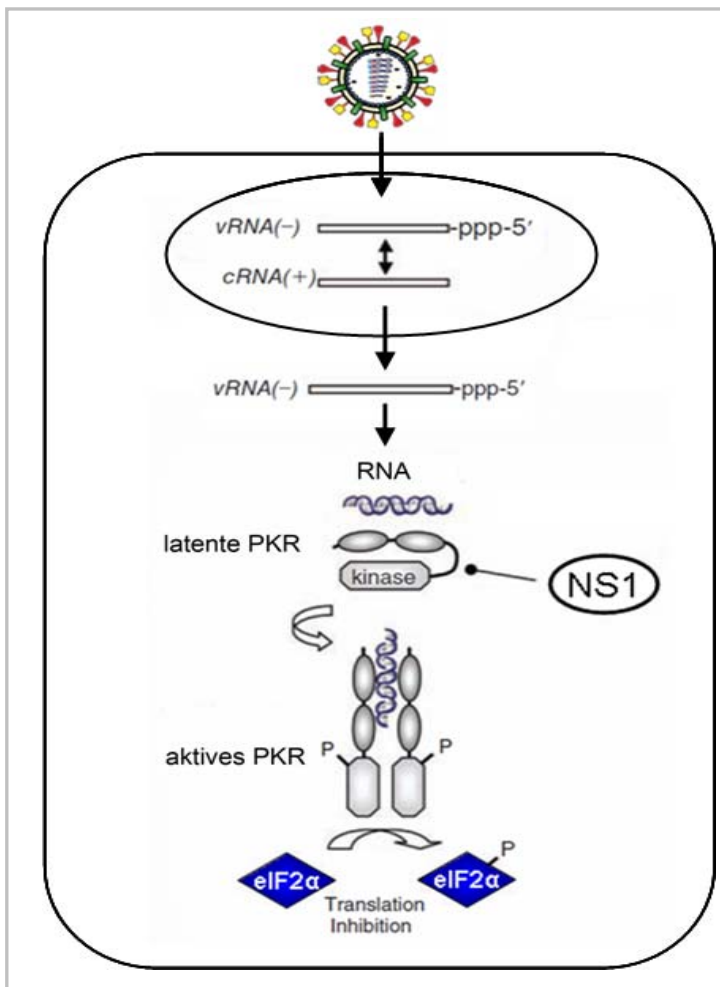
**Abb. 1.12: Schematische und dreidimensionale-Darstellung des humanen PKR Proteins. (A)** PKR besteht aus 551 AS und hat ein Molekulargewicht von rund 68 kDa. Das Protein setzt sich aus drei Domänen zusammen: den zwei N-terminalen dsRNA-Bindedomänen (dsRNA BD), der Linker-Domäne und der C-terminalen katalytischen Kinase-Domäne. **(B)** Dreidimensionale Darstellung eines PKR-Homodimers und gebundenem eIF2 $\alpha$  Garcia *et al.* 2006.

PKR ist neben GCN2, PERK und HRI eine der vier Säuger-Kinasen, die eIF2 $\alpha$  phosphorylieren (Garcia *et al.* 2006). Während einer Infektion erkennen und binden die zwei dsRNA-Bindedomänen der PKR virale dsRNA-Moleküle.

Frühe Studien identifizierten dsRNA mit einer Minimallänge von 34 Basenpaaren als einen Aktivator der PKR (Manche *et al.* 1992). Diese dsRNA entsteht in Zellen vor allem bei Infektion mit komplexen DNA Viren wie z.B. Vaccinia Virus, Adeno Virus und Herpes Simplex Virus, die für bidirektionale Leserahmen kodieren und dementsprechend bei der Transkription duplex RNA bilden (Jacobs und Langland 1996). Für das Influenza B Virus hingegen zeigte eine neuere Studie, dass PKR in der späten Phase der Infektion durch vRNPs im Zytoplasma aktiviert wird (Dauber *et al.* 2009). Dabei kommt es zu strukturellen Umlagerungen innerhalb des PKR Moleküls. Dieser Schritt geht einher mit der Homodimerisierung zweier PKR-Moleküle und der trans-Autophosphorylierung der Aminosäurereste Threonin 446 und 451, der weitere Phosphorylierungen von bis zu 20 zusätzlichen Aminosäuren folgen (Sadler und Williams 2007). Durch diese Modifikationen wird PKR vollständig aktiviert und kann nun das Serin 51 der eIF2 $\alpha$ -Untereinheit phosphorylieren (Pathak *et al.* 1988). Dies verhindert die Wiederherstellung der aktiven



eIF2 $\alpha$ -Form, welche für eine fortlaufende Translation essentiell ist (kein Austausch von GDP zu GTP in eIF2 $\alpha$ ) (Samuel 1993). Hierdurch wird die zelluläre Proteinbiosynthese gestoppt, so dass auch keine viralen Proteine mehr gebildet werden (Abb. 1.13). Neben der Regulation der Translation ist PKR an vielen weiteren biologischen Prozessen beteiligt. So kann die Kinase in verschiedene Signaltransduktionswege eingreifen und die Transkription von Genen regulieren, die u.a. für die Immunantwort (z.B. *nuclear factor kappa B*, NF- $\kappa$ B) und Apoptose (z.B. Tumor Suppressor p53) wichtig sind (Garcia *et al.* 2006). Die PKR-Aktivität kann durch eine Vielzahl zellulärer und viraler Proteine moduliert werden. Das zelluläre Protein PACT (*protein kinase R-activating protein*) ist neben dsRNA ein Protein-Aktivator von PKR. Zellulärer Stress phosphoryliert PACT, wodurch es mit PKR heterodimerisiert und diese aktiviert.



**Abb.1.13: Ablauf der Translationsblockierung durch PKR.** PKR liegt als latents inaktives Monomer in der Zelle vor. Die dsRNA-Bindedomänen des N-Terminus erkennen und binden dsRNA. Die Folge sind PKR-Dimerisierung und zusätzlich Autophosphorylierung des katalytischen C-Terminus. PKR phosphoryliert daraufhin eIF2 $\alpha$ , wodurch die zelluläre und virale Translation blockiert werden. Modifiziert nach Wolff und Ludwig 2009.

Die Gegenwart von aktivem PKR resultiert in einer eingeschränkten Replikationsfähigkeit vieler Viren. Dementsprechend haben viele Virusfamilien Mechanismen entwickelt, um die PKR-Aktivität bzw. deren Auswirkungen zu inhibieren. Die Mechanismen der PKR-Inhibierung sind dabei vielfältig (z.B. Inhibierung der PKR-Phosphorylierung bzw. -Dimerisierung, Stellung eines PKR-Pseudoaktivators bzw. -Substrats, Dephosphorylierung des Substrats eIF2 $\alpha$ ). Die Tab.1.3 listet beispielhaft einige der bekannten inhibitorischen Mechanismen auf, sowie den auslösenden viralen Faktor und das Virus, das den Faktor exprimiert.

**Tabelle.1.3: Virale Faktoren und ihr Mechanismus zur PKR-Blockierung.**

Modifiziert nach (Jacobs und Langland 1996; Garcia *et al.* 2006).

Viraler Faktor	Virus	Inhibitorischer PKR-Mechanismus
E3L	Vaccinia Virus	dsRNA-Sequestrierung
$\gamma$ 134.5	Humanes Herpesvirus Typ 1	eIF2 $\alpha$ -Dephosphorylierung
LANA2	Kaposi's Sarkoma Herpesvirus	Inhibierung eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung
VAI RNA	Adenovirus	PKR-Pseudoaktivator
Tat	Humanes Immundefizienzvirus	PKR-Pseudosubstrat
Us11	Humanes Herpesvirus-Typ 1 HSV Typ 1	Inhibierung PKR-Aktivierung

Verschiedene Hypothesen werden diskutiert bezüglich der Frage, wie das NS1 Protein die PKR Aktivierung antagonisiert. Anfängliche Mutationsanalysen deuteten an, dass die dsRNA-Bindungsdomäne des NS1 Proteins für diese Aktivität benötigt wird. Dies wurde als Sequestrationsmechanismus interpretiert (Lu *et al.* 1995; Hatada *et al.* 1999). Dementsprechend konnte von Tan und Katze gezeigt werden, dass die NS1 dsRNA Bindungsdomäne für eine Komplexbildung zwischen NS1 und PKR in Hefe und Säugerzellen wichtig ist (Tan und Katze 1998). Im Gegensatz dazu deuten neue GST-Kopräzipitationsanalysen auf eine direkte Interaktion im Bereich der PKR Linkerregion hin, die unabhängig von der dsRNA-Bindung des NS1 Proteins ist und durch die Aminosäuresequenz 123-127 des NS1 Proteins vermittelt wird (Min *et al.* 2007).

Zusätzlich dazu konnten Dauber und Kollegen für die Interaktion zwischen dem Influenza B Virus NS1 Protein und PKR zeigen, dass die dsRNA-Bindungsaktivität beider Proteine nötig ist (Dauber *et al.* 2009). Obwohl die Sequenzhomologie zwischen dem A/NS1 und dem B/NS1 nur rund 20 % beträgt, besitzen sie eine ähnliche N-terminale dsRNA-Bindedomäne an der Position 1-73 (A/NS1) bzw. 1-93 (B/NS1) (Wang und Krug 1996; Yin *et al.* 2007). Ein ähnlicher Mechanismus zur Blockierung der PKR-Aktivierung wäre somit auch innerhalb von Influenza A und B Viren denkbar.

Derzeit sind die mechanistischen Grundlagen der Hemmung der PKR Aktivierung durch NS1 noch nicht genau bekannt. Es bleibt daher zu klären, ob die beschriebenen Unterschiede auf die verschiedenen Untersuchungsmethoden zurückzuführen sind, oder ob die NS1 Proteine unterschiedlicher Stämme verschiedene Mechanismen entwickelt haben, um die PKR Aktivierung zu verhindern. Daraus leitet sich eine der Fragestellungen dieser Arbeit ab, in der untersucht wurde, ob und wie das NS1 Protein des H5N1



Influenza A/VN/1203/04 Virus mit PKR interagiert und dessen Aktivierung inhibiert. (Siehe Fragestellungen 1.10)

### **1.7 Die besonderen Eigenschaften von NS1 Proteinen des Subtyps H5N1**

Während eines Infektionsverlaufs von hoch-pathogenen aviären Influenza Viren (HPAIV) kommt es zur Ausschüttung großer Mengen proinflammatorischer Zytokine, die nicht zu einer Reduktion der Virusvermehrung führen (To *et al.* 2001; Cheung *et al.* 2002; Guan *et al.* 2004; Peiris *et al.* 2004). Es wird vermutet, dass das daraus resultierende Zytokin-Ungleichgewicht ein Kofaktor der hohen Mortalität von H5N1 Influenza Virus Infektionen im Menschen ist. In einer einzelnen Arbeit wurde beschrieben, dass die erhöhte Pathogenität einiger H5N1-Virusstämme auf eine Art „Zytokinresistenz“ zurückzuführen sei, die in Verbindung mit einer Punktmutation (D92E) im NS1 Protein stehe (Seo *et al.* 2004). Allerdings ist diese These mittlerweile sehr umstritten. Die Ursache für diese „Zytokinresistenz“ mancher H5N1 Viren bleibt daher noch aufzuklären.

Interessanterweise besitzen human-pathogene H5N1-Virusstämme, die seit dem Jahr 2002 isoliert wurden, entweder die zuvor beschriebene Aminosäuresubstitution D92E oder eine Deletion der Aminosäuren 80 bis 84. Dementsprechend hat das NS1 Protein letzterer H5N1 Influenza Viren eine Länge von 225 Aminosäuren (Suwannakhon *et al.* 2008). Des Weiteren konnten im NS1 Protein verschiedener H5N1 Isolate Aminosäurepositionen bestimmt werden, die sich direkt auf die Virulenz des entsprechenden Isolates in der Maus oder dem Huhn auswirken. Während die Aminosäuresubstitution V149A zu einem pathogenen Phänotyp des A/goose/Guangdong/2/96 im Huhn führt (Li *et al.* 2006), steigert die Aminosäuresubstitution P42S die Virulenz des A/duck/Guangxi/12/03 in Mäusen. In beiden Fällen wurde die gesteigerte Virulenz mit der Fähigkeit korreliert, die IFN  $\alpha/\beta$  Antwort zu antagonisieren.

### **1.8 Das C-terminale PDZ Liganden-Motiv des NS1 Proteins als mögliche Virulenzdeterminante**

Sequenzanalysen aviärer Influenza A Viren identifizierten die vier C-terminalen Aminosäuren des NS1 Proteins als PDZ Liganden-Motiv (PL) (Obenauer *et al.* 2006). PDZ Domänen sind Protein-Protein Bindemotive, die innerhalb von zellulären Proteinen vorkommen, welche in verschiedenen zellulären Signalwegen fungieren und am Aufbau der Zellpolarität beteiligt sind (Hung und Sheng 2002; Spaller 2006). Diese PDZ Domänen erkennen und binden kurze C-terminale Peptidmotive von 4-5 Aminosäuren Länge, die PL

Motive. Das PL Motiv aviärer Influenza A Viren (Aminosäureposition 227-230) besteht aus den Aminosäuresequenzen ESEV oder EPEV und ist hochkonserviert (483 von 622 Isolaten (Obenauer *et al.* 2006)). Im Gegensatz dazu findet sich bei humanpathogenen saisonalen Influenza Virus Isolaten überwiegend die Aminosäuresequenz RSKV (403 von 473 Isolaten (Obenauer *et al.* 2006)). Obenauer und Kollegen zeigten zudem, dass das aviäre NS1 Protein des A/Blue-winged teal/MN/993/80 (H6N6) Isolats mit seinem ESEV Motiv in der Lage ist, bis zu 30 verschiedene humane PDZ Domänen *in vitro* zu binden, während das NS1 Protein des humanen A/Memphis/14/98 (H3N2) Isolats mit seinem C-terminalen RSKV Motiv nicht in der Lage war diese zu binden. Daraus schlussfolgerten Obenauer und Kollegen, dass das aviäre NS1 Protein in humanen Zellen mit PDZ enthaltenen Proteinen interagieren könnte und damit potentiell in der Lage wäre, zelluläre Signalwege zu blockieren, was eine Steigerung der Virulenz zur Folge hätte. Allerdings bleibt es fraglich, ob das unterschiedliche Bindungsverhalten alleine auf die Unterschiede des PL Motivs zurückzuführen sind, da die beiden verwendeten NS1 Proteine sich in insgesamt 37 Aminosäuren voneinander unterscheiden. Zudem wurde die Interaktion des aviären NS1 Proteins mit den beschriebenen PDZ-Domänen enthaltenden Proteinen bisher nicht mit anderen Methoden überprüft oder funktionell evaluiert. In einer weiteren Studie konnten Jackson und Kollegen zeigen, dass die Einführung eines aviären PL Motivs im Hintergrund des Maus-adaptierten A/WSN/33 Virus zu einer leichten Steigerung der Virulenz in Mäusen führte (Jackson *et al.* 2008). Der zugrunde liegende spezifische Mechanismus bleibt jedoch noch aufzuklären. Fraglich ist auch, ob das „aviäre“ ESEV Motiv einen Einfluss auf die hohe Pathogenität von Influenza Viren des Subtyps H5N1 in Säugern hat und damit als Virulenzdeterminante für diese Viren betrachtet werden muss. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, die biologische Signifikanz dieses PL Motivs in der viralen Replikation aufzuklären und ihren Einfluss auf die Pathogenität im Hintergrund eines hoch-pathogenen H5N1 Influenza Isolates zu bestimmen.

### **1.9 Das A/Vietnam/1203/04 Influenza Virus**

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Influenza A/Vietnam/1203/04 (VN/1203) Virus vom Subtyp H5N1 wurde ursprünglich von einem 10 jährigen Jungen aus Vietnam isoliert. Es zeichnet sich durch eine hohe Pathogenität in Menschen (Tran *et al.* 2004), Mäusen (Salomon *et al.* 2006), Frettchen (Govorkova *et al.* 2005; Salomon *et al.* 2006) und Hühnern (Gao *et al.* 2006) aus. Das Virus wird aufgrund seiner genetischen Eigenschaften dem Stamm 1 (Clade 1) und dem Genotyp z der H5N1-Asia Viren zugeordnet (Li *et al.* 2004; Maines *et al.* 2005; WHO 2005). Zur Bestimmung der

Pathogenität des VN/1203 Virus in der Maus wurde in vorherigen Studien die Virus-Dosis bestimmt, die für 50% der Mäuse letal ist. Dieser als Maus-letale-Dosis 50 (MLD50) bezeichnete Wert liegt für das VN/1203 Virus bei einer Plaque bildenden Einheit („*Plaque forming unit*“ (PFU)) (Yen *et al.* 2005; Yen *et al.* 2007).

Das NS1 Protein des VN/1203 Virus weist interessanterweise zwei Deletionen auf. Neben einer Deletion der Aminosäuren 80-84, die in allen H5N1 Viren auftritt, die seit dem Jahr 2002 isoliert wurden, besitzt dieses NS1 Protein zudem auch eine C-terminale Verkürzung um 10 Aminosäuren. Hinsichtlich der beschriebenen Virulenzdeterminanten besitzt das VN/1203 Virus die multibasische Spaltstelle im HA Protein (vergleiche Abschnitt 1.4.1) und die E627K Substitution im PB2 Protein, die eine effiziente Replikation in Säugerzellen ermöglichen sollte.

### **1.10 Fragestellungen der Arbeit**

Hoch-pathogene aviäre Influenza A Viren vom Subtyp H5N1 zirkulieren derzeit in verschiedenen Vogelspezies in Asien, Afrika und Europa und überschreiten sporadisch immer wieder die Speziesbarriere. Diese Infektionen führen im Menschen zu schwerwiegenden Erkrankungen, die schwere Lungenschäden und Pneumonien zur Folge haben können. So führten H5N1 Infektionen bisher beim Menschen in ca. 60% der Fälle (282 von 471 Infizierten) zum Tode. Nur die schlechte Mensch-zu-Mensch Transmission dieser Viren verhinderte bisher eine durch H5N1 Viren verursachte Pandemie. Sollte das Virus jedoch diese Fähigkeit erwerben, könnte dies zum Ausbruch einer weiteren Pandemie mit schwerwiegenden Krankheitsverläufen führen. Um zukünftig neue Therapien gegen diese und andere Influenza Viren entwickeln zu können, ist es wichtig die Faktoren und Mechanismen zu identifizieren, die die hohe Pathogenität von H5N1 Viren verursachen. Als multifunktionaler Virulenzfaktor greift das NS1 Protein des Influenza A Virus in viele zelluläre Prozesse ein, um die virale Replikation zu fördern und die angeborene Immunantwort der Wirtszelle zu inhibieren.

Kürzlich konnte in „aviären“ NS1 Proteinen ein hoch konserviertes Protein-Protein Bindemotiv identifiziert werden, dass aus den Aminosäuren ESEV besteht und der Konsensussequenz eines PDZ Liganden-Motivs entspricht. Diese modularen Protein-Interaktionsdomänen kommen in einer Vielzahl zellulärer Proteine vor und sind u. a. an zellulären Signalwegen, sowie dem Aufbau und Erhalt von Zellpolaritäten beteiligt. Die Interaktion eines NS1 Proteins mit diesen zellulären Proteinen könnte potentiell zur Hemmung diverser Signalwege führen und somit zur Pathogenität von H5N1 Influenza

Viren beitragen. Bisher konnten jedoch noch keine derartig durch NS1 modulierten Signalwege identifiziert werden.

Wenn gleich eine erste *in vitro* Studie eine spezifische Bindung eines aviären NS1 Proteins an humane PDZ Domänen enthaltene Proteine andeutet, und ein gewisser Einfluss dieses Motivs auf die Pathogenität eines Maus adaptierten H1N1 Influenza Stammes nachgewiesen werden konnte, bleiben doch folgende Fragen offen: Spielt das C-terminale PL Motiv ESEV in der viralen Replikation von H5N1 Influenza Viren eine Rolle und trägt es zur hohen Pathogenität in Mäusen und Hühnern bei?

Neben dieser Fragestellung sollte in dieser Arbeit des Weiteren die Interaktion des VN/1203 NS1 Proteins mit der antiviralen Kinase PKR untersucht werden, da dies ein wichtiger Schritt zur Blockierung des antiviralen Status der Wirtszelle ist und somit auch zur Virulenz dieser Viren beiträgt. In der Literatur ist allgemein akzeptiert, dass das NS1 Protein von Influenza A Viren als PKR-Antagonist fungiert, wenngleich der genaue Mechanismus bisher ungeklärt ist. So postulierte die Arbeitsgruppe um R.M. Krug zunächst für die Inhibition der PKR Aktivierung den Mechanismus der dsRNA-Sequestrierung durch das NS1 Protein des Influenza A/Udorn/72 H3N2 Virus (Lu *et al.* 1995), während in einer späteren Arbeit (Min *et al.* 2007) eine direkte PKR-Bindung beschrieben wurde, die unabhängig von der RNA-Bindungsdomäne geschehen soll. Falcon und Kollegen (Falcon *et al.* 1999) jedoch konnte keine NS1-PKR-Interaktion des A/Victoria/3/75 (H3N2) Influenza Virus in Zellextrakten („*in vivo*“) nachweisen.

Um einen weiteren potentiellen Mechanismus der Virulenz von H5N1 Influenza Viren zu entschlüsseln, sollte in dieser Arbeit zudem die Interaktion des VN/1203 NS1 Proteins mit PKR untersucht werden und entsprechend der Mechanismus der Inhibition auf Seiten des NS1 Proteins näher charakterisiert werden. In Folge dessen sollte auch der Einfluss PKR-bindungsdefizienter NS1 Proteine auf die virale Replikation bestimmt werden. Dadurch ließe sich die Notwendigkeit dieser Interaktion für die Antagonisierung der Immunantwort durch das NS1 Protein bestimmen und ihre Rolle als Virulenzdeterminante im Hintergrund eines H5N1 Virus aufklären.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Virusstämme

Influenza A/Puerto-Rico/8/34 Virus erhalten von P. Palese, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY

Influenza A/PR/8 delta NS1 Virus erhalten von A.Egorov, Universität für Bodenkultur, Wien; Garcia-Sastre *et al.* (1998)

Die folgenden rekombinanten Influenza A Viren standen in der AG FG17 am RKI zur Verfügung<sup>1</sup> bzw. wurden eigenständig erstellt<sup>2</sup>:

- Influenza A/Panama/2007/99 (H3N2) Virus<sup>1</sup>
- Influenza A/Panama/2007/ ΔNS1 (H3N2) Virus<sup>1</sup>
- Influenza A/Vietnam/1203/04-WT (H5N1) Virus<sup>2</sup>
- Influenza A/Vietnam/1203-ESEV (H5N1) Virus<sup>2</sup>
- Influenza A/Vietnam/1203-RSKV (H5N1) Virus<sup>2</sup>
- Influenza A/Vietnam/1203-R39A-K41A (H5N1) Virus<sup>2</sup>
- Influenza A/Vietnam/1203-D120A-Q121A (H5N1) Virus<sup>2</sup>
- Influenza A/Vietnam/1203-I123A-M124A (H5N1) Virus<sup>2</sup>
- Influenza A/Vietnam/1203-D125A-K126A (H5N1) Virus<sup>2</sup>

#### 2.1.2 Zelllinien

MDCKII Zellen	Madin Darby Canine Kidney, Canine Zelllinie eines Nierenkarzinoms
A549 Zellen	Humane Epithelzelllinie aus einem Lungenkarzinom
293T Zellen	Humane Nierenkarzinomzelllinie
NIH 3T3	Mausembryo-Fibroblasten
CEF	primäre Hühnerembryo-Fibroblasten

#### 2.1.3 Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i> , Stamm BL26	[F <sup>-</sup> <i>ompT</i> <i>hadS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> ] Bioline, Luckenwalde
<i>Escherichia coli</i> , Stamm XL1-Blue	<i>recA1 end A1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> <i>supE44 relA1 lac</i> [F <sup>+</sup> <i>pro AB lac<sup>f</sup>Z</i> □M15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )] Bioline, Luckenwalde

### 2.1.4 Zellkulturmedien, Zusätze und Material

MEM (Minimal Essential Medium) Gibco / Invitrogen™, Karlsruhe

<b>Kultivierungsmedium</b>	FKS	10 %
	Glutamin	1 %
	Pen/Strep	1 %
	MEM	ad 500ml

---

DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium) Gibco / Invitrogen™, Karlsruhe

<b>Kultivierungsmedium</b>	FKS	10 %
	Glutamin	1 %
	Pen/Strep	1 %
	DMEM	ad 500 ml

---

<b>Infektionsmedium</b>	BSA 30 %	0,2 %
	Glutamin	1 %
	Pen/Strep	1 %
	MEM oder DMEM	ad 500 ml
je nach Zelllinie: kurz vor Gebrauch:	TPCK-Trypsin	1:2000 (zur HA-Spaltung (H3N2 & H1N1))

---

<b>Transfektionsmedium</b>	FCS	10 %
	Glutamin	1 %
	MEM bzw. DMEM	ad 500ml

---

#### Avicel Overlay Medium

2,5 % Avicel RC-581 Pulver in bidestilliertem Wasser lösen und anschließend autoklavieren (121 °C, 20 min)

+	2x konzentriertes MEM Medium	1:1
+	30 % BA	1:75
+	5 % NaHCO <sub>3</sub>	1:100
+	1 % Dextran	1:100
	frisch hinzu: TPCK-Trypsin	1:1000

---

Opti-MEM	Gibco / Invitrogen™, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin (TPCK-behandelt)	Sigma, Steinheim
Zellkulturflaschen	TPP, Schweiz
Zellkulturschalen	Greiner, Solingen

---

### 2.1.5 Bakterienmedien und Zusätze

Alle Nährmedien und Zusätze wurden autoklaviert bzw. bei Hitzeinstabilität sterilfiltriert.

<b>LB-Medium</b>	Trypton Hefeextrakt NaCl • pH 7,2	10 g/l 5 g/l 10 g/l
<b>2 x YT-Medium</b>	Trypton Hefeextrakt NaCl • pH 7,2	16 g/l 10 g/l 10 g/l
<b>SOC-Medium</b>	Trypton Hefeextrakt NaCl KCl • nach dem Autoklavieren Zugabe von 20 mM Mg <sup>2+</sup> -Stock	20 g/l 5 g/l 10 mM 2,5 mM
<b>LB-Agar mit Ampicillin</b>	LB-Medium Bacto-Agar • Autoklavieren und Abkühlen auf unter 50 °C • Zugabe von 100 µg/µl Ampicillin • Gießen des Mediums in Petrischalen	1,5 % (w/v)

---

### 2.1.6 Plasmide

pGex-5x1-PKR-(K296R)	Dauber, B. P15, RKI
p125-Luc (firefly)	T. Fujita; Yoneyama <i>et al.</i> , 1996
pRL-TK-Luc ( <i>Renilla</i> )	Promega
pHW2000	R. Webster; Hoffman <i>et al.</i> , 2000
pHW-A/Vietnam/1203/04-PB2	Zielecki, F. FG17, RKI
pHW-A/Vietnam/1203/04-PB1	Zielecki, F. FG17, RKI
pHW-A/Vietnam/1203/04-PA	Zielecki, F. FG17, RKI
pHW-A/Vietnam/1203/04-HA	Zöhner, A. FG17, RKI
pHW-A/Vietnam/1203/04-NP	Zielecki, F. FG17, RKI
pHW-A/Vietnam/1203/04-NA	Zöhner, A. FG17, RKI
pHW-A/Vietnam/1203/04-M	Zöhner, A. FG17, RKI
pHW-A/Vietnam/1203/04-NS-WT	Zöhner, A. FG17, RKI
pHW-A/Vietnam/1203-NS-ESEV	Zielecki, F. FG17, RKI

---

pHW-A/Vietnam/1203-NS-RSKV	Zielecki, F. FG17, RKI
pHW-A/Vietnam/1203-NS-R38AK41A	Zielecki, F. FG17, RKI
pHW-A/Vietnam/1203-NS-D120A-Q121A	Zielecki, F. FG17, RKI
pHW-A/Vietnam/1203-NS-I123A-M124A	Zielecki, F. FG17, RKI
pHW-A/Vietnam/1203-NS-D125A-K126A	Zielecki, F. FG17, RKI

### 2.1.7 Oligonukleotide

#### RT-PCR-Primer 5' → 3'

46-Uni12a <i>forward</i>	agc aaa agc agg
47-Uni12g <i>reverse</i>	agc gaa agc agg

#### Mutagenesepimer 5' → 3'

##### ESEV- *forward*

cct cca aat cag aaa cgg aaa atg gcg aga aca att

##### ESEV- *reverse*

aat tgt tct cgc cat ttt ccg ttt ctg att tgg agg

##### RSKV- *forward*

aga aac ggt aaa tgg cga gaa caa tta ggt caa aag ttt gaa gaa ata agg tgg c

##### RSKV- *reverse*

gcc acc tta ttt ctt caa act ttg acc taa ttg ttc tcg cca ttt acc gtt tct

##### R38A-K41A- *forward*

cct tga ccg gct tcg cgc aga tca ggc gtc tct aag agg aag agg ca

##### R38A-K41A- *reverse*

tgc ctc ttc ctc tta gag acg cct gat ctg cgc gaa gcc ggt caa gg

##### D120A-Q121A- *forward*

ggc agg ttc cct ttg cat caa aat ggc agc ggc aat aat gga taa aac cat cat a

##### D120A-Q121A- *reverse*

tat gat ggt ttt atc cat tat tgc cgc tgc cat ttt gat gca aag gga acc tgc c

##### I123A-M124A- *forward*

ggc tcc ctt tgc atc aaa atg gac cag gca gca gcg gat aaa acc atc ata ttg aaa g

##### I123A-M124A - *reverse*

ctt tca ata tga tgg ttt tat ccg ctg ctg cct ggt cca ttt tga tgc aaa ggg aac c

##### D125A-K126A- *forward*

ttg cat caa aat gga cca ggc aat aat ggc ggc aac cat cat att gaa agc aaa ctt cag tg

##### D125A-K126A- *reverse*

cac tga agt ttg ctt tca ata tga tgg ttg ccg cca tta ttg cct ggt cca ttt tga tgc aa



**Sequenzierprimer**                      **5'→ 3'**

48-pHW2000_2895f <i>forward</i>	agc tct ctg gct aac tag ag
49-pHW2000_342r <i>reverse</i>	tgg caa cta gaa ggc aca g
169-BD_Uni-NS#1 <i>forward</i>	cga agt tgg ggg gga gca aaa gca ggg tg
170-BD_Uni-NS#2 <i>reverse</i>	ggc cgc cgg gtt att agt aga aac aag ggt g
A-VN-1203-04-NS-245- <i>forward</i>	cac gct acc taa ctg aca tga ctc
A-VN-1203-04-NS-322- <i>reverse</i>	ctg cca ctt tct gct tgg gca tga g

**2.1.8 Enzyme**

M-MuLV Reverse Transkriptase	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Pfu</i> Turbo DNA Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
RNasin (40 U/μl)	Promega, Mannheim
T4 DNA – Ligase (1u/μl)	Roche, Mannheim

**2.1.9 Restriktionsendonukleasen**

BsmBI	NEB Biolabs, Frankfurt am Main
Bsal	NEB Biolabs, Frankfurt am Main
Dpnl	Fermentas, St. Leon-Rot
Esp3I	Fermentas, St. Leon-Rot
PVUI	Fermentas, St. Leon-Rot

**2.1.10 Kits**

BigDye <sup>®</sup> Terminator 3.1 Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega, Mannheim
Expand High Fidelity PCR System	Roche, Mannheim QIAEXII Gel
Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
Humaner IFN-β ELISA Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Invisorb Spin DNA Extraction Kit	Invitex, Berlin
Invisorb Spin Plasmid Mini Two	Invitex, Berlin
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAamp <sup>®</sup> MinElute <sup>™</sup> Virus Spin Kit	QIAGEN, Hilden
QuikChange <sup>™</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg
TNT <sup>®</sup> Coupled Reticulocyte Lysate Systems	Promega, Mannheim

### 2.1.11 Primäre und Sekundäre Antikörper

**Tab.2.1: Verwendete Primärantikörper in der Immunfluoreszenz und im Western Blot.**

Primäre Antikörper					
Bezeichnung	Spezies/Eigenschaft	Verdünnung			Hersteller
		IF	WB	Histo	
α-GST NS1-A Tier 9102	Kaninchenserum	1:5000	1:1000		Bio Genes
α -Influenza A/NP	Maus, polyklonal		1:1000		Serotec
α -Influenza A/PB1 (vk-20) sc-17601	Ziege, polyklonal		1:200		Santa Cruz
α -PKR (N-Terminus)	Kaninchen, monoklonal		1:6000		Epitomics
α -Phospho-PKR (pT446)	Kaninchen, monoklonal		1:3000		Epitomics
α -Aktin	Kaninchen, polyklonal		1:2000		Novus
A-Influenza A OBT1551	Ziege, polyklonal			1:2000	Serotec

**Tab.2.2: Verwendete Sekundärantikörper in der Immunfluoreszenz und im Western Blot.**

Sekundäre Antikörper						
Zielspezies	Modifikation	Spezies	Verdünnung			Hersteller
			IF	WB	Histo	
Kaninchen	Alex Fluor 488 (grün)	Ziege	1:1000			Invitrogen
Kaninchen	Meerrettich- Peroxidase(HRP)	Schwein		1:15000		DAKO
Maus	Meerrettich- Peroxidase(HRP)	Kaninchen		1:15000		DAKO
Ziege	Meerrettich- Peroxidase(HRP)	Kaninchen		1:15000		DAKO
Kaninchen	Meerrettich- Peroxidase(HRP)	Ziege		1:10000		Cell Signaling
Ziege SC-2350	Meerrettich- Peroxidase(HRP)	Rind			1:500	Santa Cruz

### 2.1.12 Puffer und Lösungen

<b>PBS</b>	NaCl	137,0 mM
	KCl	2,7 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	80,9 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
<b>PBS<sup>++</sup>/0,2 % BSA</b>	PBS	
	BSA	0,2 %
	MgCl <sub>2</sub>	0,1 g/l
	CaCl <sub>2</sub>	0,13 g/l

## Material & Methoden

<b>10x SDS-Gelelektrophoresepuffer</b>	Tris Glycin SDS	250 mM 1,92 M 10 g/l
<b>Trenngel-Puffer, pH 8,8</b>	Tris/HCl	1,5 M
<b>Sammelgel-Puffer, pH 6,8</b>	Tris/HCl	0,5 M
<b>2x SDS-Probenpuffer</b>	H <sub>2</sub> O 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 10 % SDS (w/v) Glycerin Bromphenolblau β-Mercaptoethanol	1,2 ml 8,3 ml 6 ml 1,5 ml 9 mg/ml 5 %
<b>Coomassie-Färbelösung</b>	Coomassie- Brilliant Blue R250 Essigsäure Ethanol	0,25 % (w/v) 10 % 45 %
<b>Fixierlösung</b>	Ethanol Essigsäure	30 % 10 %
<b>Entfärbungslösung</b>	Methanol	10 %
<b>Semidry Blotting Puffer</b>	Tris Glycin SDS Methanol	48 mM 39 mM 1,3 mM 20 %
<b>6x DNA-Probenpuffer</b>	Bromphenolblau Xylencyanol Glycerol	0,1 % (w/v) 0,1 % (w/v) 30 %
<b>10x TBE Puffer</b>	Tris Borsäure EDTA, pH 8,0	0,89 M 0,89 M 10 mM
<b>TBS-T</b>	Tris/HCl, pH 8,0 NaCl Tween 20	100 mM 1,5 M 0,5 %
<b>Mowiol</b>	Mowiol 4-88 Glycerol dest.H <sub>2</sub> O	2,4 g 6 ml 6 ml

- über Nacht quellen lassen, dann 12 ml 0,2 M Tris pH 8,5 hinzu
- rührend auf 50-60 °C erhitzen; 15 min bei 4000 rpm zentrifugieren
- zum Überstand 10 % (w/v) DABCO; Aliquots bei -20° lagern

<b>GST-Binding-Puffer</b>	Tris/HCl	20 mM
	NaCl	50 mM
	Triton X-100	0,8 %
	Glycerol	20 %

<b>RIPA-Puffer</b>	NaCl	150 mM
	Triton X-100	1 %
	SDS-Lösung	1 %
	Natriumdesoxycholat	1 %
	<u>Tris/HCl pH 7,5</u>	<u>50 mM</u>
	frisch hinzu:	
	Natriumvanadat	1 mM
	Pefablock	1 mM

---

<b>Kristallviolett</b>	<b>Stocklösung:</b>	1%ig	in 20% Ethanol
	<b>Gebrauchslösung:</b>	1:10	in PBS verdünnt

---

### 2.1.13 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Acrylamidlösung 30 %	Roth, Karlsruhe
Agarose NEEO Ultra Qualität	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad, München
Ampicillin	Roche, Mannheim
Bacto-Agar	Becton-Dickenson, Heidelberg
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Bovines Albumin (BA)	Roth, Karlsruhe
Bovines Serum Albumin 30% (BSA)	PAA Laboratories, Linz
Bromphenolblau	Sigma, Steinheim
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
CL-XPosure™ Film Clear Blue X-Ray Film	Thermo Scientific
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva, Heidelberg
DNA-Längenstandard Fast Ruler™	Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-6x loading buffer	Fermentas, St. Leon-Rot
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fastprep Lysing Matrix D Caps	MP Biomedicals, Inc. Illkirch, Frankreich

## Material & Methoden

---

Formaldehyd 10% (Methanol-frei)	Worthington, PA
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Cambridge/U.K.
Glukose	Roth, Karlsruhe
Glutamin	MP Biomedicals, Eschwege
Glutathion-Sepharose <i>beads</i>	Amersham, Freiburg
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Becton-Dickinson, Heidelberg
Isofluran	Essex, München
Isopropyl- $\beta$ -Thiogalactopyranidose (IPTG)	Biomol, Hamburg
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
LipofectAMINE™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Mowiol 4-88	Calbiochem, Bad Soden
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdesoxycholat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumvanadat	Sigma, Steinheim
Nitrocellulose Transfer-Membran	Schleicher & Schuell
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe
Pefabloc	Roth, Karlsruhe
Penicillin / Streptomycin (Pen / Strep)	Invitrogen, Karlsruhe
Protein-Assay	BioRad, München
Protein-G-Agarose	Roche, Mannheim
Protein-Molekulargewichtsstandard	Fermentas, St. Leon-Rot
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
SuperSignal WestDura Extended Duration Substrat	Thermo Scientific

TEMED	Serva, Heidelberg
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Triton-X100	Serva, Heidelberg
Tween 20	Roth, Karlsruhe

#### **2.1.14 Radiochemikalien**

L-[ <sup>35</sup> S]Methionin	Amersham, Freiburg
-------------------------------	--------------------

#### **2.1.15 Geräte**

ABI Prism 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Geldokumentation	Intas UV-Systeme
SONOPULS HD 70 (Hochleistungs-Ultraschall-Desintegrator)	Bandelin, Berlin
Elektrophoresezubehör	Biorad, München
Power Pac 200 und 300	BioRad, München
Trans-Blot <sup>®</sup> SD Semi-Dry Transfer Cell	Biorad, München
PE Applied Biosystems Gene Amp <sup>®</sup> PCR System 9700	Perkin Elmer
Zellbrutschrank Heracell 150	Heraeus, Hanau
Inkubator	WTB-Binder, Tuttlingen
Sterilbank Hera safe	Heraeus, Hanau
Phero-Temp 40 (Geltrockner)	BioTec Fischer
Gene Quant pro RNA/DNA Calculator	Biochrom, Cambridge
LB941 TriStar Multimode	Berthold Technologies, Bad Wildbad
TECAN GENios Pro	TECAN, Crailsheim
Vortex-Genie <sup>®</sup> 2	USA Scientific,
FastPrep <sup>®</sup> -24 (Homogenisator)	MP Biomedicals, Inc. Illkirch, Frankreich
Isocage System (Mauskäfige)	Tecniplast, Hohenpeißenberg

#### **Zentrifugen:**

Zentrifuge RC5C (Rotoren SS-34, SLA1000, GS3)	Sorvall <sup>®</sup> Instruments
Biofuge pico	Heraeus
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf
Multifuge 1S-R mit Rotor 75002000	Heraeus

### **Thermocycler:**

Primus 96

PEQLAB, Erlangen

### **Mikroskope:**

Laser Scan Mikroskop LSM 510

Zeiss, Jena

Immunfluoreszenz Mikroskop Nikon Diaphot 300

Nikon, Düsseldorf

LEICA Inversionsmikroskop DMIL

Leica, Wetzlar

### **Software:**

Windows XP

Betriebssystem

Microsoft Word 2007

Textverarbeitung

Microsoft Powerpoint 2007

Graphikgestaltung

Microsoft Excel 2007

Graphikerstellung

Lasergene6

Sequenzauswertung

Clone Manager 9

Virutelle Klonierung

LSM 510

Kamera Steuerung

Zeiss, Oberkochen

Adobe Photoshop CS3 extended

Bildbearbeitung

EndNote X2

Referenzmanager

Adobe Acrobat

Dateierstellung/Betrachtung



## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Die Arbeit mit eukaryotischen Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen, um die Gefahr von Kontaminationen zu verringern. Die MDCK II Zellen wurden im MEM-Medium und die 293T-, A549-, NIH 3T3- sowie CEF Zellen wurden in DMEM Medium kultiviert. Die Zusammensetzung und Zusätze der einzelnen Medien wird im Abschnitt 2.1.4 „Zellkulturmedien, Zusätze und Material“ beschrieben. Alle Zellkulturmedien und Zusätze wurden vor Gebrauch auf 37 °C erwärmt. Die Zellen wurden bei 37 °C im Brutschrank (5% CO<sub>2</sub>-Begasung) kultiviert. Es wurde mit folgenden Zellkulturgefäßen gearbeitet:

- T75 Flasche 1 x 10<sup>7</sup> Zellen 10 ml Medium
- 35 mm Schale 1 x 10<sup>6</sup> Zellen 1,5 ml Medium
- 6 Kalotten-Platte 1 x 10<sup>6</sup> Zellen / Kalotte 1,5 ml Medium
- 12 Kalotten-Platte 5 x 10<sup>5</sup> Zellen / Kalotte 1,0 ml Medium
- 24 Kalotten-Platte 2,5 x 10<sup>5</sup> Zellen / Kalotte 0,5 ml Medium

### 2.2.2 Isolation von primären Hühnerembryo-Fibroblasten

Um Replikationsanalysen auf aviären Zellen durchzuführen, wurden primäre Hühnerembryo-Fibroblasten frisch präpariert. Hierzu wurde ein 11-Tage-alter Hühnerembryo aus dem Ei präpariert. Anschließend wurden sämtliche Extremitäten des Körpers entfernt und dieser mit einer Schere grob zerkleinert. Der Körper wurde nun in 10 ml Trypsin aufgenommen und für 10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der Überstand verworfen und durch weitere 10 ml Trypsin ersetzt. Der Ansatz wurde in einen Erlenmeyerkolben überführt und für 30 min bei RT mittels Magnetrührer langsam durchgerührt. Daraufhin wurde die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei RT stehen gelassen. Nach erneuter Überführung des Überstandes in ein neues Zentrifugenröhrchen wurde dieser moderat abzentrifugiert. Nun wurde der Überstand verworfen und das Sediment (Fibroblasten) in 10 ml DMEM mit 10% FKS aufgenommen und in eine T75 Flasche ausgesät. Nach 24 Std. wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt.

### 2.2.3 Passagieren von Zellen

Sofern die Zellen zu einem konfluenten Zellrasen zusammengewachsen waren, wurden sie umgesetzt („gesplittet“). Dazu wurden die Zellen zuerst mit PBS gewaschen.

Anschließend wurden die adhärenen Zellen mit 1 ml EDTA-Trypsin (für eine T75-Flasche) bei 37 °C im Brutschrank vom Flaschenboden abgelöst (1,5 ml EDTA-Trypsin für MDCK II Zellen). Die abgelösten Zellen wurden im gewünschten Verhältnis in neue Zellkulturflaschen/-schalen überführt. Alle Zelllinien wurden in T75 Zellkulturflaschen mit mindestens 10 ml Kulturmedium kultiviert.

### **2.2.4 Transfektion von Zellen**

Die Transfektion ist eine Methode, um Nukleinsäure (Plasmide) in eukaryotische Zellen einzubringen. In dieser Arbeit wurde LipofectAMINE™ 2000 als Transfektionsagens eingesetzt. LipofectAMINE™ 2000 ist ein Gemisch kationischer Lipide und bildet im Medium (Opti-MEM) Mizellen aus, die die Plasmide einschließen. So kann die Nukleinsäure durch die lipophile Zellmembran in das Zellinnere transportiert werden.

Die zu transfizierenden Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in einem Verhältnis von 1:2 umgesetzt, damit sie sich in einer aktiven Wachstumsphase befanden. Die folgenden Angaben beziehen sich auf die Transfektion von  $1 \times 10^6$  Zellen. Pro 1 µg Plasmid wurden 1,5 µl LipofectAMINE™2000 mit 125 µl OptiMEM versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde in 25 µl OptiMEM aufgenommen und mit dem LipofectAMINE™2000-Mix nach Ablauf der Inkubationszeit vereinigt, gemischt und 20 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin abgelöst. Im Anschluss wurden die Zellen in Transfektionsmedium aufgenommen und bei 800 rpm für 3 min pelletiert. Die Zellen wurden in 10 ml Transfektionsmedium resuspendiert und in gewünschter Dichte (~ 70 %) ausgesät. Der LipofectAMINE™2000-DNA-Mix wurde zur ausgesäten Zellsuspension hinzu pipettiert und leicht geschwenkt. Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank 5-6 Stunden bei 37°C inkubiert, bevor das Transfektionsmedium gegen Infektionsmedium oder Kulturmedium ausgetauscht wurde. Die Transfektion von 293T Zellen zur Erstellung rekombinanter Viren wird im Abschnitt 2.4.14 beschrieben.

### **2.2.5 Infektion von Zellen**

Einen Tag vor der Infektion wurden die Zellen so ausgesät, dass sie am nächsten Tag zu ca. 80 % konfluent waren. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit der gewünschten Virusverdünnung bzw. Virus-MOI (*multiplicity of infection*) infiziert. Die MOI gibt an, wie viele Viruspartikel pro Zelle für die Infektion eingesetzt wurden. Dazu wurde die Zellzahl/ml durch den Virusstocktiter PFU/ml (*plaque forming units*) dividiert und mit der gewünschten MOI multipliziert.

Bsp.:  $MOI\ 2 \frac{\text{Zellzahl/ml im Kulturgefäß} \times 2}{\text{PFU/ml}} = \text{Volumen Virusstammlösung}$

Das berechnete Volumen der Viruslösung wurde entsprechend in PBS/0,2 % BSA verdünnt und auf den Zellrasen pipettiert, sodass der Zellrasen mit Flüssigkeit bedeckt war. Der Ansatz inkubierte 45 min bei RT und die Zellen wurden alle 15 min geschwenkt, um ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden. Anschließend wurden sie zweimal mit PBS gewaschen und mit der entsprechenden Menge Infektions-MEM oder -DMEM überschichtet. Für die multizyklische Infektion von Zellen mit Influenza Viren der Subtypen H1N1 und H3N2 wurden dem Medium 1 µg/ml TPCK-Trypsin zugesetzt, um das HA-Protein der neu gebildeten Viren zu spalten und somit einen neuen Infektionszyklus zu ermöglichen. Diese Zugabe ist für Influenza Viren des Subtyps H5N1 aufgrund der multibasischen Spaltstelle im HA Protein nicht erforderlich. Die Zellen inkubierten entsprechend der Versuchsanordnung bei 37°C im Brutschrank.

### 2.3 Arbeiten mit dem Influenza A Virus

#### 2.3.1 Virus-Anzucht im embryonierten Hühnerei

Influenza A Viren lassen sich im Allgemeinen sehr gut in der Allantoishöhle/-flüssigkeit (embryonale Harnblase) von 11-Tage-alten Hühnerembryonen vermehren. Influenza Viren, die in ihren Interferon-antagonistischen Eigenschaften eingeschränkt sind, replizieren dagegen besser in 6-Tage-alten Bruteiern, da deren Typ I IFN-System noch nicht vollständig ausgereift ist und somit die Virusreplikation begünstigt wird.

Die Eier wurden desinfiziert, durchleuchtet und nur die befruchteten Eier für die Infektion ausgewählt. Bei 6-Tage-alten Hühnereiern wurde die Lage der Allantoishöhle des Embryos mit Hilfe von Durchlicht markiert und an dieser Stelle wurde eine kleine Öffnung gebohrt. In 11-Tage-alten Bruteiern wurde eine kleine Öffnung am stumpfen Ende über der Luftblase gebohrt. In diese Öffnung wurden senkrecht mit einer Kanüle 100 µl einer 1000 PFU enthaltenden Viruslösung injiziert, die dann mit Ponal-Klebstoff verschlossen wurde. Die mit Influenza A Virus der Subtypen H1N1 und H3N2 infizierten Hühnereier inkubierten ca. 48 Std. bei 37 °C und 80 % Luftfeuchtigkeit. Influenza A Viren des Subtyps H5N1 hingegen inkubierten nur für maximal 36 Std., da es sonst zur Lyse des Embryos kommt und somit der Virusstock nicht verwendet werden kann. Danach wurden die Eier mindestens 6 Std. bei 4 °C gekühlt, damit sich die Blutgefäße des Hühnerembryos zusammenzogen, um das blutfreie Abnehmen der Allantoisflüssigkeit zu erleichtern. Die Eischale wurde im Bereich der Luftblase vorsichtig aufgeschnitten und die Eihaut wurde

ebenso vorsichtig mit einer Pinzette entfernt. Bei 11-Tage-alten Eiern wurde die Allantoisflüssigkeit mit einer Pipette abgenommen, wobei der Dottersack mit einem Spatel vor Verletzung geschützt wurde. Bei 6-Tage-alten Eiern wurde die Allantoisflüssigkeit mit einer Kanüle vorsichtig abgenommen, da hierbei viel weniger Flüssigkeit geerntet werden konnte. Die Allantoisflüssigkeit wurde bei 1000 g und 4 °C für 3-5 min zentrifugiert, um grobe Partikel und mögliche Blutreste zu entfernen. Der Überstand enthielt die Viruspartikel. Der im Folgenden durchgeführte HA-Test gab eine erste Einschätzung auf die in der Allantoisflüssigkeit vorliegende Viruskonzentration (Abschnitt 2.3.2). Die Viruslösung wurde aliquotiert, der Virustiter mittels Avicel-Plaque-Test bestimmt (Abschnitt 2.3.3) und die Stocks bei -80 °C gelagert.

### **2.3.2 Hämagglutinationstest (HA-Test)**

Der HA-Test ist eine Methode, um eine grobe Abschätzung der Viruskonzentration von Influenza Viren zu bekommen. Das virale Oberflächenprotein Hämagglutinin (HA) bindet endständige Neuraminsäuren von Hühnererythrozyten, wodurch diese quervernetzt werden (Hirst 1941). Im HA-Test kann somit über den Vernetzungsgrad der Hühnererythrozyten eine erste Aussage über die Viruskonzentration gemacht werden. Mit diesem Test kann jedoch nicht zwischen infektiösen und nicht-infektiösen Partikeln unterschieden werden, da auch Membrantrümmer und di-Partikel (*defective interfering particles*, nicht replikationsfähige Virionen) mit HA agglutinieren.

In eine 96-Kalotten-Platte mit V-förmigem Boden wurde in die erste Vertiefung der Reihe 100 µl Viruslösung vorgelegt und ab der zweiten Vertiefung 50 µl PBS. Zur Herstellung einer Verdünnungsreihe wurden 50 µl der Viruslösung von links nach rechts in jede Vertiefung pipettiert und gemischt, wobei 50 µl aus der letzten Vertiefung verworfen wurden. Daraufhin wurde in jede Vertiefung 50 µl 1 %iges Hühnerblut pipettiert und gut vermischt. Der Ansatz inkubierte mindestens 30 min bei 4 °C, um die Neuraminidaseaktivität zu hemmen. Bis zu einer bestimmten Verdünnung sind genug Viren vorhanden, um die Erythrozyten zu vernetzen. Bei höheren Verdünnungen hingegen können die Erythrozyten nicht mehr vernetzt werden, so dass sie absinken und in der Spitze der Vertiefung als Knöpfchen sichtbar werden. Als Hämagglutinationstiter (HA-Titer) wird der reziproke Wert der Verdünnungsstufe angegeben, bei der gerade noch eine Hämagglutination beobachtet wird. Jedoch müssen mindestens  $1 \times 10^6$  PFU/ml vorhanden sein, damit ein HA von 1 sichtbar ist.

### 2.3.3 Virustiterbestimmung mit dem Avicel-Plaque-Test

Der Avicel Plaque-Test ist eine genauere Methode zur Bestimmung der Konzentration von Influenza A Viruspartikeln. Der hierbei bestimmte Titer ist mit der Einheit „Plaque bildende Einheit“ („*plaque forming unit*“ (PFU)) angegeben, da der Nachweis infektiöser Partikel über Löcher (Plaques) im Zellrasen erfolgt, die durch die Lyse der infizierten Zellen entstehen. Für den Test wurden in einer 12 Kalotten-Platte MDCKII Zellen ausgesät. Am nächsten Tag wurden die zu 80% konfluenten Zellen mit der zu untersuchenden Viruslösung infiziert. Dafür wurden Virusverdünnungen von z. B.  $10^{-1}$  bis  $10^{-6}$  in PBS/0,2 % BA hergestellt und je 100 µl der Verdünnung pro Kalotte als Inokulum verwendet. Während der Inkubationszeit von 45 min wurde die Platte alle 10 min geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung der Viruspartikel über die Kalotte zu erreichen. Danach wurde die Viruslösung abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen pro Kalotte mit 800 µl Avicel Overlay Medium überschichtet, das die Virusdiffusion in Lösung verhindert, und für 48 Std. bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Overlay Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, um das Medium vollständig zu entfernen. Im Anschluss wurden die Zellen mit 500 µl 3 % Formaldehyd für 15 min bei RT fixiert und abschließend für 10 min bei RT mit 0,1% Kristallviolett gefärbt. Nachdem das Kristallviolett mit H<sub>2</sub>O abgewaschen wurde, konnten die Plaques gezählt und der Virustiter über Berechnung der entsprechenden Verdünnungsstufe in PFU / ml bestimmt werden.

### 2.3.4 Isolierung und Analyse viraler RNA

Um die Identität der rekombinanten Viren bestimmen zu können, wurde die virale RNA aus dem Virusstock mit dem QIAamp<sup>®</sup> MinElute<sup>®</sup> Virus Spin Kit von QIAGEN nach Herstellerangaben isoliert. 100 µl der Allantoisflüssigkeit wurde mit 100 µl PBS verdünnt. Abschließend wurde die RNA mit 20 µl RNase-freiem ddH<sub>2</sub>O aus der QIAamp MinElute-Säule eluiert.

Im Folgenden wurde die RNA mittels reverser Transkriptions-PCR (RT-PCR) in cDNA umgeschrieben (Abschnitt 2.4.1) und die cDNA des NS-Segmentes in einer PCR amplifiziert (Abschnitt 2.4.2). Daraufhin wurde der PCR-Ansatz in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt (Abschnitt 2.4.4) und das Amplifikat ausgeschnitten. Mit dem Invisorb Spin DNA Extraction Kit wurde das DNA-Fragment aus dem Gel extrahiert (Abschnitt 2.4.5). Im analytischen Agarosegel wurde die Menge des PCR-Produktes auf den verwendeten DNA-Marker abgeschätzt, um 20 ng cDNA zu sequenzieren (Abschnitt 2.4.13).

## 2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.4.1 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription (RT) wird RNA in eine einzelsträngige (ss) DNA umgeschrieben, welches in einer anschließenden PCR zu doppelsträngiger (ds) DNA komplementiert und amplifiziert werden kann. Diese sogenannte RT-PCR erfolgte in dieser Arbeit in zwei Reaktionsansätzen (TwoStep RT-PCR). Bei der Reversen Transkription bindet ein Oligonukleotid Sequenz-spezifisch an das 3'-Ende der RNA. Die reverse Transkriptase fügt an das 3'-Ende des Oligonukleotids komplementär zur RNA Desoxyribonukleotide (dNTPs) an, so dass die RNA in ssDNA umgeschrieben wird (*copy-DNA*; cDNA). Diese wird dann nach Bindung eines Rückprimers an das 3'-Ende der ssDNA in einer PCR komplementiert (Abschnitt 2.4.2). Für den Nachweis der viralen NS-Segmente rekombinanter Influenza A VN/1203-Viren wurde die vRNA in einer RT-PCR zunächst mit den Influenza A spezifischen Primern Uni12a und Uni12g (Abschnitt 2.1.7) in cDNA umgeschrieben und anschließend mit den NS-Segment-spezifischen Primern BD NS #1 und #2 amplifiziert (Abschnitt 2.4.2).

#### cDNA-Synthese:

4 µl isolierte Virus-RNA  
+ 0,2 µl Uni12a (100 µM)  
+ 0,2 µl Uni12g (100 µM)  
+ 6,6 µl RNase-freies H<sub>2</sub>O

5 min bei 70 °C, dann auf Eis

+ 4 µl 5 x Reaction Buffer M-MuLVR  
+ 2 µl dNTPs (10 mM)  
+ 0,5 µl RNasin (40 U/µl)  
+ 1,5 µl RNase-freies H<sub>2</sub>O

5 min bei 37 °C, dann auf Eis

+ 1 µl M-MuLVR Reverse Transkriptase (200 U/µl)

1 h bei 42 °C; 10 min bei 70 °C ; 4 °C ∞ oder Lagerung bei -20 °C

### 2.4.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ermöglicht es spezifisch DNA Abschnitte zu amplifizieren. Hierzu werden zwei DNA-Oligonukleotide (Primer) und eine hitzebeständige DNA-Polymerase verwendet. Die Primer hybridisieren aufgrund ihrer Sequenz an jeweils einen Strang des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes. Durch aufeinander folgende Zyklen von Denaturierung, Anlagerung von Hin- (*forward*) bzw. Rück- (*reverse*) Primern (*Annealing*) und Kettenverlängerung (Elongation) werden DNA-Abschnitte exponentiell amplifiziert. Die PCRs wurden mit dem Expand High Fidelity PCR System von Roche durchgeführt. Dieses System beinhaltet einen Polymerase-Mix aus *Taq* DNA-Polymerase und *Tgo* DNA-Polymerase. Die PCR wurde verwendet, um das NS Segment von der zuvor erstellten cDNA zu amplifizieren und diese im Anschluss zu sequenzieren.

#### PCR: 50 µl-Ansatz

	1,50 µl Template-DNA
+	1,00 µl BD NS1 1# Primer <i>forward</i> (20 µM)
+	1,00 µl BD NS1 2# Primer <i>reverse</i> (20 µM)
+	0,50 µl dNTPs (je 10 mM)
+	10,00 µl Puffer Expand Puffer 1,5 mM MgCl <sub>2</sub>
+	35,25 µl ddH <sub>2</sub> O
+	0,75 µl –Expand-Polymerase

#### PCR-Programm:

Denaturierung	95 °C	5 min	
<hr/>			
Denaturierung	95 °C	1 min	
Primeranlagerung	52 °C	30 sec	30-35 Zyklen
Kettenverlängerung	72 °C	1 min pro 1000 bp	
<hr/>			
Kettenverlängerung	72 °C	2 min	
Kühlen	4 °C	∞	

Die Elongationszeit richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments.



### **2.4.3 Reinigung und Aufkonzentrieren von PCR-Fragmenten**

PCR-Fragmente bzw. mit einem Restriktionsenzym geschnittene Vektoren wurden nach den Angaben des Herstellers mit dem QIAquick PCR purification Kit von QIAGEN gereinigt. Die DNA wurde in 20 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert.

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

Die Agarosegel-Elektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe. Es wurden 1 %-ige Agarosegele verwendet, als Puffer diente 1 x TBE-Puffer. Vor dem Gießen des Gels wurde Ethidiumbromid (0,3-0,5 µg/ml Endkonzentration) in die in Puffer aufgekochte Agarose pipettiert. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftrag im Verhältnis 1:6 mit 6 x DNA-Ladepuffer versetzt. Als Größenstandard wurden die DNA-Marker „Mass Ruler™ DNA-Ladder“ „low range“ und „high range“ benutzt. Die Gele liefen bei 90-110 V. Die DNA wurde anschließend auf einem Transilluminator über UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

### **2.4.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegel**

Um DNA-Fragmente distinkter Größe aus einem Gemisch von DNA-Fragmenten zu isolieren, wurden die Fragmente zunächst über Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt. Die entsprechende Bande wurde unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend mit dem QIAEXII Gel Extraction Kit von QIAGEN nach den Angaben des Herstellers isoliert und gereinigt. Die DNA wurde mit 20-50 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert.

### **2.4.6 Restriktionsverdau**

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die DNA an definierten Nukleotidsequenzen schneiden und abhängig vom Restriktionsmuster unterschiedliche Enden generieren. In dieser Arbeit wurden die in Abschnitt 2.1.9 aufgelisteten Restriktionsenzyme verwendet, um u. a. die Subklonierung verschiedener DNA-Fragmente aus dem „GENEART-Hausvektor“ in pHW2000 zu ermöglichen. Dazu wurden der Vektor und das gewünschte DNA-Fragment so geschnitten, dass an deren Termini komplementäre Nukleotidüberhänge erzeugt wurden, welche die Ligation ermöglichen. Die Restriktionsenzyme BsmBI und Esp3I besitzen gleiche Erkennungssequenzen und generieren homologe Enden. Ferner wurde der Restriktionsverdau mit DpnI verwendet, um parentale DNA Stränge bei der zielgerichteten Mutagenese von Plasmid-DNA zu verdauen (Abschnitt 2.4.9). Für die Reaktionen wurden im Allgemeinen 1-2 U Enzym sowie entsprechende Mengen eines 10 x Restriktionspuffer nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden 2-16 Std. bei 37°C inkubiert.

#### 2.4.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Besitzen das verdaute DNA-Fragment und der geschnittene Vektor komplementäre Nukleotidüberhänge, lassen sie sich miteinander ligieren. Dabei nutzt man die Fähigkeit der T4 Ligase, die 3'-OH-Gruppen und freien 5'-Phosphatgruppen durch Phosphodiesterbindungen kovalent zu verknüpfen. Für den Ansatz wurden Vektor und Insert im Verhältnis von 1:3 bis 1:5 eingesetzt. Die Inkubation erfolgte 2 Std. bei RT oder über Nacht bei 16°C.

<b>Ansatz:</b>	1 µl 10 x Puffer (mit ATP)
+	1 µl T4-Ligase
+	20-50 ng Vektor
+	x ng Insert
<hr/>	
	ad 20 µl ddH <sub>2</sub> O

#### 2.4.8 Konstruktion und Subklonierung der VN/1203-Gensegmente PB2, PB1, PA und NP in den Vektor pHW2000

Zur Etablierung eines revers-genetischen Systems für das VN/1203 Virus musste die virale RNA aller Gensegmente in cDNA umgeschrieben und in den pHW2000 Vektor kloniert werden. Die Plasmide pHW-VN/1203-HA, -NA, -M und -NS waren zu Beginn der Arbeit bereits vorhanden. Da für die Generierung der VN/1203 Segmente PB2, PB1, PA und NP jedoch keine ausreichenden Mengen vRNAs zur Verfügung standen, wurde die Synthese der kompletten cDNA dieser Segmente bei einem kommerziellen Hersteller (GENEART, Regensburg) in Auftrag gegeben. Dazu wurden zunächst die Sequenzen der entsprechenden Segmente von der NCBI Datenbank heruntergeladen (*Accession number*: PB1 EF467808; PB2 EF467805; PA AY818132 und NP AY818138). Mit Hilfe des Clone Manager 9 Programmes wurden die Sequenzinformationen der NCRs nach (Hoffmann *et al.* 2001) an die entsprechenden Segmente angefügt und mit Schnittstellen für eine Subklonierung in den pHW2000 Vektor versehen. Diese Sequenz, die die Schnittstellen, NCRs und Segmentinformationen enthält, wurde im Anschluss zur Synthese an GENEART übermittelt. Die Restriktionsenzyme BsmBI und BsaI variieren in ihrer Erkennungssequenz, generieren aber komplementäre Enden.

Im Folgenden sind die Sequenzen der NCRs sowie die verwendeten Restriktionsschnittstellen im 5' und 3' Bereich der für die Segmente kodierenden Sequenzen:

**3' Bereich: 5' → 3'**

**PB2-BsmBI** GGCGCGCCCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGTCAAATATATTCAATATG  
**PB1-BsmBI** GGCGCGCCCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGCAAACCATTTGAATG  
**PA-BsmBI** GGCGCGCCCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGTACTGATCCAAATG  
**NP-Bsal** GGCGCGCCGGTCTCAGGGAGCAAAGCAGGTTAGATAATCACTCACC  
GAGTGACATCAACATCATG

**5' Bereich: 5' → 3'**

**PB2-BsmBI** TAGTGTGCGAATTATTTAAAAACGACCTTGTTTCTACTAATACGAGACGTTAAT  
TAA  
**PB1-BsmBI** TAGTGAATTTAGCTTGTCTTCGTCAAAAATGCCTTGTTCTACTAATACGA  
GACGTTAATTAA  
**PA-BsmBI** TAGTTGTGGCAATGCTACTATTTGCTATCCATACTGTCCAAAAAAGTACCTTG  
TTTCTACTAATACGAGACGTTAATTAA  
**NP-Bsal** TAAAGAAAAATACCTTGTTTCTACTAATACGAGACCTTAATTAA

Erklärung der Markierungen: Schnittstelle für Endonuklease; **Influenza A -spezifische NCR**;  
**Segment-spezifische NCR**; *Start- bzw. Stopp-Codon*

Nach Erhalt der synthetisierten cDNA im „GENEART-Hausvektor“ wurde diese mittels Restriktionsverdau (BsmBI bzw. Esp3I oder Bsal) ausgeschnitten (Abschnitt 2.4.6) und mit dem zuvor mit BsmBI bzw. Esp3I verdauten pHW2000 Vektor ligiert. Von den Ligationsansätzen wurden anschließend 10 µl in 100 µl chemisch kompetente *E. coli* XL1 blue Bakterien transformiert und auf LB-Platten mit Ampicilin oder Kanamycin selektioniert (Abschnitt 2.4.10). Aus den Bakterienkolonien wurde durch Miniprep Plasmid-DNA isoliert (Abschnitt 2.4.11). Über anschließenden Restriktionsverdau mit PVUI (Abschnitt 2.4.6) wurden Klone identifiziert, die das gewünschte Influenza A/VN/1203 Virus Gensegment in den Vektor pHW2000 inseriert hatten. Die so hergestellten Präparationen der Plasmide pHW-VN/1203-PB1, pHW-VN/1203-PB2, pHW-VN/1203-PA, pHW-VN/1203-NP wurden anschließend sequenziert (Abschnitt 2.4.13), um die Nukleotidsequenz der viralen Gensegmente und die Übergänge zwischen Gensegment und Vektor zu überprüfen. Von diesen Plasmiden wurden über Maxiprep große DNA-Mengen aufgereinigt (Abschnitt 2.4.11). Die DNA-Konzentration wurde durch Spektralphotometrie ermittelt (Abschnitt 2.4.12) und auf 1 µg/µl eingestellt.

### 2.4.9 Gezielte Mutagenese von pHW-VN/1203-NS mittels QuikChange™

Mit dieser Methode lassen sich gezielte Mutationen (ein oder mehrere Nukleotidaustausche, Insertionen, Deletionen) in ein Plasmid einbringen. In dieser Arbeit wurde das QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene verwendet, um die diversen Punktmutationen in das Plasmid pHW-VN/1203-NS einzufügen. Die Primer wurden so entworfen, dass sie komplementär zu beiden Strängen der zu verändernden DNA sind, die gewünschte Mutation enthalten und ca. 15 Nukleotide zu beiden Seiten über die Mutationsstelle hinausreichen. Der CG-Gehalt der Primer sollte bei über 40% liegen. Die Schmelztemperatur  $T_m$  sollte größer oder gleich  $78^\circ\text{C}$  sein und berechnet sich nach folgender Formel:  $T_m = 81,5^\circ\text{C} + 0,41 (\%GC) - 675/N - \% \text{ mismatch}$  (N: Anzahl der Nukleotide; % mismatch: Anteil der ausgetauschten Nukleotide an N). Für den Entwurf der Mutagenese Primer wurde zudem das QuikChange® Primer Design Programm von STRATAGEN (<http://www.stratagene.com/sdmdesigner/default.aspx>) verwendet. Die hier benutzten Primerpaare sind in Abschnitt 2.1.7 aufgeführt. Mit den gegenläufigen Primerpaaren, die die Mutation enthielten, wurden mehrere PCR-Zyklen durchlaufen.

#### PCR-Ansatz:

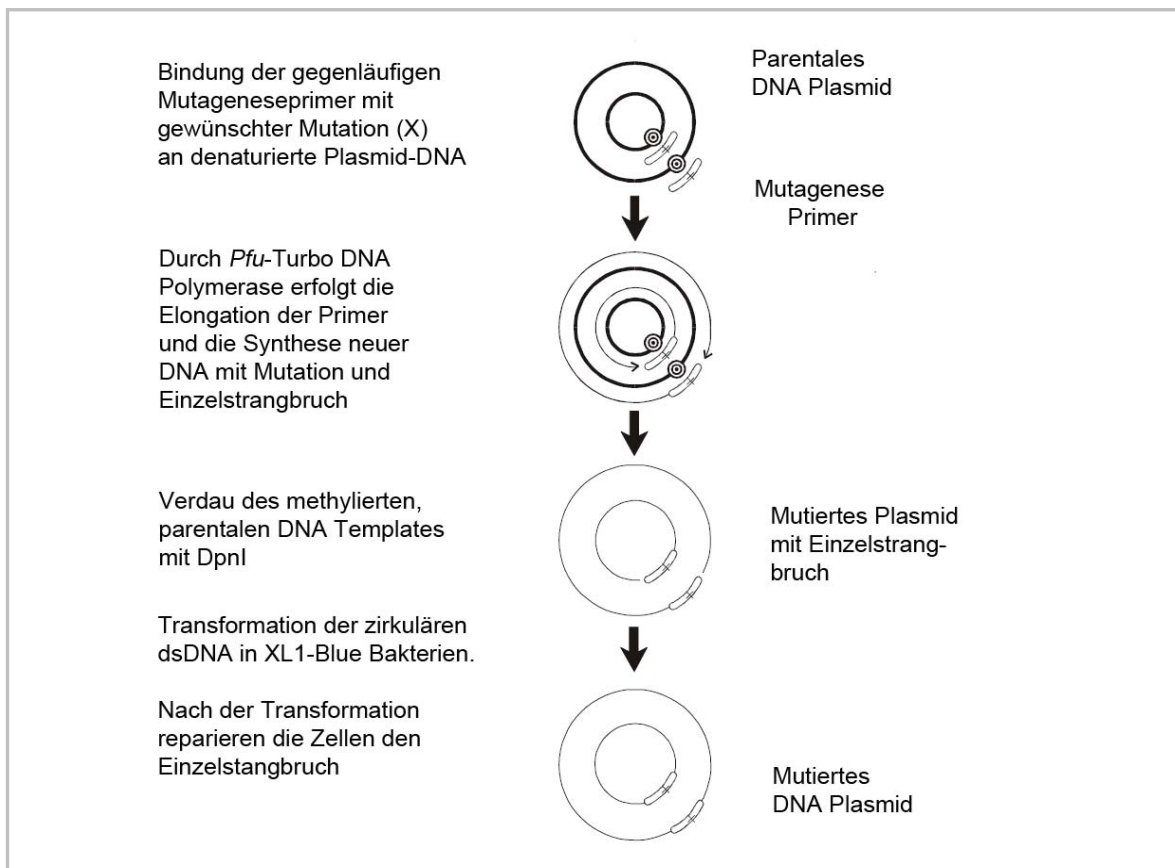
5  $\mu\text{l}$  of 10 x Reaktionspuffer  
 +X  $\mu\text{l}$  (5 ng) Plasmid DNA  
 +X  $\mu\text{l}$  (125 ng) Oligonukleotid-Primer #1  
 +X  $\mu\text{l}$  (125 ng) Oligonukleotid-Primer #2  
+1  $\mu\text{l}$  dNTP-Mix  
 Ad 50  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O  
 + 1  $\mu\text{l}$  *PfuTurbo* DNA Polymerase (2.5 U/ $\mu\text{l}$ )

#### Cycler-Programm:

Denaturierung	vor 1. Zyklus	$95^\circ\text{C}$	1 min	
Denaturierung		$95^\circ\text{C}$	30 s	
Primerbindung		$55^\circ\text{C}$	1 min	18 Zyklen
Kettenverlängerung		$68^\circ\text{C}$	8 min	
Kühlen	nach letztem Zyklus	$4^\circ\text{C}$	$\infty$	

Während der PCR lagerte sich je ein Primer an den Plasmid-Einzelstrang an und wurde durch die *Pfu Turbo* DNA-Polymerase verlängert. So entstanden Plasmidstränge, die die gewünschte Mutation trugen, aber nicht kovalent geschlossen waren (Einzelstrangbrüche). Die Plasmide, die noch parentale DNA enthielten, wurden über den

DpnI-Verdau entfernt. DpnI ist eine Endonuklease, die die Nukleotidsequenz 5'-G<sup>m6</sup>ATC-3' erkennt und somit spezifisch für methylierte und halbmethylierte DNA ist. Da nur die parentale Plasmid-DNA durch ihre Vermehrung in *E. coli* methyliert war, im Gegensatz zu der neusynthetisierten DNA, konnte erstere so spezifisch aus dem Ansatz entfernt werden. Der prinzipielle Ablauf der Mutagenese ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Über Transformation in *E. coli* XL1-blue wurden die Einzelstrangbrüche repariert und die Plasmide amplifiziert. Die Selektion erfolgte über die auf dem Plasmid kodierte Ampicillinresistenz. Nach der QuikChange PCR wurden 1 µl DpnI (10 U/µl) zugegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach dem Verdau sollten nur noch Plasmide vorliegen, die die eingeführte Mutation tragen. Mit diesen wurden dann die im Kit enthaltenen superkompetenten *E. coli* XL1-blue nach Angaben des Herstellers transformiert und auf LB-Platten mit Ampicillin über Nacht bei 37°C selektioniert.



**Abb.2.1: Schema der gezielten Mutagenese** (nach QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene, Heidelberg)

Die Plasmide der Kolonien wurden über Miniprep (Abschnitt 2.4.11) isoliert und im Anschluss sequenziert (Abschnitt 2.4.13). Über Maxiprep wurden größere Mengen der folgenden Plasmide präpariert (Abschnitt 2.4.11): pHW-A/VN/1203/04-NS-WT; pHW-

A/VN/1203-NS-ESEV; pHW-A/VN/1203-NS-RSKV; pHW-A/VN/1203-NS-R38AK41A; pHW-A/VN/1203-NS-D120A-Q121A; pHW-A/VN/1203-NS-I123A-M124A und pHW-A/VN/1203-NS-D125A-K126A

### **2.4.10 Transformation kompetenter *E. coli* durch Hitzeschock**

50 µl *E. coli* XL1-blue Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, mit der zu transformierenden Plasmid-DNA (20 – 200 ng) gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Hitzeschock für 45 sec bei 42°C und 2 min auf Eis wurden die Zellen mit 900 µl SOC-Medium vermischt und bei 37°C für ca. 60 min (Ampicillin-Resistenz) bzw. 120 min (Kanamycin-Resistenz) geschüttelt. Danach wurden unterschiedliche Mengen der Bakteriensuspension auf LB-Platten mit den jeweiligen Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **2.4.11 Plasmidpräparationen**

Zur Präparation von Plasmiden aus Bakterien wurde das Invisorb Spin Plasmid Mini Two Kit von Invitex für kleine Bakterienvolumen und das QIAfilter Plasmid Maxi Kit von QIAGEN für größere Bakterienvolumen benutzt.

#### **Miniprep**

Zunächst wurden Kolonien von der Platte in 3 ml 2xYT-Medium mit Ampicillin überführt und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Von den Übernachtskulturen wurde je 2 ml für 10 min bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert und das Bakterienpellet entsprechend den Anweisungen des Herstellers weiterbearbeitet. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der alkalischen Lyse der Bakterien, anschließender Neutralisation und Einstellung auf Hochsalz-Bindungsbedingungen. Die Plasmid-DNA wird dann spezifisch an die Silicagelmembran einer Säule gebunden und mit ethanolhaltigem Puffer gewaschen. Da bei Niedrigsalzbedingungen und pH 7,0 bis 8,5 die Membran DNA nicht mehr bindet, kann mit Wasser eluiert werden. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 50 µl ddH<sub>2</sub>O.

#### **Maxiprep**

Mit dieser Methode können größere Mengen Plasmid-DNA aufgereinigt werden. Die Bakterien werden durch alkalischen Puffer lysiert und dann neutralisiert. Nachdem das Präzipitat aus Bakterienhülle und Proteinen über eine QIAfilter-Patrone herausgefiltert worden ist, bindet die Plasmid-DNA unter Niedrigsalz-Bedingungen an die Anionentauschersäule. Verunreinigungen werden durch Waschen mit einem Puffer mittleren Salzgehalts entfernt. Mit einem Hochsalzpuffer wird die DNA eluiert und mit

Isopropanol gefällt um die DNA zu entsalzen. Nach einem weiteren Waschschrift mit 70%igem Ethanol kann die DNA in Wasser aufgenommen werden. Dazu wurden 100 µl der Miniprep Übernachtskultur in 200 ml 2xYT-Medium mit Ampicilin überführt und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Bakterienkulturen wurden mit dem QIAfilter Plasmid Maxi Kit entsprechend den Herstellerangaben weiter bearbeitet. Die Plasmid-DNA Pellets wurden in ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde durch Spektralphotometrie (Abschnitt 2.4.12) ermittelt und auf 1 µg/µl eingestellt.

### 2.4.12 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

In Wasser gelöste DNA und RNA hat bei 260 nm ein Absorptionsmaximum. Dies nutzt man, um durch spektralphotometrische Analysen mit Präzisions-Küvetten aus Quarzglas (Schichtdicke 10mm) die Konzentration zu bestimmen.

$$\text{Optische Dichte(OD)} = \text{Absorption (A}_{260}) = \frac{\text{Transmission}_{\text{Probe}}}{\text{Transmission}_{\text{Lösungsmittel}}}$$

#### DNA-Konzentrationsbestimmung

Die zu messende DNA-Probe wurde mit sterilem ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Über den Absorptionswert (A<sub>260</sub>) wurde die Konzentration mit folgender Formel berechnet:

$$1 \text{ OD} = 50 \text{ µg/ml}$$

$$\text{DNA-Konzentration [µg/µl]} = A_{260} \times 50 \text{ µg/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}/1000$$

### 2.4.13 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Für die Sequenzierung von DNA wurde das ABI BigDye<sup>®</sup> Terminator 3.1 Kit benutzt. Das Prinzip beruht auf der Kettenabbruch-Methode nach Sanger (Sanger *et al.* 1977). Dabei wird eine lineare PCR durchgeführt, in deren Ansatz neben den vier Desoxyribonukleotiden (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) auch fluoreszenzmarkierte Didesoxyribonukleotide (ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP) vorliegen. Wird bei der Kettenverlängerung ein Didesoxyribonukleotid eingebaut, kommt es, aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxyl-gruppe am ddNTP zum Kettenabbruch. Der Einbau der Didesoxyribonukleotide ist zufällig. Daher liegen nach entsprechender Zyklenanzahl Abbruchfragmente jeder möglichen Nukleotidzahl vor, welche über ein denaturierendes Polyacrylamidgel ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Da die vier Didesoxyribonukleotide mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, kann



während der Elektrophorese ermittelt werden, welches Didesoxyribonukleotid sich an der Abbruchstelle befindet. Durch eine spezielle Software wird das so entstandene Fluoreszenzmuster zur Nukleotidsequenz verarbeitet.

Die in der Sequenzierung eingesetzte DNA-Menge richtete sich nach der Länge des DNA-Fragmentes:

- 1-3 ng (Fragmentgröße 100-200 bp)
- 3-10 ng (Fragmentgröße 200-500 bp)
- 10-20 ng (Fragmentgröße 500-1000 bp)
- 150-300 ng (Plasmid-DNA)

### Sequenzieransatz:

X µl DNA-Template  
+ 0,5 µl Primer (20 µM)  
+ 1,0 µl BigDye 3.1  

---

ad 10 µl ddH<sub>2</sub>O

### Cycler-Programm :

Denaturierung	95°C	1 min	
---------------	------	-------	--

---

Denaturierung	95°C	10 s	
Annealing	55°C	5 s	25 Zyklen
Elongation	60°C	4 min	

---

Pause 4°C ∞

### 2.4.14 Herstellung rekombinanter Viren mit dem revers-genetischen-acht Plasmid-System nach Hoffmann *et al.* (2000)

Zur Herstellung der rekombinanten Influenza A/VN/1203 Virusmutanten wurden je 0,5 µg der Plasmide pHW-VN/1203-PB1, pHW-VN/1203-PB2, pHW-VN/1203-PA, pHW-VN/1203-NP, pHW-VN/1203-HA, pHW-VN/1203-NA, pHW-VN/1203-M und die entsprechenden pHW-VN/1203-NS Segmente -WT, -ESEV, -RSKV, -R38A-K41A, -D120A-Q121A, -I123A-M124A, -D125A-K126A mit 6 µl LipofectAMINE™ 2000 in 1 x 10<sup>6</sup> 293T Zellen transfiziert (Abschnitt 2.2.4). 6 Std. nach der Transfektion wurde das

Medium zu Infektions-D-MEM gewechselt und anschließend für 48 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die in den Überstand freigesetzten rekombinanten Influenza A Virusmutanten wurden in 11-Tage-alten Bruteiern für 36 Std. passagiert (Abschnitt 2.3.1). Alle Arbeiten mit rekombinanten VN/1203 Viren wurden entsprechend den Versuchsplanungen in einem BSL3 Labor durchgeführt.

## **2.5. Zellbiologische Methoden**

### **2.5.1 Analyse der Virusreplikation auf Zellkultur**

Um die verschiedenen rekombinanten VN/1203 Viren hinsichtlich ihrer Replikationsfähigkeit auf verschiedenen Zelllinien charakterisieren zu können, wurden diese wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben mit einer MOI von 0,001 infiziert. 12, 24, 36 und 48 Std. nach Infektion wurden 250 µl des Zellüberstandes entnommen und durch frisches Infektionsmedium ersetzt. Die so erhaltenen Proben wurden nach einmaligem Einfrieren bei -80 °C für den in Abschnitt 2.3.3 beschriebene Avicel-Plaque-Test verwendet, um den Virustiter in PFU / ml zu bestimmen.

### **2.5.2 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse**

Zur Detektion der intrazellulären Lokalisierung des viralen NS1-Proteins wurde in dieser Arbeit die indirekte Immunfluoreszenzanalyse angewandt. Hierbei bindet ein primärer Antikörper spezifisch an das NS1 Protein in der Zelle. Der sekundäre Antikörper erkennt und bindet speziesspezifisch den Fc-Teil des primären Antikörpers. Da der sekundäre Antikörper zusätzlich mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, kann dieser nach Anregung mit Licht spezifischer Wellenlänge in der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden. Die auf Deckgläschen in Kulturschalen ausgesäten und transfizierten bzw. infizierten Zellen wurden dafür zunächst mit 2,5 %-iger Formaldehydlösung in PBS für 15 min fixiert und anschließend mit 0,2 %-iger Triton-X-100-Lösung in PBS für 10 min permeabilisiert. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Der primäre Antikörper wurde in PBS / 3% BA verdünnt. 20 µl der Antikörperverdünnung wurden auf einem Stück Parafilm vorgelegt. Das Deckgläschen wurde mit der Zellbewachsenen Seite nach unten auf die Antikörperlösung gelegt und in einer feuchten Kammer 1 Std. bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Ebenso wurde mit dem sekundären Antikörper verfahren, aber nur 45 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und das Deckgläschen kurz in H<sub>2</sub>O getaucht. Auf einem Objektträger wurden 5 µl Mowiol-Lösung vorgelegt und das Deckgläschen mit der Zellseite nach unten darauf gelegt. Die Präparate wurden bei 4°C

im Dunkeln aufbewahrt. Die so markierten NS1-Proteine wurden mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht und charakterisiert. Die Verdünnungen der Antikörper sind unter 2.1.11 aufgeführt.

### **2.5.3 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)**

Für die Charakterisierung der intrazellulären Lokalisation der NS1-Proteine wurde in dieser Arbeit die konfokale Laser Scanning Mikroskopie verwendet. Dafür wurde das konfokale Laser Scanning Mikroskop LSM 510 Meta von Zeiss verwendet. Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie bietet die Möglichkeit, das von einer einzigen Ebene eines Präparats reflektierte bzw. emittierte Licht zu erfassen. Eine Lochblende (*Pinhole*) verhindert dabei die Detektion von Licht, welches nicht aus der Fokusebene stammt und somit werden außerfokale Objektinformationen ausgeblendet. Durch einen Laserstrahl mit entsprechend dem Fluoreszenzfarbstoff angepasster Anregungswellenlänge wird das Präparat pixel- und zeilenweise abgerastert. Die Pixeldaten werden von einem Detektor registriert und anschließend digital zu einem Bild zusammengesetzt. Dieses Bild zeichnet sich durch einen hohen Kontrast und eine hohe Auflösung aus. Die Proben wurden entsprechend Abschnitt 2.5.2 vorbereitet. Für die in dieser Arbeit gezeigten Bilder wurde das Objektiv C-Apochromat 63/1.2 water objective lens von Zeiss benutzt und über die Software „Zeiss LSM Image Browser 3.5“ eine zusätzliche zweifache Vergrößerung des Bildausschnitts erreicht. Im Anschluss wurden die Daten der Software „Adobe Photoshop CS3 extended“ prozessiert.

### **2.5.4 Luziferase-Reporter-Gen-Test**

Um die Aktivierung des IFN- $\beta$  Promotors während einer viralen Infektion zu untersuchen, wurden Luziferase-Reporter-Gen-Versuche durchgeführt. In dem hier verwendeten Konstrukt p125-Luc steht das Leuchtkäfer-Luziferasegen unter der Kontrolle des IFN- $\beta$  Promotors. Die Aktivierung des Promotors führt zur Expression der Luziferase. Diese setzt in einer enzymatischen Reaktion das Substrat Luziferin um. Die dabei auftretende Lumineszenz wird über ein Luminometer detektiert und ist ein Maß für die Aktivität des Promotors. Ein Transfektionsansatz für  $5 \times 10^5$  Zellen enthielt 50 ng p125-Luc, 5 ng pRL-TK-Luc (*Renilla*) sowie 1  $\mu$ g von einem der folgenden Plasmide: pHW-A/VN/1203/04-NS-WT, pHW-A/VN/1203-NS-ESEV, pHW-A/VN/1203-NS-RSKV, pcDNA-A/PR8-NS1, pHW-A/VN/1203-R38A-K41A, A/VN/1203-D120A-Q121A, A/VN/1203-I123A-M124A, A/VN/1203-D125A-K126A oder pHW2000-Leervektor. Die Zellen wurden bei 37°C inkubiert. 24 Std. nach Transfektion wurden die Zellen mit A/PR/8 $\Delta$ NS1 Virus mit einer MOI von 1 infiziert. 8 Std. nach Infektion wurden die Zellen in 100  $\mu$ l Passive Lysis Puffer

(Dual-Luziferase Reporter Assay System) lysiert und 10 min bei 13.000 rpm und 4°C in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Aktivitäten der Leuchtkäfer-Luziferase und der *Renilla*-Luziferase wurden mit dem Dual-Luziferase Reporter Assay System und dem LB941 TriStar Multimode der Marke Berthold bestimmt. Über die Aktivität des konstitutiv aktiven TK Promotors wurde die IFN- $\beta$  Promotoraktivität normalisiert. Die Virus-vermittelte Aktivierung Leervektor-transfizierter Zellen wurde auf 100% gesetzt und mit der Aktivierung in A/PR/8/34-NS1 oder A/VN/1203-NS1 Protein exprimierenden Zellen verglichen.

### **2.5.5 ELISA („Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay“)**

Diese Methode erlaubt den Nachweis von Proteinen in Überständen von Zellen oder anderen Flüssigkeiten. Die Grundfläche einer 96-Kalotten-Mikrotiterplatte ist mit den Antikörpern gegen das nachzuweisende Protein beschichtet. Nach Bindung des Antigens wird ein zweiter Antikörper zugegeben, der ebenfalls das nachzuweisende Protein bindet und mit einem Enzym, wie zum Beispiel der Meerrettich-Peroxidase (HRP), kovalent verknüpft ist. Das Enzym setzt ein zugegebenes chromogenes Substrat um. Die Intensität der Farbreaktion wird photometrisch bei 450 nm bestimmt und ist ein Maß für die Konzentration des gebundenen Proteins. In dieser Arbeit wurde das ELISA Kit für humanes INF- $\beta$  verwendet um die Menge dieses Zytokin in den Überständen infizierter A549 Zellen zu quantifizieren.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden mit den verschiedenen rekombinanten Influenza VN/1203-Viren mit einer MOI von 0,01 oder zum Schein infiziert und 24 bzw. 48 Std. bei 37°C inkubiert. Das Medium (1 ml pro Schale) wurde abgenommen und der IFN- $\beta$  Gehalt wurde nach Angaben der Hersteller mit den ELISA Kits bestimmt.

## **2.6 Proteinanalytische Methoden**

### **2.6.1 Herstellung von Zelllysaten**

Um die Proteinexpression der verschiedenen rekombinanten VN/-1203-Viren mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Immunoblot nachzuweisen bzw. analysieren zu können, mussten zunächst Lysate der transfizierten bzw. infizierten Zellen hergestellt werden. Alle Arbeiten dazu wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt und nur eiskalte Puffer verwendet. Zunächst wurden die Zellen 2 x gründlich mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 15 min mit dem RIPA-Lysispuffer unter mehrmaligem Schwenken inkubiert. Die Zellen wurden mit dem Zellschaber abgekratzt und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, mehrmals invertiert und nochmals 15 min

inkubiert. Nach Zentrifugation bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und gleich weiter verarbeitet oder nach Zugaben von SDS-Probenpuffer bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.6.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine können durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Denaturierung und Ladungsausgleich (durch  $\beta$ -Mercaptoethanol und SDS) aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichts aufgetrennt werden.

**Tab. 2.3: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Polyacrylamidgele.**

Bestandteile	Trenngel	Sammelgel
	12,5 %	5 %
30 % Acrylamid/Bis (29:1)	4,1 ml	0,83 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml	
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)		1,25 ml
H <sub>2</sub> O	3,2 ml	2,8 ml
10 % SDS	100 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$
10 % APS	100 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$
TEMED	6 $\mu\text{l}$	6 $\mu\text{l}$

Zunächst wurden die Glasplatten mit Ethanol gereinigt und dann in das BioRAD Mini-Protean-3 System eingesetzt. Die verwendeten Glasplatten hatten einen Abstand von 75 mm, was somit auch der Geldicke entsprach. Das Trenngel-Gemisch wurde entsprechend der Angaben in Tabelle 2.2 angesetzt und ungefähr zu  $\frac{3}{4}$  in die Vorrichtung gegossen. Das noch flüssige Trenngel wurde mit 0,2 % SDS-Lösung aufgefüllt, damit das Gel gleichmäßig polymerisierte. Sobald das Acrylamid polymerisiert war, wurde die SDS-Lösung abgekippt, das Sammelgel eingefüllt und der Kamm zum Freihalten der Taschen eingesteckt. Nach Polymerisation des Sammelgels wurde das Gel in eine Miniprotein-Gelkammer eingebaut, der 1x SDS-Elektrophoresepuffer wurde eingefüllt und der Kamm wurde gezogen. Die Proben wurden im Verhältnis 1:2 mit 2 x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei  $95^{\circ}\text{C}$  inkubiert, kurz abzentrifugiert und auf das Gel auftragen. Pro Gel wurde eine Stromstärke von 25 mA angelegt. Die Elektrophorese wurde gestoppt, nachdem die Frontmarkerbande (Bromphenolblau) aus dem Gel herausgelaufen war.

### 2.6.3 Immunoblot (Westernblot)

Nach der Auftrennung der Proteine durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden sie mit Hilfe des Semidry-Blotverfahrens (BioRad-Kammern) auf eine

Nitrozellulose-Membran transferiert. Hierzu wurde die Membran und die Whatman-Papiere in Semidry-Blotting Puffer äquilibriert. Danach wurde die Apparatur wie folgt aufgebaut: Anode, 3 x 3 mm Whatman-Papier, Nitrozellulose-Membran, Gel, 3 x 3 mm Whatman-Papier, Kathode. Die Proteine wurden für 55 min bei 75 mA pro Gel auf die Membran transferiert. Die Membranen wurden 1 Stunde in 3 % Magermilchpulver in 1x TBST blockiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1x TBST wurde die Membran mit dem primären Antikörper in 0,5% Magermilchpulver in 1x TBST für 1 Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C unter ständigem Schwenken inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde anschließend durch dreimaliges Waschen mit 1xTBST für je 10 min entfernt. Die Membran wurde daraufhin für 1 Stunde bei RT mit dem sekundären Spezies-spezifischen Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelten Antikörper in 0,5% Magermilchpulver in 1x TBST inkubiert. Die Verdünnungen der jeweiligen Antikörper sind in Abschnitt 2.1.11 angegeben. Überschüssiger Sekundär-Antikörper wurde durch mehrmaliges Waschen für je 5 min entfernt. Die Membran wurde mit dem SuperSignal WestDura Extended Duration Substrat 5 min inkubiert. Dabei wird durch die Oxidation des Substrats eine Chemilumineszenz ausgelöst. Diese Chemilumineszenz konnte durch die Schwärzung eines Röntgenfilms (Autoradiographie) nachgewiesen werden.

### **2.6.4 Fixieren und Trocknen von SDS- Polyacrylamid-Gelen**

Sollten die Proteine nicht über Immunoblotting detektiert werden, sondern direkt durch Autoradiographie, z.B. nach radioaktiver Markierung, mussten die Gele zuerst fixiert und getrocknet werden. Dafür wurde das Gel für 30 min in Fixierlösung geschwenkt um das SDS zu entfernen. Im Anschluss wurde das Gel 5 min in H<sub>2</sub>O gespült, auf zwei Lagen Whatman-Papier gelegt, mit Haushaltsfolie abgedeckt und auf dem Geltrockner Phero-Temp 40 nach Anlegen eines Vakuums bei 75°C für mindestens 45 min getrocknet.

### **2.6.5 Nachweis der Aktivierung von PKR**

Die Aktivierung von PKR in Influenza A Virus infizierten Zellen wurde über Immunoblotanalyse von Zelllysaten untersucht. Dafür wurden A549 Zellen mit einer MOI von 1 infiziert und 16 Std. p.i. entsprechend Abschnitt 2.6.1 lysiert. Die Lysate wurden über denaturierende SDS-PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt (Abschnitt 2.6.2) und geblottet (Abschnitt 2.6.3). PKR, Phospho-PKR, Aktin, virales NP und virales A/NS1 Protein wurden über die dafür spezifischen Antikörper (Abschnitt 2.1.11) detektiert. Als Sekundär-Antikörper wurde für Phospho-PKR der HRP-gekoppelte  $\alpha$ -Kaninchen Antikörper von Cell Signaling benutzt. Für PKR, Aktin, virales NP und virales NS1

wurden die entsprechenden Sekundär-Antikörper von DAKO verwendet (Abschnitt 2.1.11).

### **2.6.6 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen**

Das GST-PKR-(K296R)-Fusionsproteins war zu Beginn der Arbeit bereits in *E. coli* BL26 transformiert und als Glycerolstock vor. Daher musste es nur noch überexprimiert und aufgereinigt werden. Hierzu wurden 50 ml Übernachtskultur in 450 ml vorgewärmtes (33°C) LB-Amp-Medium gegeben und nach zweistündiger Inkubation bei 33°C wurde die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,5 mM) zur Kultur induziert. Die Kultur wurde weitere 4 h bei 33°C geschüttelt und anschließend 15 min bei 6000 x g und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml kaltem PBS aufgenommen, resuspendiert und dann in 5 ml Aliquots bis zum Zellaufschluss bei -20°C aufbewahrt.

Für den Zellaufschluss wurde ein 5 ml Aliquot Bakterienkultur auf Eis stehend im Ultraschall-Desintegrator (5 Pulse á 20 s, ca. 40 Watt) aufgeschlossen, mit Triton-X100 (Endkonzentration 1 %) versetzt und dann für 30 min bei 4°C sanft rotiert. Im Anschluss wurde das Ganze 15 min bei 10000 und 4°C zentrifugiert. Parallel dazu wurden 200 µl Glutathion-Sepharose in 10 ml PBS aufgenommen, zweimal gewaschen (3000 rpm für 3 min bei 4 °C) und erneut in 200 µl PBS aufgenommen. Der geklärte Überstand des Zellaufschlusses wurde im Folgenden mit den 200 µl der Glutathion-Sepharose Suspension (1:1 in PBS) für mindestens 1 Stunde bei 4°C sanft gedreht, um die GST-Fusionsproteine an die Glutathion-Sepharose zu koppeln. Anschließend wurde der Ansatz durch einen Zentrifugationsschritt (3000 rpm, 4 °C, 3 min) pelletiert und die Matrix dreimal mit 10 ml PBS (3000 rpm und 4 °C für 3 min) gewaschen. Der Ansatz wurde dann in 200µl PBS (1:1) bei 4°C resuspendiert. aufbewahrt. Die an der Sepharose-Matrix immobilisierten GST-Fusionsproteine konnten dann in entsprechenden GST-Kopräzipitationsversuchen eingesetzt werden

Um die Kopplung der GST-PKR-Fusionsproteine an die Glutathion-Sepharose zu überprüfen, wurden diese mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese untersucht. Dazu wurden 5 µl der mit dem Fusionsprotein gekoppelten Glutathion-Sepharose mit 5 µl 2 x SDS-Probenpuffer (PP) versetzt, 5 min bei 95 °C denaturiert und kurz zentrifugiert. Von dem Ansatz wurden 5 µl im Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Nach der Fixierung wurden die Proteine mit Hilfe der Coomassie-Färbelösung sichtbar gemacht. Zusätzlich zu dem GST-gekoppelten PKR-Fusionsprotein, wurde reines GST überexprimiert und an die Glutathion-Sepharose-Matrix gekoppelt. Dieser Ansatz diente als Negativkontrolle, um eine unspezifische Bindung der VN/1203-NS1 Proteine auszuschließen.



### 2.6.7 In vitro Translation

Die *in-vitro*-Translation (IVT) ermöglicht die zellfreie Transkription und Translation von klonierten Genen. Dabei können radioaktivmarkierte Proteine generiert werden, indem dem Reaktionsansatz eine radioaktiv-markierte Aminosäure zugefügt wird. Für die radioaktive Markierung der NS1-Protein-Varianten wurde das TNT<sup>®</sup> Coupled Reticulocyte Lysate Systems benutzt. Die Transkription erfolgte durch eine T7-Polymerase von den Plasmiden pHW-A/Vietnam/1203/04-NS-WT, pHW-A/VN/1203-NS-R38AK41A, pHW-A/VN/1203-NS-D120A-Q121A, pHW-A/VN/1203-NS-I123A-M124A und pHW-A/VN/1203-NS-D125A-K126A. Während der Translation wurde in die entsprechenden Peptidketten radioaktives [<sup>35</sup>S]-Methionin eingebaut.

#### Ansatz:

	25 µl Retikulozytenlysat
+	2 µl TNT Puffer
+	1 µl Aminosäuremix ohne Methionin
+	4 µl [ <sup>35</sup> S]-Methionin (10 µCi/ml)
+	1 µl TNT T7 Polymerase
+	1 µg Plasmid-DNA
<hr/>	
	ad 50 µl RNase-freies ddH <sub>2</sub> O

Das Retikulozytenlysat wurde vorgelegt und die DNA wurde erst kurz vor der Zugabe von [<sup>35</sup>S] Methionin hinzupipettiert. Die Ansätze inkubierten 90 min bei 30 °C und wurden danach für 10 min bei 13.000 rpm und RT zentrifugiert. Die Überstände lagerten in einem frischen Gefäß bei -20 °C.

### 2.6.8 GST-Kopräzipitation

Mit der GST-Kopräzipitation werden *in-vitro* Protein-Protein-Interaktionen untersucht. Dazu wurden 10 µl des an Glutathion-Sepharose gekoppelten PKR-(K296R) Fusionsproteins (2.6.6) mit 10 µl *in-vitro*-NS1-Translat (2.6.7) und 1 ml GST-Bindungspuffer versetzt und für mindestens zwei Std. bei 4 °C sanft drehend inkubiert. Danach wurden unspezifische Bindungspartner durch dreimaliges Waschen mit 1 ml GST-Bindungspuffer entfernt (3000 rpm für 3 min bei RT). Das Pellet wurde in 20 µl 2 x SDS-Probenpuffer aufgenommen, 5 min bei 95 °C denaturiert, kurz zentrifugiert. Von dem Ansatz wurden 10 µl in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Zusätzlich dazu wurde die Expression von *in-vitro* translatiertem A/NS1 untersucht. Dazu wurde 1 µl

A/NS1 IVT mit 19 µl 2 x SDS-Probenpuffer versetzt und wie der GST-Präzipitationsansatz weiterverarbeitet. Nach der Gelelektrophorese wurden die Gele mit Coomassie gefärbt und getrocknet. Radioaktiv markierte Proteine wurden im getrockneten Gel durch Exposition eines Röntgenfilms detektiert.

## 2.7 Tierexperimentelles Arbeiten

### 2.7.1 Mausversuche

Die für Tierexperimente in Berlin verantwortliche Behörde (Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo)) machte für die hier beschriebenen Maus-Experimente die Auflage, dass alle Mäuse, die mehr als 20% ihres ursprünglichen Körpergewichts verloren und / oder entsprechend schwere Krankheitssymptome aufwiesen, zu euthanasieren waren.

Die hier beschriebenen Mausexperimente fanden, entsprechend der Sicherheits-einstufung des verwendeten Erregers (VN/1203), im BSL3 Labor des Robert Koch-Institutes statt. Die Durchführung der Mausexperimente am lebenden Tier erfolgte in Zusammenarbeit mit der Tierärztin Dr. Ilia Semmler.

### 2.7.2 Infektion von BALB/c Mäusen mit Influenza Viren

7-Wochen-alte weibliche BALB/c Mäuse wurden eine Woche vor Infektion aus dem Tierstall in das Isocage System der Firma Tecniplast im L3 Labor überführt, damit diese sich an die neue Umgebung gewöhnen konnten und nicht unter zusätzlichem Stress standen. Das Isocage System erlaubt die kontaminationsfreie Haltung verschieden infizierter Mäuse, da jeder Käfig über einen eigenen HEPA Filter verfügt und die Ab- und Zuluft über ein weiteres Filtersystem gesondert geregelt ist (<http://germany.tecniplast.it/products.php?lineid=20&categoryid=19&familyid=3>). Für die Infektion wurden die Mäuse mit Isofluran betäubt und nasal mit 50 µl der entsprechenden Virusverdünnung in PBS infiziert. Die Betäubung der Tiere diente der gleichmäßigen und tiefen Einatmung der Virusverdünnung und dauerte in der Regel nur 1-2 min an. Die Tiere wurden täglich gewogen und von Frau Dr. Semmler mindestens 2 x täglich auf klinische Symptome untersucht. Hatten die Mäuse 20% ihres ursprünglichen Körpergewichtes verloren oder wiesen starke Krankheitssymptome auf, wurde sie durch eine Überdosis Isofluran und einen anschließenden Genickbruch euthanasiert.

### 2.7.3 Bestimmung der MLD<sub>50</sub>

Um eine erste Einschätzung über die Virulenz des rekombinanten VN/1203-WT Virus in Mäusen zu erhalten, wurde die Virusdosis bestimmt, die für 50% der Mäuse letal wäre (Maus letale Dosis 50 (MLD<sub>50</sub>)). Entsprechend den Vorgaben der LAGeSo wurden die Tiere jedoch bei Eintreten der in 2.7.2 genannten Kriterien vorher euthanasiert. Zur Bestimmung der MLD<sub>50</sub> wurden Gruppen von sechs 7-Wochen-alten BALB/c Mäusen mit unterschiedlichen Virusverdünnungen (1000, 100, 10 und 5 PFU) infiziert und ihr Körpergewicht sowie ihr „klinischer Score“ täglich erfasst. Zur vergleichenden Analyse der rekombinanten VN/1203-WT-, -ESEV-, -RSKV-Viren wurden Gruppen von sechs 7-Wochen-alten BALB/c Mäusen mit einer Dosis von 5 PFU infiziert.

### 2.7.4 Homogenisieren von Tierorganen

Um Unterschiede zwischen den rekombinanten VN/1203-WT-, -ESEV-, -RSKV-Viren in der Viruslast und der Verbreitung innerhalb von BALB/c Mäusen detektieren zu können, wurden Gruppen von je vier 7-Wochen-alten BALB/c Mäusen mit 5 PFU der entsprechenden Viren infiziert und 12 Std., 3 Tage und 6 Tage nach Infektion euthanasiert. Den Mäusen wurden die Lunge, das Gehirn, die Milz, die Leber, das Herz und die Nieren entnommen. Nach jeder Entnahme eines Organs wurde das Sezierbesteck mit Ethanol gereinigt, um mögliche Kontaminationen zu verhindern. Alle Organe wurden nach Entnahme bei -80 °C eingefroren. Um die Viren aus den entsprechenden Organen zu isolieren, wurden diese gewogen und im Verhältnis 0,1g / 1 ml in PBS aufgenommen. Nach Überführung in FastprepD-Tubes der Firma MP Bio, welche zu ¼ mit Keramik-Kügelchen gefüllt waren, wurden die Organe mittels Fastprep-24 Instrument mit 6m/s 60 sek. homogenisiert. Im Anschluss wurden die Röhrchen für 5 min bei 4000 rpm Zentrifugiert und der Überstand in neue 1,5 ml Eppendorftubes überführt. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 10000 rpm) wurde der geklärte Überstand zur Bestimmung der Viruskonzentration in den Avicel-Plaque-Test eingesetzt (2.3.3).

### 2.7.5 Histologische Untersuchung von infizierten Mauslungen

Die in dieser Arbeit dargestellten histologischen Analysen der Mauslungen wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Achim Gruber und Dr. Susanne Mauel vom Fachbereich Veterinärmedizin des Institutes für Tierpathologie der Freien Universität Berlin erstellt. Hierzu wurde im L3 Labor des Robert Koch-Institutes von den in 2.7.5 infizierten Mäusen pro Gruppe und Zeitpunkt ein Lungenflügel einer Maus entnommen und in Paraformaldehyd fixiert. Die Lungenflügel wurden für jeweils 24 Std. in 4% PFA, 2% PFA

und anschließend in 70% Ethanol inkubiert. Die so fixierten Proben wurden an Frau Dr. Mauel übergeben. Diese bettete die Proben in Parafin ein, führte Microtomschnitte durch und färbte diese mit Hematoxilin & Eosin. Zudem wurden die Lungenschnitte mit dem in 2.1.11 aufgeführten  $\alpha$  Influenza A Antikörper gefärbt um die Viren nachzuweisen.

### **2.7.6 Infektion von Hühnern (*Gallus gallus domesticus*) mit Influenza A Viren**

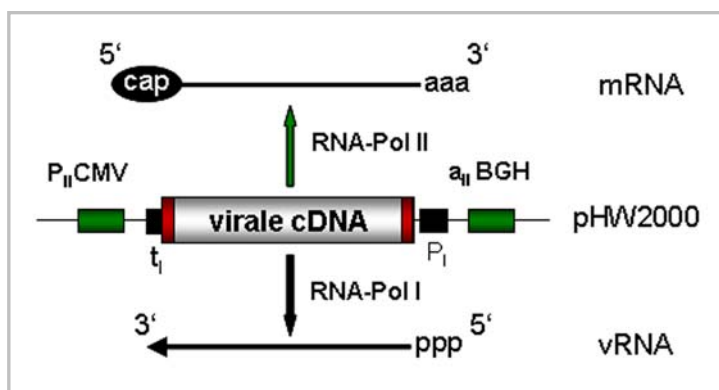
Die Infektionsversuche von Hühnern erfolgten in Zusammenarbeit mit PD. Dr. med. vet. Martin Beer und Dr. med. vet. Donata Kalthoff am Friedrich-Loeffler-Institut auf der Insel Riems. Für alle Versuche wurden von allen Tieren einmal täglich Rachen und Kloaken Tupfer genommen, um diese mittels *real time* RT-PCR (Hoffmann *et al.* 2007) auf virale RNA zu überprüfen. Für den Infektionsversuch über die oronasale Route wurden Gruppen von fünf 6-Wochen-alten Hühnern ohne Narkose mit  $1 \times 10^4$  PFU / Tier à 100  $\mu$ l infiziert. Für die Bestimmung des Intravenösen-Pathogenitätsindex erfolgte die Infektion von zehn 6-Wochen-alten Hühnern mit  $1 \times 10^4$  PFU / Tier in 100  $\mu$ l intravenös.

### 3. Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich thematisch in zwei Teile unterteilen. Der erste Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Charakterisierung des Einflusses des C-terminalen ESEV Motivs im NS1 Protein auf die virale Replikation *in vitro* und *in vivo* (Abschnitt 3.2), während im zweiten Teil die funktionelle und physikalische Interaktion des NS1 Proteins mit PKR untersucht wird (Abschnitt 3.3).

#### 3.1 Etablierung eines revers-genetischen Systems zur Erzeugung und Analyse rekombinanter H5N1 Influenza VN/1203 Viren

Um die verschiedenen Interaktionen des NS1 Proteins im Hintergrund eines Influenza Virus vom Subtyp H5N1 studieren zu können, wurde zunächst ein Plasmid-gestütztes System zur Generierung von rekombinanten Influenza VN/1203/04 Viren des Subtyps H5N1 etabliert. Dieses basiert auf einem für Influenza A Viren entwickelten 8-Plasmidsystem (Hoffmann et al., 2000). Die genetische Information der acht vRNA Segmente des Influenza VN/1203/04 Virus wurde dazu in Form kompletter cDNA-Kopien jeweils in den Vektor pHW2000 kloniert. Die cDNAs der Segmente HA, NA, M, und NS konnte durch RT-PCR aus vRNA generiert werden, während die cDNA der Segmente PB2, PB1, PA und NP anhand von Sequenzdaten aus der NCBI Influenza Virus Resource Database von einem kommerziellen Anbieter synthetisiert wurde (Accession number: PB1 EF467808; PB2 EF467805; PA AY818132; NP AY818138). Nachdem die virale cDNA in den pHW2000 Vektor kloniert ist, wird sie dort sowohl von einem humanen RNA-Polymerase I Promotor und einem murinen Terminator, als auch von einem RNA-Polymerase II Promotor und einem Polyadenylierungssignal flankiert. Dieser bidirektionale Vektor erlaubt daher nach Transfektion der acht Plasmide in humane Zellen die Transkription von negativ polarisierter viraler vRNA und positiv-strängiger mRNA (Abb. 3.1). Nach Translation aller 11 viralen Proteine assemblieren diese mit den vRNA Segmenten und neue Viren werden aus der Zelle freigesetzt (siehe auch Kap 1.17).

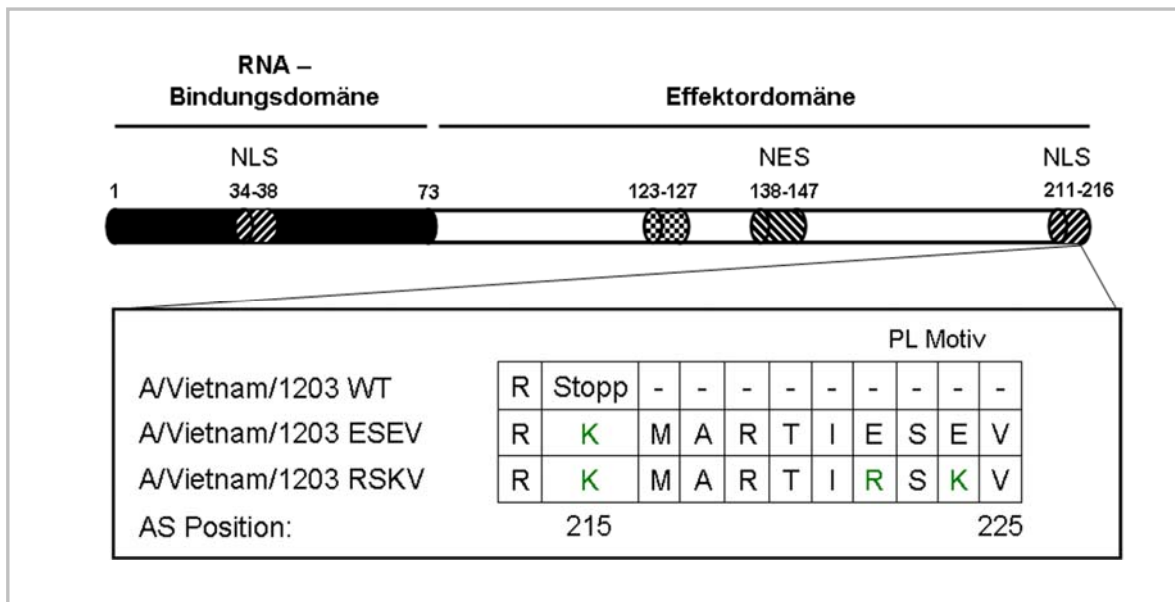


**Abb. 3.1: Organisation der Promotoren im Vektor pHW2000 des 8-Plasmidsystems.** RNA-Pol I: RNAPolymerase I; RNA-Pol II: RNAPolymerase II; P<sub>I</sub>: humaner RNA-Pol I Promotor; t<sub>i</sub>: muriner Terminator; P<sub>II</sub>CMV: Cytomegalievirus RNA-Pol II Promotor; a<sub>II</sub> BGH: Polyadenylierungssignal des bovinen Wachstumshormon (*bovine growth hormone*) Gens

## 3.2 Charakterisierung des Einflusses des C-terminalen ESEV Motivs im NS1 Protein auf die virale Replikation *in vivo* und *in vitro*

### 3.2.1 Mutagenese des pHW-NS Plasmids zur Generierung der NS1 Mutanten ESEV und RSKV

Das NS1 Protein von VN/1203 WT ist im Vergleich zu anderen Influenza A Viren (230 AS lang) c-terminal trunziert und daher nur 215 Aminosäuren (AS) lang. Neben der C-terminalen Verkürzung (Abb. 3.2) weist es, wie diverse H5N1 Isolate seit dem Jahr 2003, eine weitere Deletion der AS 80-84 auf. Um den Einfluss des C-terminalen PDZ Liganden (PL) Motivs im NS1 Protein auf die Replikation *in vitro* und *in vivo* untersuchen zu können, wurde in einem ersten Schritt das trunzierte NS1 rekonstituiert. Hierzu wurde im pHW-NS Plasmid mittels zielgerichteter Mutagenese das Stoppcodon an Aminosäureposition 215 zu Lysin substituiert, wodurch das NS1 Protein nun mit einer Länge von 225 AS „natürlich“ mit dem Motiv ESEV endet. Dieses neu geschaffene pHW-NS-ESEV Plasmid diente als Grundlage für eine weitere zielgerichtete Mutagenese, in der das „aviäre“ ESEV Motiv zum „humanen“ RSKV Motiv verändert wurde. Dies führt zwangsläufig zu einer Aminosäuresubstitution (S70G) im NS2 Protein des „RSKV“-Plasmids.



**Abb. 3.2: Schematische Darstellung des NS1 Proteins des A/Vietnam/1203/04 Influenza Virus.** Der C-Terminus des NS1 Proteins ist dargestellt. Der abgebildete Aminosäureabschnitt 214 bis 225 zeigt die Sequenz des trunzierten WT NS1 Proteins im Vergleich zu den mutierten NS1 Proteinen ESEV und RSKV. Der Aminosäureaustausch an Position 215 zu K, in grün dargestellt, bewirkt die Rekonstitution des C-Terminus, so dass das NS1 Protein natürlich auf die „aviäre“ AS Sequenz ESEV endet. Des Weiteren wurde das ESEV Motiv zum „humanen“ RSKV Motiv substituiert.

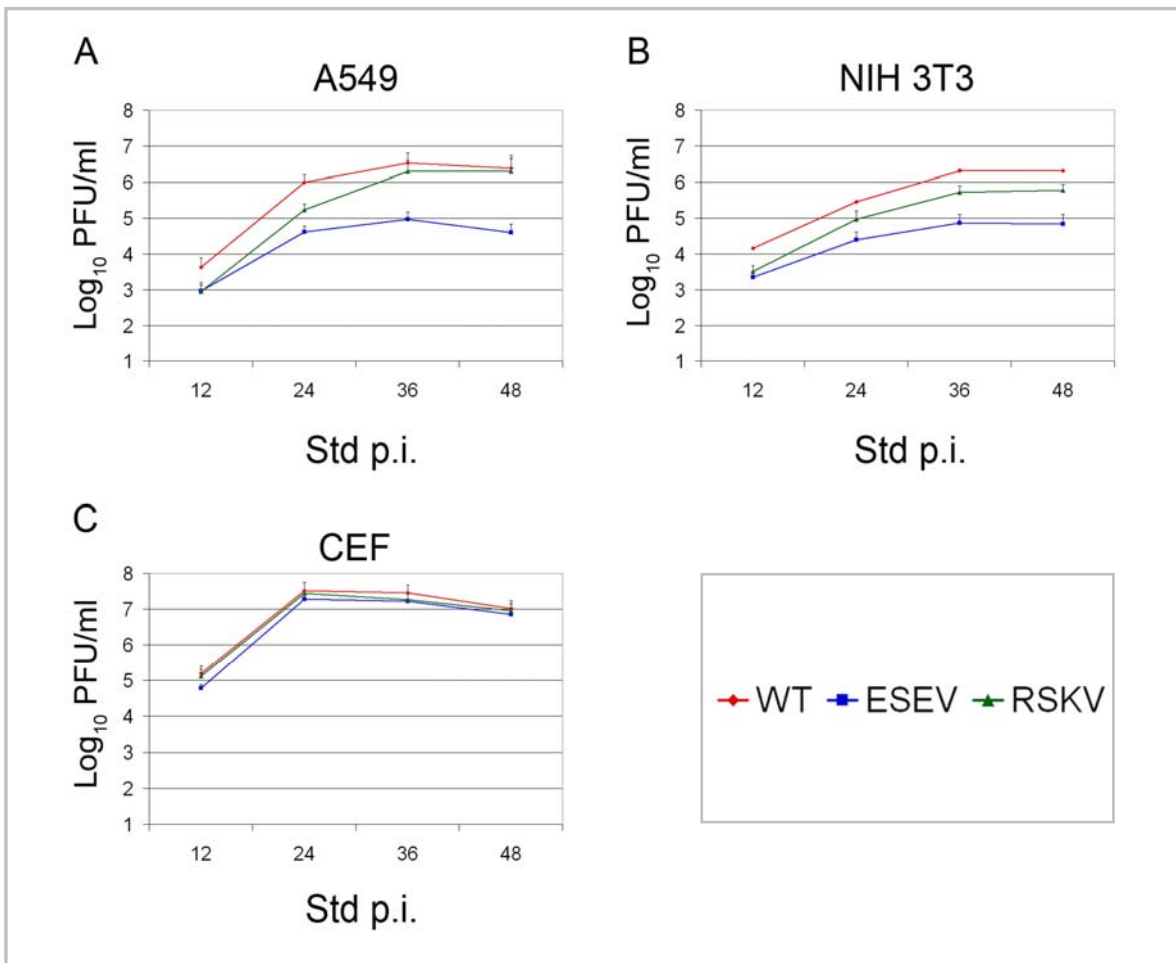
### **3.2.2 Erzeugung rekombinanter Influenza VN/1203 Viren**

Zur Generierung rekombinanter Influenza VN/1203 Viren, die sich nur in der C-terminalen Sequenz ihres NS1 Proteins unterscheiden, wurde das jeweilige pHW-VN/1203-NS Plasmid (pHW-VN/1203-NS-WT, pHW-VN/1203-NS-ESEV, pHW-VN/1203-NS-RSKV) zusammen mit den für das Influenza Genom kodierenden übrigen sieben Plasmiden (pHW-VN/1203-HA, pHW-VN/1203-NA, pHW-VN/1203-PB2, pHW-VN/1203-PB1, pHW-VN/1203-PA, pHW-VN/1203-NP, pHW-VN/1203-M) in humane 293T Zellen transfiziert. Die nach 48 Std. in den Überstand freigesetzten Viren wurden in 11-Tage-alten embryonierten Hühnereiern für jeweils 36 Std. passagiert. Die Virustiter in der Allantoisflüssigkeit wurden zunächst mittels Hämagglutinationstest (HA-Test) bestimmt. Im Anschluss wurden mittels Avicel-Plaques-Test die PFU/ml Konzentrationen bestimmt. Die so generierten rekombinanten Viren werden im Folgenden als WT-, ESEV- und RSKV-Virus bezeichnet.

### **3.2.3 Multizyklische Replikationsanalyse auf humanen, murinen und aviären Zellen**

Zunächst wurden die Replikationseigenschaften der rekombinanten WT-, ESEV- und RSKV-Viren in Zellkultur untersucht. Hierfür wurde die Vermehrung auf humanen A549 Epithelzellen, murinen NIH 3T3 Fibroblasten und primären Hühnerembryo-Fibroblasten untersucht. Alle Zellen wurden mit einer MOI von 0,001 infiziert, um eine multizyklische Replikation bis 48 Std. nach Infektion untersuchen zu können. Alle 12 Std nach Infektion wurden Aliquots vom Überstand entnommen und durch neues Infektionsmedium ersetzt. Die im Überstand enthaltenen Viren wurden mittels Avicell-Plaques-Test im Doppelansatz getitert. Die Analyse der Replikationskurven auf humanen A549 Zellen (Abb. 3.3A) zeigte, dass das ESEV-Virus im Vergleich zum WT-Virus um bis zu 1,5 Log Stufen schlechter replizierte. Betrachtet man die Vermehrung des RSKV-Virus, so zeigte sich eine Verzögerung der Virusvermehrung innerhalb der ersten 36 Std. im Vergleich zum WT-Virus. Ein ähnlicher Verlauf der Virusreplikation war auf murinen NIH 3T3 Fibroblasten (Abb. 3.3B) zu beobachten. Das WT-Virus replizierte zu ca. 1,5 Log Stufen höheren Virustitern als das ESEV-Virus, während das RSKV-Virus eine im Vergleich zum WT um eine halbe Log Stufe verminderte Replikation aufwies. Die Replikation aller Viren auf Hühnerembryo-Fibroblasten (Abb. 3.3C) war über die gesamten 48 Std. sehr ähnlich, so dass hier kein Einfluss des NS1 C-Terminus festgestellt werden konnte. Im Vergleich zu den humanen A549 Zellen und den murinen NIH 3T3 Fibroblasten replizierten die Viren auf den Hühnerembryo-Fibroblasten jedoch insgesamt schneller und zu höheren Titern.



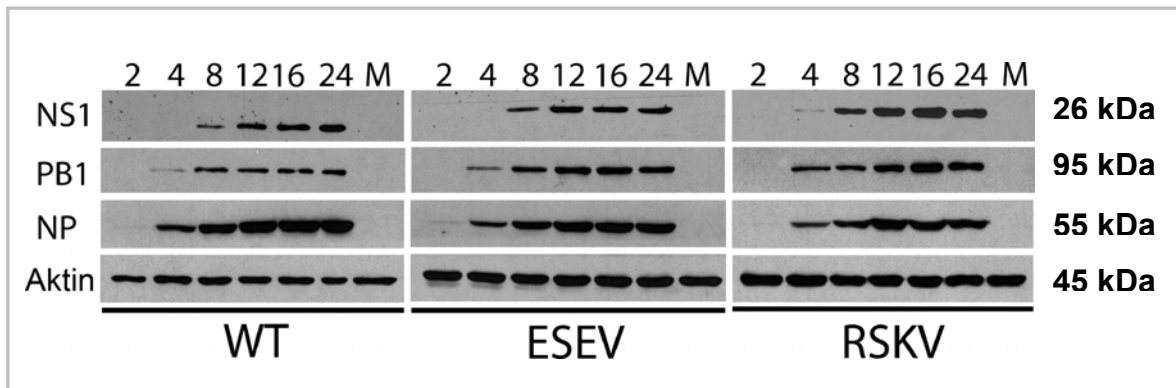


**Abb. 3.3: Multizyklische Replikationsanalyse in Zellkultur.** Humane A549 Epithelzellen (A), murine NIH 3T3 Fibroblasten (B) und Hühnerembryo-Fibroblasten (C) wurden mit einer MOI = 0,001 mit den rekombinanten VN/1203-WT-, -ESEV- oder -RSKV-Virus infiziert. Alle 12 Std. nach Infektion wurde Zellkulturüberstand entnommen. Der Titer der darin enthaltenen Viren wurde mittels Avicell-Plaue-Test auf MDCKII Zellen bestimmt. Abgebildet sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils einem biologischen Duplikat. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) an.

### 3.2.4 WT-, ESEV- und RSKV-Viren zeigen ähnliche Expression viraler Proteine *in vitro*

Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob die beobachteten Unterschiede in der multizyklischen Virusreplikation auf A549 Zellen durch eine veränderte virale Proteinexpression verursacht wurden. Derartige Veränderungen sollten besonders deutlich bei einer monozyklischen Replikation erkennbar sein. Daher wurden A549 Zellen mit einer MOI von 5 infiziert und nach 2, 4, 8, 12, 16 und 24 Stunden lysiert. Mittels Immunoblot wurden die viralen Proteine NS1, PB1 und NP sowie das zelluläre Protein Aktin als Ladekontrolle im Zelllysate mittels spezifischer Antikörper detektiert. Abbildung

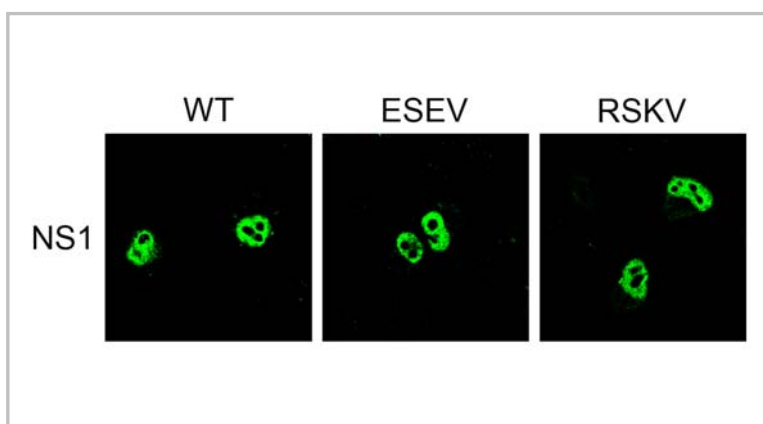
3.4 zeigt, dass sich mit Ausnahme einer schwächeren PB1 Bande bei WT-infizierten Zellen nach 4 Std. im Vergleich zu ESEV- und RSKV-Virus keine Unterschiede in der Proteinexpression erkennen ließen. Die unterschiedlichen Laufverhalten der NS1 Banden sind darauf zurück zu führen, dass das NS1 Protein der ESEV- und RSKV-Viren 10 AS länger sind als das NS1 Protein des WT-Virus.



**Abb. 3.4: Expressionskontrolle viraler Proteine.** Humane A549 Epithelzellen wurden mit einer MOI=5 infiziert und die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion lysiert. Das Zelllysate wurde durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Immunoblot analysiert. Untersucht wurden die Expression der viralen Proteine NS1, PB1 und NP. Der Nachweis des zellulären Proteins Aktin diente als Ladekontrolle.

### 3.2.5 Analyse der intrazellulären NS1 Lokalisation in transfizierten A549 Zellen

Um mögliche Ursachen für die in 3.2.3 beobachteten Unterschiede in der multizyklischen Virusreplikation auf A549 Zellen zu ergründen, wurde die intrazelluläre Lokalisation des NS1 Proteins untersucht.



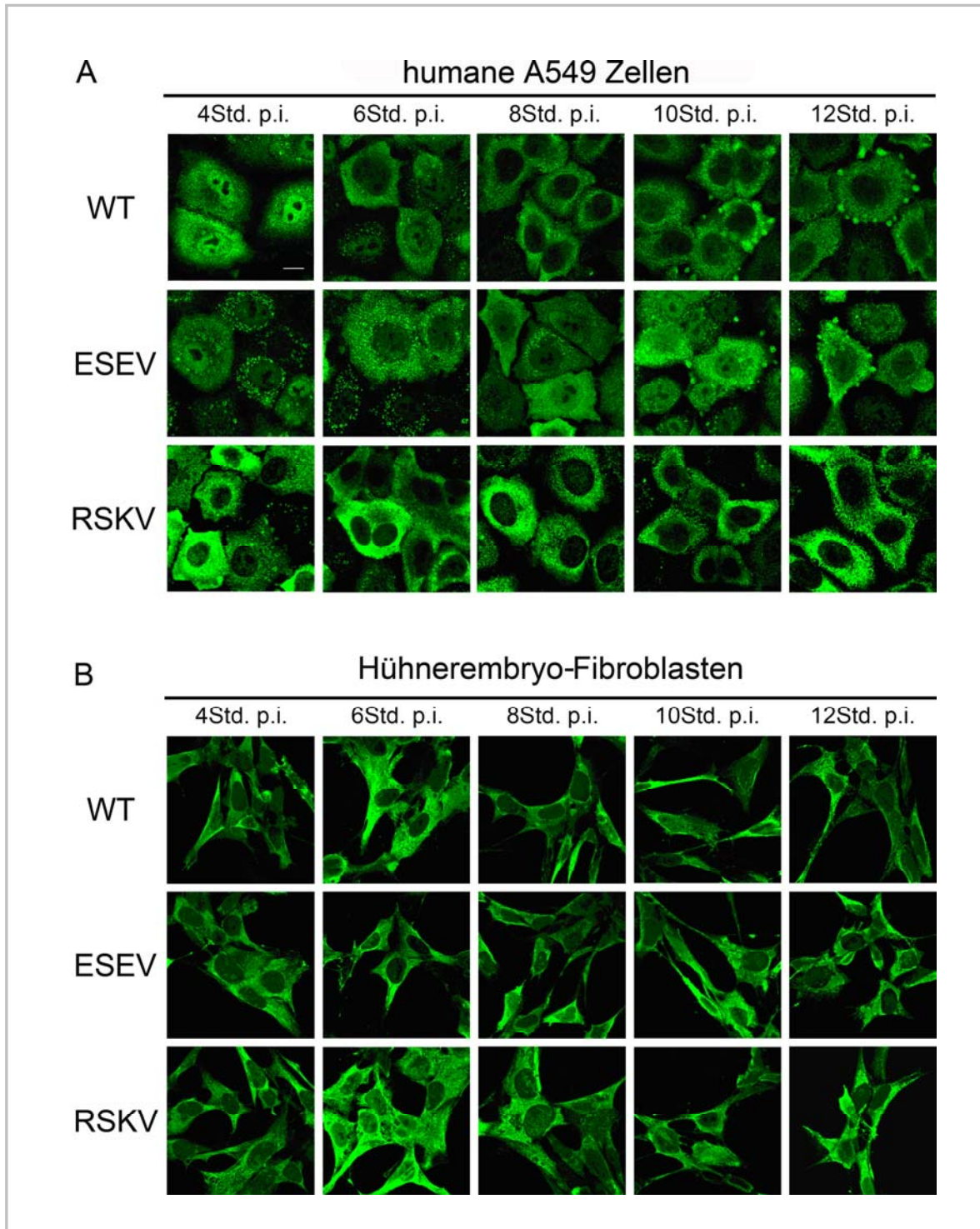
**Abb. 3.5: Intrazelluläre Lokalisation von transfizierten NS1 Proteinen.** A549 Epithelzellen wurden mit 1 µg Plasmid DNA der entsprechenden Konstrukte transfiziert. 24 Std. nach Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mittels einem polyklonalen Kaninchen anti-GST-A/NS1 Antikörper und einem sekundären anti-Kaninchen-Antikörper im CLSM nachgewiesen.

Hierbei sollte geklärt werden, ob sowohl die Rekonstitution des C-Terminus und damit verbunden möglicherweise der NLS2 (siehe Abschnitt 1.5.2 und Abbildung 1.10), als auch

die Veränderung des C-terminalen PL Motivs einen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation des NS1 Proteins in A549 Zellen haben. Dazu wurden die Zellen mit dem jeweiligen pHW-VN-1203-NS Plasmid transfiziert und die Lokalisation der NS1 Proteine 24 Std. nach Transfektion mittels indirekter Immunfluoreszenz im konfokalen Laserscanning Mikroskop analysiert. Abbildung 3.5 zeigt, dass alle drei NS1 Varianten im Nukleoplasma akkumulieren.

### **3.2.6 Analyse der intrazellulären NS1-Lokalisation in infizierten A549 Zellen und primären Hühnerembryo-Fibroblasten**

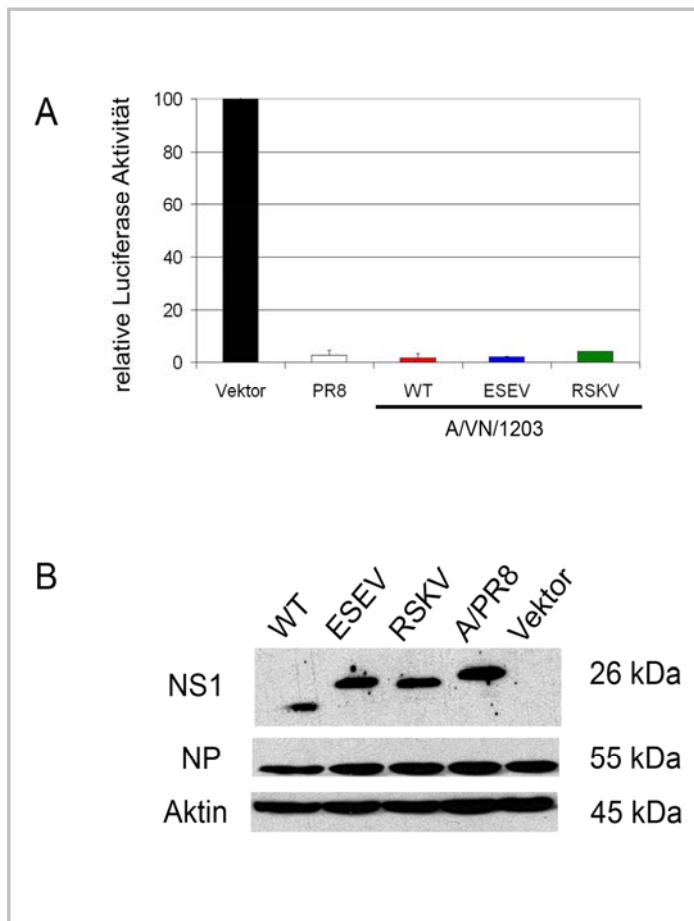
Um die intrazelluläre Lokalisation des NS1 Proteins im Kontext einer Virusinfektion zu bestimmen, wurden A549 Zellen mit einer MOI=2 infiziert und 4, 6, 8, 10 und 12 Std. nach Infektion (*post infection*, p.i.) fixiert. Einen Unterschied zu transfizierten Zellen hinsichtlich der Lokalisationen der NS1 WT, ESEV und RSKV Proteine zeigte die Analyse mittels indirekter Immunfluoreszenz im konfokalen Laserscanning Mikroskop. In humanen A549 Zellen (Abb. 3.6A) fand sich das NS1-WT Protein zu den frühen Zeitpunkten (4 und 6 Std. p.i.) sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleoplasma. Ab 8 Std. p.i. ließ sich das NS1 Protein nur noch im Zytoplasma nachweisen und war kaum noch im Kern zu finden. 10-12 Std. p.i. war das NS1 Protein in kugeligen Strukturen im Zytosol und der Zytoplasmamembran anfärbbar. Ob es sich bei diesen Strukturen um sogenannte apoptotische Körperchen (*apoptotic bodies*) handelt, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Im Gegensatz zum WT Protein befand sich das NS1-ESEV Protein während der Infektion zu allen Zeitpunkten sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleoplasma. 10-12 Std. p.i. war das ESEV NS1 Protein auch wie der WT in sphärischen Strukturen nachweisbar. Das NS1-RSKV Protein war über alle Zeitpunkte überwiegend im Zytoplasma lokalisiert. Eine Kernlokalisierung war 4 Std. p.i. zu beobachten, die jedoch sehr viel schwächer im Vergleich zu den NS1-WT und -ESEV Proteinen war. Diese Ergebnisse geben somit erste Hinweise darauf, dass die bei der Virusreplikation beobachteten Unterschiede möglicherweise mit der intrazellulären NS1-Lokalisation in Zusammenhang stehen. Dementsprechend wurde im Folgenden untersucht, wo das NS1 Protein in primären Hühnerembryo-Fibroblasten lokalisiert ist, da auf diesen Zellen keine Unterschiede hinsichtlich der Virusreplikation zu beobachten waren. Die Analyse der intrazellulären Lokalisation ergab, dass alle NS1 Proteine zu allen untersuchten Zeitpunkten vorwiegend im Zytoplasma akkumulierten und sich dadurch keine Unterschiede zwischen den NS1-WT, -ESEV und -RSKV Proteinen in primären Hühnerembryo-Fibroblasten nachweisen ließen (Abb. 3.6B).



**Abb. 3.6: Intrazelluläre Lokalisation der NS1 Proteine in infizierten Zellen.** Humane A549 Epithelzellen (A) oder Hühnerembryo Fibroblasten (B) wurden mit einer MOI=2 der Viren VN/1203-WT, -ESEV oder -RSKV infiziert. Die Zellen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten fixiert, permeabilisiert und im Anschluss mittels eines polyklonalem Kaninchen-anti-GST-A/NS1 Antikörpers und einem sekundären anti-Kaninchen-Antikörper im CLSM detektiert.

### 3.2.7 NS1-WT und Proteinvarianten verhindern die Virus-vermittelte Aktivierung des IFN- $\beta$ Promotors

Die verminderte Replikationsfähigkeit des ESEV Virus auf humanen A549 Zellen könnte theoretisch auf eine verminderte Fähigkeit des NS1-ESEV Proteins zurückzuführen sein, die Induktion des IFN- $\beta$  Promotors zu inhibieren. Daher wurde in weiteren Experimenten untersucht, ob die Veränderung des NS1 C-Terminus zu einer höheren IFN-Induktion in Virus-infizierten Zellen führt. Dazu wurde in MDCKII Zellen neben einem IFN- $\beta$  Luziferase-Reportergen das jeweilige A/NS1 Protein von VN/1203 koexprimiert und diese Zellen anschließend mit A/PR8/ $\Delta$ NS1 Virus infiziert. Bei dem A/PR8/ $\Delta$ NS1 Virus handelte es sich um ein rekombinantes Virus, dessen NS1 spezifischer Leserahmen deletiert wurde, so dass nur NEP/NS2 im 8ten Segment kodiert wurde. Die Infektion mit Influenza  $\Delta$ NS1 Viren hat eine starke IFN Antwort zur Folge (Garcia-Sastre *et al.* 1998), so dass es auch zur Aktivierung des IFN- $\beta$  Luziferase-Reportergens kommt.



**Abb. 3.7: Funktionelle Analyse der NS1 Proteine im IFN- $\beta$  Luziferase-Reportertest.** A) MDCKII Zellen wurden mit dem IFN- $\beta$  Promotor-Luziferase Reporterplasmid p125-Luc und den Expressionsplasmiden für das NS1 Protein von A/PR8/34, VN/1203-WT, -ESEV, -RSKV oder dem Leervektor (pHW2000) transfiziert. Als interne Kontrolle wurde zudem in allen Ansätzen das Plasmid pRL-TK-Luc, das für die *Renilla* luciferase codiert und unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors steht, kotransfiziert, um die Ergebnisse zu normalisieren. 24 Std. nach Transfektion wurden die Zellen mit A/PR8  $\Delta$ NS1 Virus MOI = 1 infiziert. Die Luziferase Aktivität im Zellextrakt wurde 8 Std. nach Infektion bestimmt. Der Wert für die Virus-induzierte Erhöhung in Vektor transfizierten Zellen wurde auf 100% gesetzt und mit der Erhöhung in NS1-exprimierenden Zellen verglichen. B) Nachweis der Virusinfektion und Expressionskontrolle der transfizierten NS Konstrukte mittels Immunoblot Analyse. Fehlerbalken geben die SEM an.

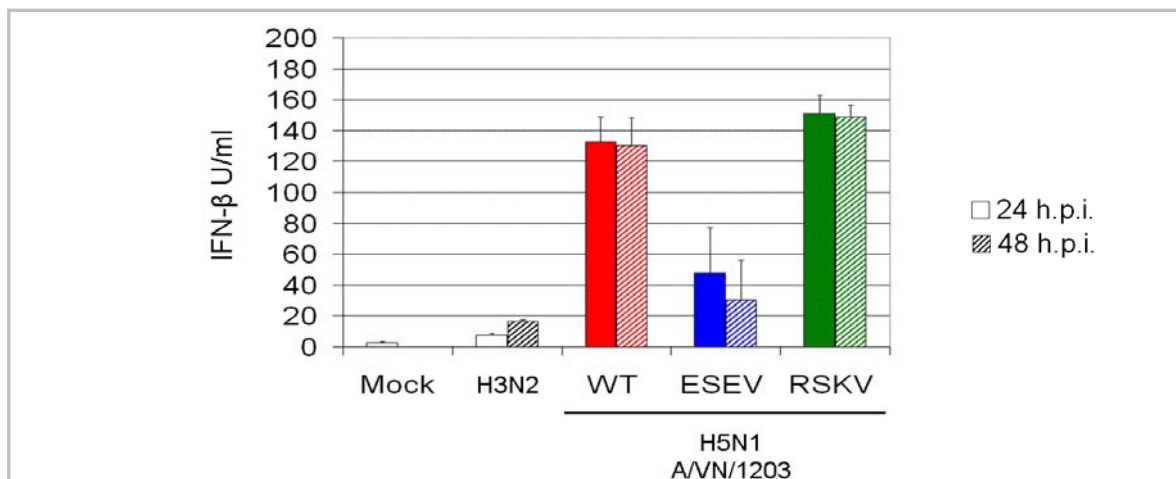
Als Kontrollen wurden entweder das A/NS1 Protein des H1N1 A/PR8/34 (PR8) oder der Leervektor pHW2000 zusammen mit dem IFN- $\beta$  Reportergen koexprimiert. Abbildung



3.7A zeigt deutlich, dass die Expression des A/PR8-NS1 Proteins die durch das A/PR8/ $\Delta$ NS1 Virus induzierte Promotoraktivierung nahezu vollständig inhibieren konnte. Eine ähnliche Inhibition wurde durch die Koexpression der jeweiligen VN/1203-NS1 Proteine erreicht. In Abbildung 3.7B wurde mittels Immunoblot Analyse die Expression der jeweiligen NS1 Proteine sowie die Infektion mit dem A/PR8/ $\Delta$ NS1 Virus (NP) nachgewiesen.

### 3.2.8 Analyse der Virus-vermittelten Sekretion von IFN- $\beta$ bei Infektion mit VN/1203-Viren auf A549 Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die drei NS1-WT, -ESEV und -RSKV Proteine in der Lage sind, die Virus-vermittelte Aktivierung eines IFN- $\beta$  Promotors effizient zu inhibieren, stellte sich die Frage, wie viel IFN- $\beta$  von infizierten A549 Epithelzellen sekretiert wird, die mit den entsprechenden VN/1203-WT, -ESEV oder -RSKV Viren infiziert wurden. Dazu wurden die Zellen mit einer MOI von 0,01 infiziert und ein Aliquot vom Überstand 24 und 48 Std. p.i. genommen. Die Proben wurden im Anschluss mittels IFN- $\beta$  ELISA analysiert. Als Kontrolle wurden die A549 Zellen hier entweder schein behandelt (Mock) oder mit dem saisonalen H3N2 Influenza A/PAN/2007/99 Virus infiziert. Im Überstand der mit VN/1203-WT und -RSKV Viren infizierten Zellen fanden sich deutlich höhere IFN- $\beta$ -Konzentrationen (130-150 IU) im Vergleich zu A/Panama/2007/99 infizierten Zellen (Abb. 3.8). Die IFN- $\beta$ -Konzentrationen im Überstand von ESEV Virus infizierten Zellen war im Vergleich zu VN/1203-WT und -RSKV Virus reduziert, jedoch doppelt so hoch wie die von Influenza A/PAN/2007/99 Virus infizierten Zellen.



**Abb. 3.8: Analyse der IFN- $\beta$  Sekretion von infizierten A549 Zellen.** Humane A549 Epithelzellen wurden mit rekombinantem H5N1 Influenza VN/1203-WT, -ESEV, -RSKV Virus oder dem H3N2 Influenza A/Pan/2007/99 Virus mit einer MOI=0,01 infiziert. 24 und 48 Std. p.i. wurden Aliquots der Zellkulturüberstände entnommen und diese mittels ELISA auf ihre IFN- $\beta$  Konzentration hin untersucht. Fehlerbalken geben die SEM an.

### **3.2.9 Charakterisierung der Virulenz der rekombinanten VN/1203 WT, -ESEV, -RSKV Viren im Tiermodell**

Um bestimmen zu können, ob es sich bei dem untersuchten C-terminalen PL Motiv des NS1 Proteins um eine Virulenzdeterminante handelt, reichen die auf Zellkultur basierten Studien nicht aus, da diese nicht die Komplexität eines Wirtsorganismus einschließlich seines Immunsystems widerspiegeln. Zudem unterscheiden sich die verschiedenen Wirtsspezies auch hinsichtlich ihrer Immunsysteme, so dass sich der Einfluss einer potentiellen Virulenzdeterminante in verschiedenen Spezies wie z.B. Säuger und Vögel unterschiedlich auswirken kann. Im Folgenden sollte daher untersucht werden, welchen Einfluss das C-terminale PL Motiv auf die Virulenz des hoch-pathogenen H5N1 VN/1203-Virus in der Maus und dem Huhn hat.

#### **3.2.9.1 Die Bestimmung der Pathogenität der VN/1203 Viren in der Maus**

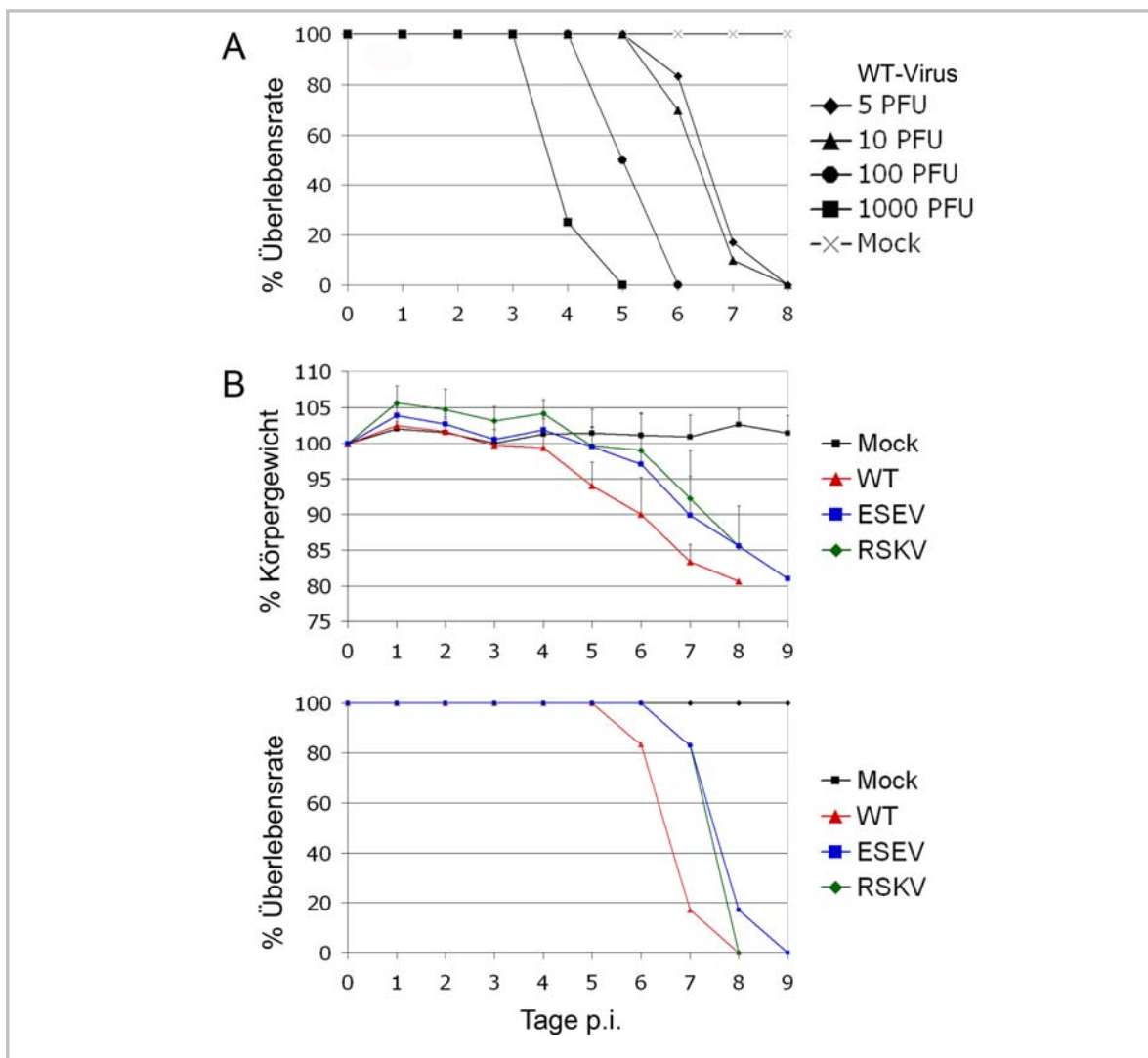
Für eine erste Charakterisierung der Pathogenität der WT, ESEV und RSKV Viren in der Maus wurde die Virusdosierung bestimmt, bei der 50% der Mäuse einer Infektion mit dem entsprechenden Virus erliegen (Maus letale Dosis 50 (MLD<sub>50</sub>)). Der in der Literatur beschriebene MLD<sub>50</sub> Wert für das Influenza VN/1203/04 Virus Isolat liegt bei 0,6 PFU/Maus (Yen *et al.* 2005), während der MLD<sub>50</sub> Wert für ein korrespondierendes rekombinantes Virus bei ~ 1 PFU/Maus liegt (Yen *et al.* 2007). Aufgrund der Komplexität der Influenza Viren ist die Generierung funktioneller rekombinanter Viren nicht immer trivial, so dass stille Mutationen oder aber Basensubstitutionen in nicht-kodierenden Bereichen die Eigenschaften der Viren maßgeblich bestimmen können. Dementsprechend muss die Virulenz rekombinant hergestellter Viren nicht zwangsweise der ihres natürlichen Isolates entsprechen. Für die MLD<sub>50</sub> Bestimmung wurden Gruppen von je sechs 7-Wochen-alten BALB/c Mäusen mit unterschiedlichen Virus-Dosierungen von 1000 - 5 PFU/Maus infiziert (Abbildung 3.9A). Entsprechend den Vorlagen der für Tierversuche zuständigen Behörde (Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (LAGeSo)) wurden alle Mäuse euthanasiert, die entweder 20 % ihres Körpergewichts verloren und/oder entsprechend starke Krankheitssymptome aufwiesen. Die Experimente zeigten, dass die MLD<sub>50</sub> für das WT Virus (Abbildung 3.9 A) und auch für das ESEV und RSKV Virus (Abbildung 3.9B) unter 5 PFU/Maus lag, so dass die MLD<sub>50</sub> nicht genau bestimmt werden konnte, vermutlich jedoch wie in der Literatur beschrieben bei ~1 PFU liegt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die mit dem WT Virus infiziert wurden, im Vergleich zum ESEV und RSKV Virus schneller Gewicht verloren (Abbildung



3.9B) und auch einen Tag früher bereits Symptome zeigten. Der Verlauf der Überlebenskurven der ESEV und RSKV Viren hingegen war ähnlich.

### 3.2.9.2 VN/1203-WT, -ESEV und -RSKV Viren zeigen ein ähnliches Verbreitungsmuster und replizieren zu ähnlichen Virustitern in BALB/c Mäusen

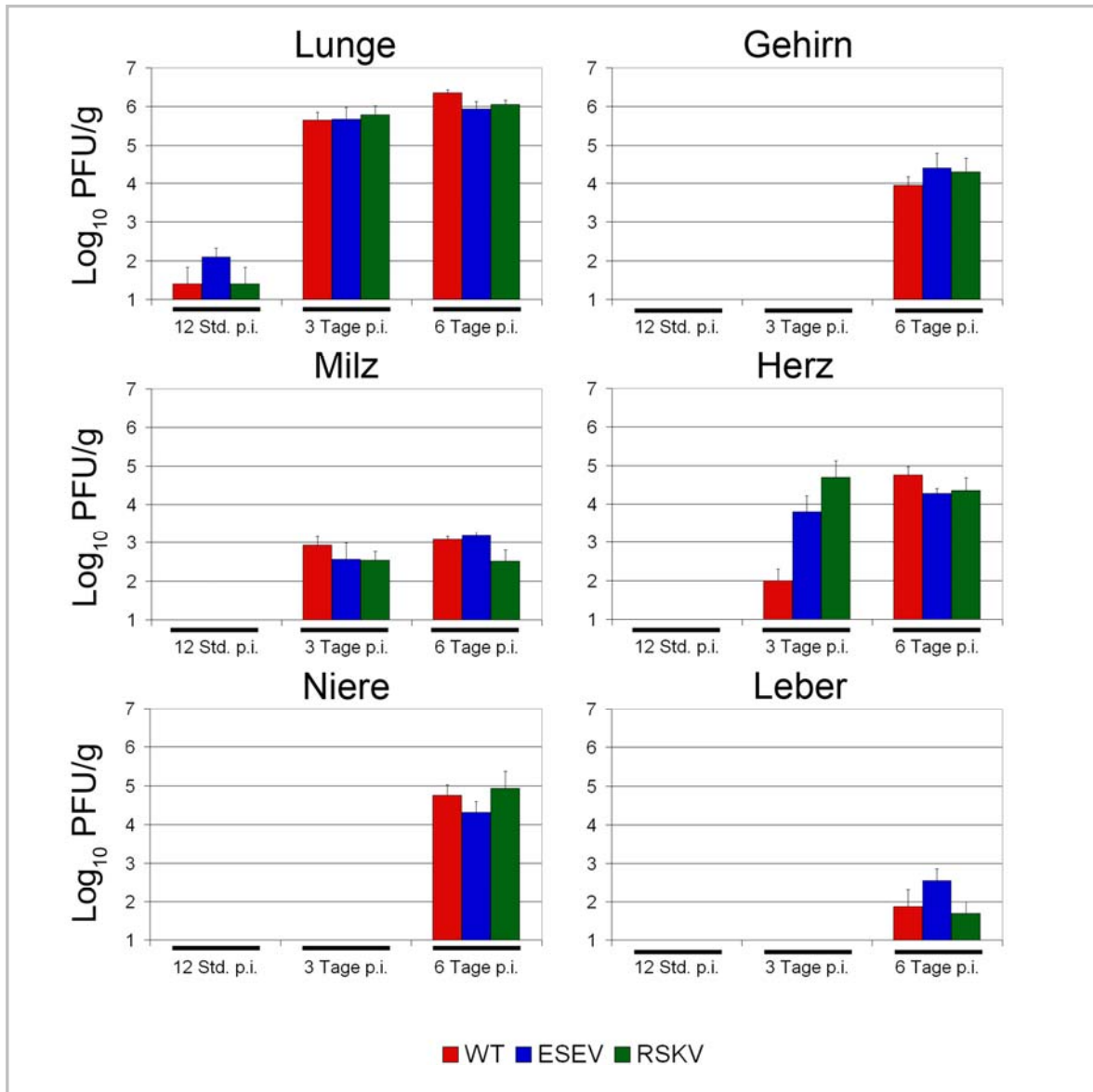
Um mögliche Unterschiede zwischen dem WT, ESEV und RSKV Virus sowohl in der Virusverbreitung als auch in der Viruslast bestimmen zu können, wurden Gruppen von jeweils vier BALB/c Mäusen mit 5 PFU/Maus infiziert und 12 Std., 3 Tage und 6 Tage nach Infektion euthanasiert.



**Abb. 3.9: Bestimmung der Maus letalen Dosis 50 (MLD<sub>50</sub>)** A) Zur Bestimmung der MLD<sub>50</sub> der rekombinanten Influenza VN/1203 Viren mit modifiziertem C-Terminus wurden zunächst Gruppen von je sechs 7-Wochen-alten BALB/c Mäusen mit unterschiedlichen Dosen (1000-5 PFU) des rekombinanten WT-Virus infiziert. B) Darstellung des Verlustes des Körpergewichts und des Verlaufs der Überlebensrate von BALB/c Mäusen, die jeweils mit 5 PFU des WT, ESEV oder RSKV Virus infiziert wurden. Fehlerbalken geben die SEM an.

## Ergebnisse

Zu entsprechenden Zeitpunkten wurde für histologische Analysen aus jeder Gruppe einer Maus ein Lungenflügel entnommen und in PFA fixiert. Weiterhin wurden den Mäusen neben der Lunge auch Gehirn, Herz, Niere, Leber sowie Milz entnommen, um anschließend mittels Avicell-Plaque-Test die Viruskonzentration in Organhomogenisaten bestimmen zu können (Abbildung 3.10).

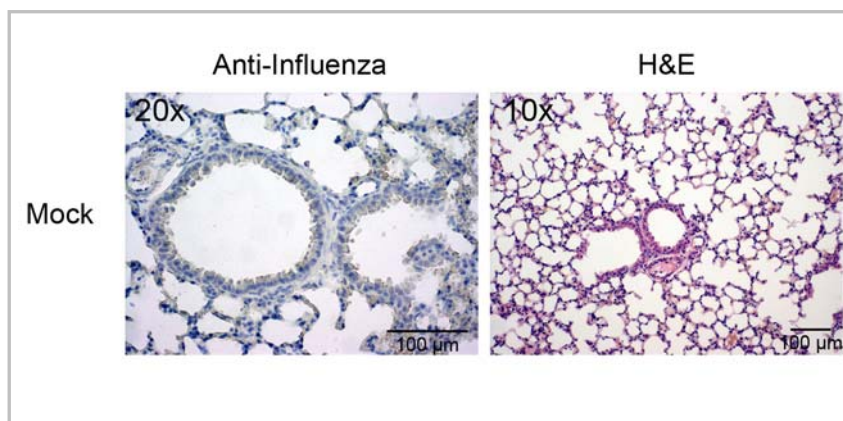


**Abb. 3.10: Viruslast und Verbreitung in verschiedenen Mausorganen.** Gruppen von je vier 7-Wochen-alten BALB/c Mäusen wurden mit jeweils 5 PFU des VN/1203-WT, -ESEV oder -RSKV Virus infiziert und nach 12 Std., 3 Tagen oder 6 Tagen euthanasiert. Den Mäusen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Lunge, Gehirn, Milz, Herz, Niere und Leber entnommen. Alle Organe wurden homogenisiert, und die durch Zentrifugation von groben Partikeln geklärten Überstände wurden zur Bestimmung des Virustiters pro Gramm für Avicell-Plaque-Tests verwendet. Fehlerbalken geben die SEM an.

Bereits bei der Infektion der WT-Gruppe, die 3 Tage p.i. euthanasiert werden sollte, verstarb eine Maus, so dass diese Gruppe nur aus drei statt vier Mäusen bestand. Die Analyse der Virusverbreitung in den entnommenen Organen zeigte, dass die Viren 12 Std. p.i. nur in den Lungen nachzuweisen waren. An Tag 3 p.i. ließen sich die Viren zudem in Milz und Herz nachweisen, während Viren 6 Tage p.i. außerdem aus Gehirn, Leber und Niere isoliert wurden. Die höchste Viruslast konnte in den Lungen 6 Tage p.i. nachgewiesen werden. Bereits 3 Tage p.i. wurden hier bis zu  $1 \times 10^6$  PFU gemessen. Allgemein zeichnete sich jedoch kein signifikanter Unterschied in der Viruslast und Verbreitung von WT, ESEV und RSKV Virus in BALB/c Mäusen ab. Der zu beobachtende Unterschied bei den an Tag drei p.i. entnommenen Herzen ist aufgrund der verminderten Stückzahl in der WT Gruppe vermutlich nicht signifikant.

### 3.2.9.3 Histologische Analysen von Mauslungenpräparaten

Die nach Entnahme fixierten und dehydrierten Mauslungenflügel wurden am Institut für Tierpathologie der FU von Frau Dr. Mauel immunhistochemisch präpariert und analysiert. Die Befunde ergaben, dass in den Lungen der Mock infizierten Mäuse zu allen Zeitpunkten weder Influenza-Antigen noch atypische histologische Veränderungen nachweisbar waren. Hierbei zeichnen sich „gesunde“ Lungen histologisch vor allem dadurch aus, dass die für den Austausch von  $O_2$  und  $CO_2$  benötigten Alveolen „freiliegen“ und nicht von einwandernden Immunzellen umgeben sind. Abbildung 3.11 zeigt exemplarisch die Schnitte eines Mock-infizierten Lungenpräparats 6 Tage p.i..

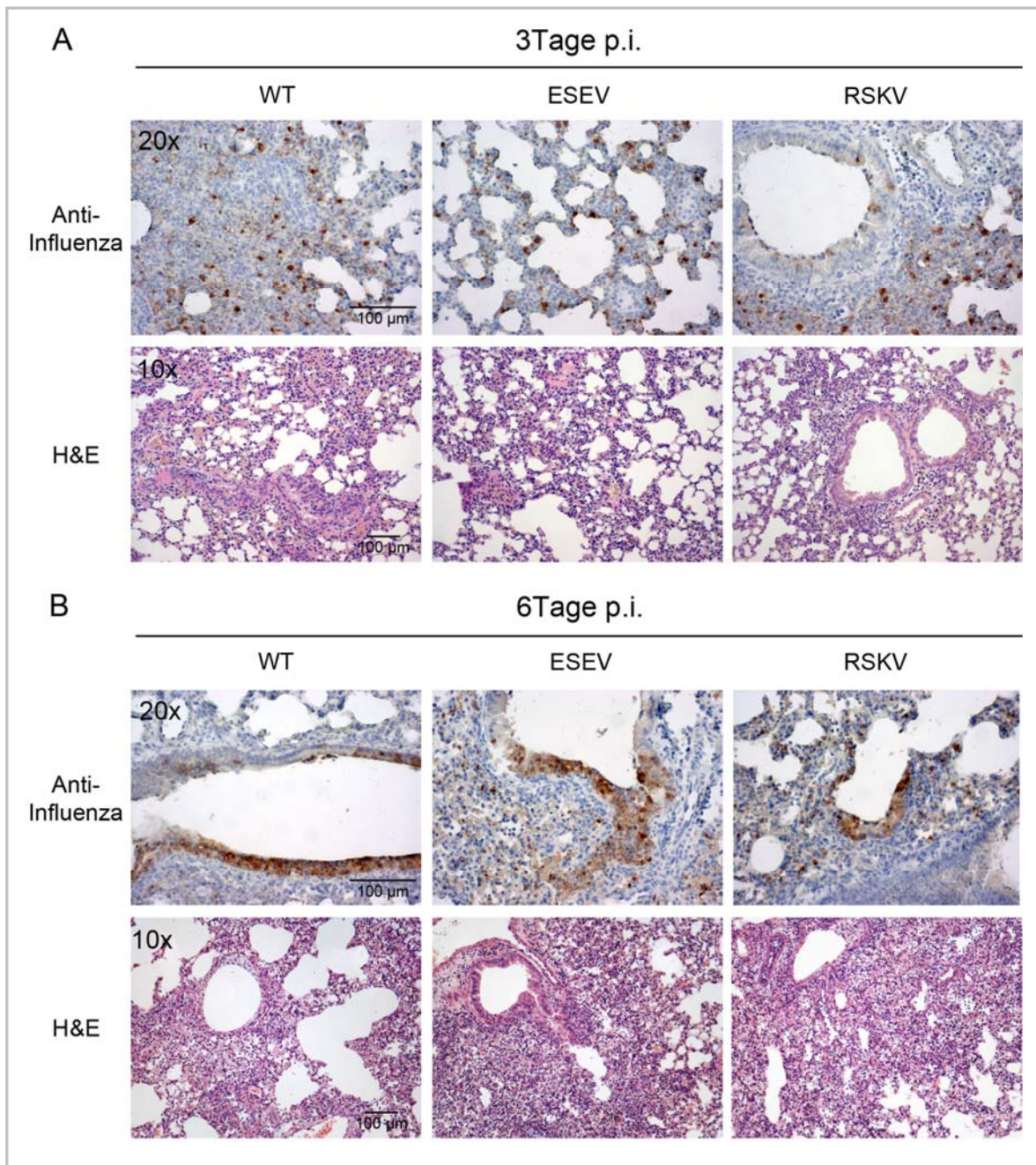


**Abb. 3.11: Immunhistochemische Analyse von Mock infizierten Mauslungen.** Die Abbildung zeigt eine Mock infizierte Mauslung am Tag 6 nach „Infektion“. Die fixierten Lungenschnitte wurden entweder anti-Influenza (Vergrößerung 20x) oder Hämatoxylin & Eosin (H&E) (Vergrößerung 10x) gefärbt.

Des Weiteren konnten 12 Std. p.i. in keiner Mauslung Influenza-Antigen positive Zellen nachgewiesen werden. 3 Tage p.i. hingegen waren in WT, ESEV und RSKV Virus infizierten Mauslungen deutlich fokale Bereiche von Typ II Alveolarepithelzellen spezifisch



für Influenza Antigen gefärbt (Abbildung 3.12A), während nach 6 Tagen zudem infizierte Bronchialepithelzellen nachgewiesen werden konnten (Abbildung 3.12B).



**Abb. 3.12: Immunhistochemische und H&E Analysen von VN/1203-WT, -ESEV, -RSKV Virus infizierten Mauslungen.** BALB/c Mäuse wurden mit jeweils 5 PFU des VN/1203-WT, -ESEV oder -RSKV Virus infiziert und 3 oder 6 Tage p.i. euthanasiert. A) Infizierte Mauslungen entnommen 3 Tage p.i.. B) Infizierte Mauslungen entnommen 6 Tage p.i.. Die fixierten Lugenschnitte wurden entweder Influenza-spezifisch gefärbt (Vergrößerung 20x) oder H&E gefärbt (Vergrößerung 10x).

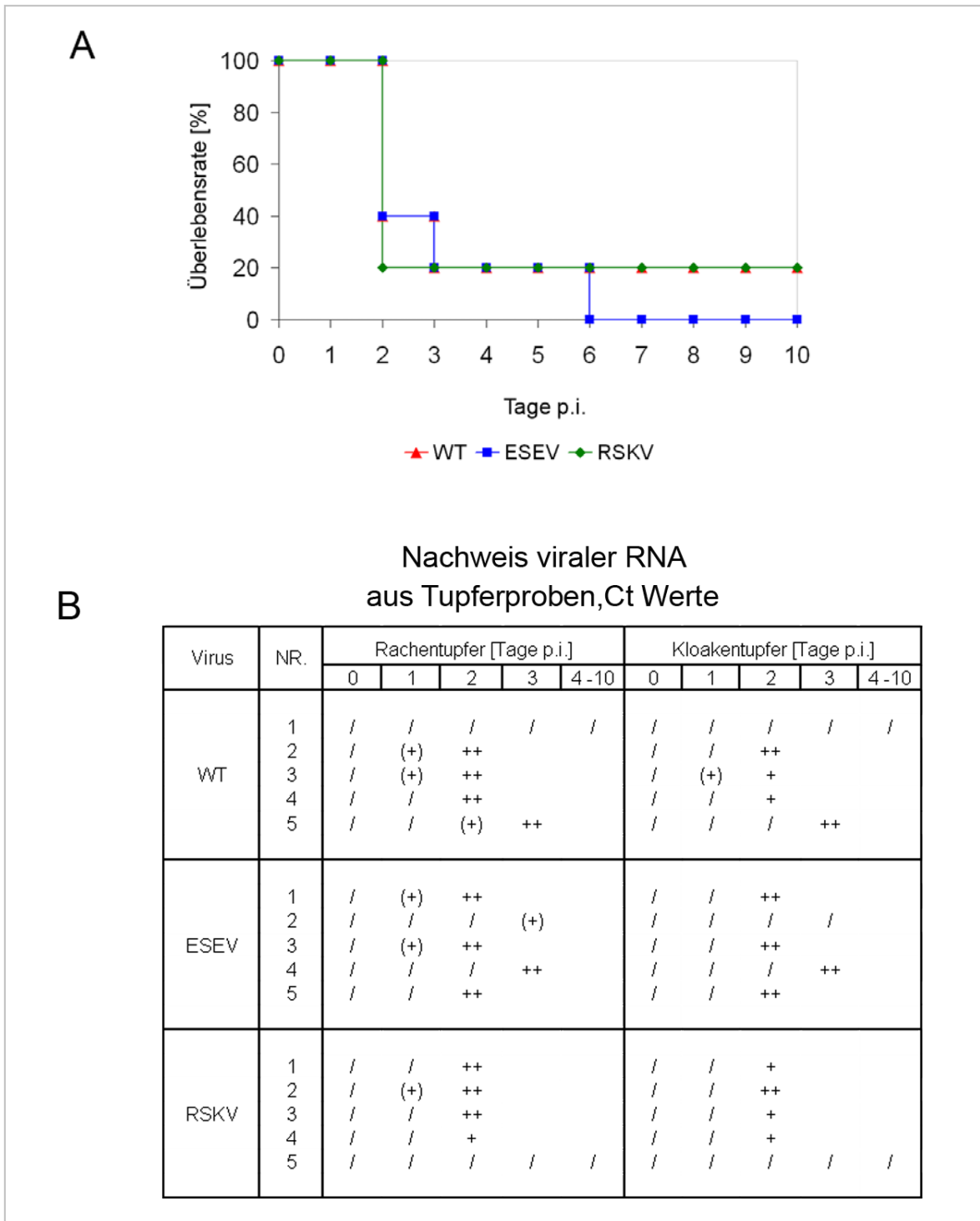
Von den 3 und 6 Tage p.i. entnommenen Lungen wurden des Weiteren Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (H&E) angefertigt, durch die die verschiedenen Strukturen der Lungen

angefärbt werden konnten (Zellkerne blau; Zytoplasma rötlich/bläulich, Kollagen rot). Dabei fanden sich 3 Tage p.i. perivaskuläre und peribronchioläre lymphozytäre Infiltrate und vereinzelte neutrophile Granulozyten. Zudem konnten geringgradige Bronchialepithelnekrosen und Bronchioli mit Immuneinfiltraten und Detritus nachgewiesen werden. Das Lungenparenchym der mit WT Virus infizierten Mäuse war zu diesem Zeitpunkt zu ca. 20% betroffen, während das Parenchym der mit ESEV und RSKV Virus infizierten Lungen nur zu ca. 5% betroffen war (Abbildung 3.12.A). In den angefertigten Schnitten der 6 Tage p.i. entnommenen Lungen fanden sich mittelgradige, bronchointerstitielle, nekrotisierende Pneumonien mit Bronchialepithelzellnekrosen, sowie die schon beschriebenen perivaskulären und peribronchiolären lymphozytären Infiltrate und neutrophilen Granulozyten, in denen eine geringgradige Hyperplasie der Typ II Alveolarepithelzellen und Alveolarwandnekrosen zu beobachten war (Abbildung 3.12B).

### **3.2.9.4 Bestimmung der Virulenz des WT, ESEV und RSKV Virus in oronasal infizierten Hühnern**

Da das VN/1203 Virus ein ursprünglich von Vögeln auf den Menschen übertragenes Virus ist und die Virulenz mancher Influenza Viren stark von der Wirtsspezies abhängt, wurde in weiteren Versuchen der Einfluss der C-terminalen Variationen des NS1 Proteins auf die Virulenz in Vögeln bestimmt. Dafür wurde die Pathogenität der VN/1203-WT, -ESEV und -RSKV Viren in Hühnern analysiert. Die Experimente (Abschnitte 3.2.9.4 und 3.2.9.5) wurden in Kooperation mit PD Dr. med. vet. Beer und Dr. med. vet. Kalthoff am Institut für Virusdiagnostik des Friedrich-Loeffler-Instituts Riems durchgeführt, da derartige Versuche im S3 Labor des RKI nicht durchgeführt werden können.

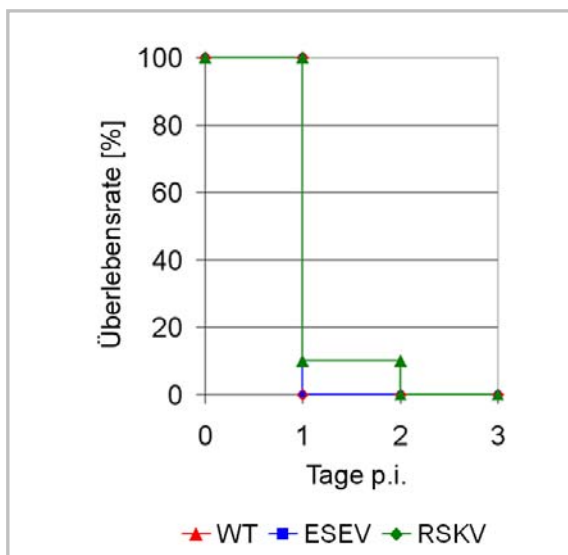
Zur Bestimmung der Virulenz im Huhn wurden jeweils fünf 6-Wochen-alte Hühner oronasal mit einer Dosis von  $10^4$  PFU/Huhn infiziert und anschließend für eine Dauer von 10 Tagen beobachtet. Einmal täglich wurden von den Hühnern sowohl Rachen- als auch Kloaken-Abstriche genommen, in denen virale RNA mittels *real time* RT-PCR nachgewiesen wurde. Die Überlebenskurven der infizierten Hühner (Abbildung 3.13A) zeigten, dass durchschnittlich 3 von 5 Hühnern bereits am zweiten Tag p.i. verstorben waren. Im weiteren Verlauf überlebte je ein Huhn der WT und RSKV Gruppe, jedoch konnte für diese Tiere auch keine virale RNA mittels *real time* RT-PCR nachgewiesen werden, so dass es fraglich ist, ob die entsprechenden Hühner überhaupt infiziert wurden. Die Ergebnisse der *real time* RT-PCR sind als Ct-Werte (*cycle of threshold*, Schwellenwert-Zyklus) in Abbildung 3.13B dargestellt.



**Abb. 3.13: Bestimmung der Virulenz der VN/1203 Virus Varianten in oronasal infizierten Hühnern.** A) Überlebensraten [%] von oronasal infizierten Hühnern. Gruppen von 5 sechs-Wochen-alten Hühnern wurden mit VN/1203-WT, -ESEV oder -RSKV Virus mit einer Dosis von  $10^4$  PFU infiziert. B) Bestimmung der viralen RNA mittels *real time* RT-PCR in Abstrichen des Rachens und der Kloake. *Real-time* RT-PCR Ergebnisse sind als "cycle of threshold" (Ct) Werte angegeben: /, >40; (+), >30–40; +, >25–<30; ++, >20–<25; +++, <20.

### 3.2.9.5 Bestimmung des intravenösen Pathogenitätsindex in Hühnern

Da niedrig-pathogene aviäre Influenza Viren vom Subtyp H5 und H7 zu hoch-pathogenen Formen mutieren können, sind heutzutage alle Infektionen von Geflügel mit Viren vom Subtyp H5 und H7 unabhängig von ihrer Pathogenität als meldepflichtige aviäre Influenza Viren einzustufen und erfordern daher offizielle Kontrollmaßnahmen (OIE, EU directive 2005/94/EC). Der offizielle Test zur Pathogenitätsbestimmung eines Virusstamms ist die Bestimmung des intravenösen Pathogenitätsindex (IVPI) entsprechend des OIE Standard Protokolls (OIE, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for terrestrial animals, 2008). Der IVPI gibt den Mittelwert der klinischen Einstufung von 10 intravenös infizierten 6-Wochen-alten Hühnern an. Viren werden als hoch-pathogen bezeichnet, wenn ihr IVPI größer als 1,2 nach 10 Tagen Beobachtung ist. Dabei werden die Hühner täglich wie folgt eingestuft: 0 [gesund], 1 [krank], 2 [schwer krank] und 3 [tot]. In der Regel werden Viren, die eine multibasische Spaltstelle in ihrer HA Sequenz tragen, mittels IVPI als hoch pathogen eingestuft. Zur Bestimmung des IVPI der rekombinanten WT, ESEV und RSKV Viren wurden wie beschrieben zehn 6-Wochen-alte Hühner mit einer Dosis von  $10^4$  PFU/Huhn intravenös infiziert (Abbildung 3.15). Ein Tag p.i. waren alle Hühner der mit WT und ESEV Virus infizierten Gruppen verstorben (IVPI=3). Auch in der mit RSKV Virus infizierten Gruppe starben 9 von 10 Tieren einen Tag p.i.. Das letzte Tier dieser Gruppe verstarb am zweiten Tag p.i., so dass sich ein IVPI von 2,99 für das RSKV Virus ergab.



**Abb. 3.15: Bestimmung des IVPI in Hühnern.** Überlebensraten [%] von intravenös infizierten Hühnern. Gruppen von 10 sechs-Wochen-alten Hühnern wurden mit VN/1203-WT, -ESEV oder -RSKV Virus mit einer Dosis von  $10^4$  PFU infiziert.

Die in diesem Versuch positiv getesteten Rachen- und Kloakentupfer wurden entsprechend dem rapiden fatalen Verlauf der Infektion *post mortem* genommen und zeigen nur geringe Unterschiede in der Viruslast (Abbildung 3.16).



### Nachweis viraler RNA aus Tupferproben, Ct Werte

Virus	NR.	Rachentupfer [Tage p.i.]			Kloakentupfer [Tage p.i.]		
		0	1	2	0	1	2
WT	1	/	++		/	+++	
	2	/	++		/	+++	
	3	/	++		/	+++	
	4	/	+++		/	+++	
	5	/	+++		/	+++	
	6	/	+++		/	+++	
	7	/	++		/	+	
	8	/	++		/	+++	
	9	/	++		/	+++	
	10	/	++		/	++	
ESEV	1	/	++		/	+++	
	2	/	++		/	+++	
	3	/	+++		/	++	
	4	/	+++		/	++	
	5	/	++		/	++	
	6	/	++		/	+++	
	7	/	++		/	+++	
	8	/	+++		/	++	
	9	/	++		/	+++	
	10	/	+		/	+++	
RSKV	1	/	+++		/	++	
	2	/	++		/	+++	
	3	/	++		/	++	
	4	/	++		/	++	
	5	/	++		/	++	
	6	/	++	+++	/	++	++
	7	/	++		/	++	
	8	/	++		/	++	
	9	/	++		/	++	
	10	/	++		/	+++	

**Abb. 3.16: Bestimmung des IVPI in Hühnern.** Gruppen von zehn 6-Wochen-alten Hühnern wurden mit VN/1203-WT, -ESEV oder -RSKV Virus mit einer Dosis von  $10^4$  PFU intravenös infiziert. Bestimmung der viralen RNA mittels real time RT-PCR in Abstrichen des Rachens und der Kloake. *Real-time* RT-PCR Ergebnisse sind als "cycle of threshold" (Ct) Werte angegeben: /, >40; (+), >30–40; +, >25–<30; ++, >20–<25; +++, <20.

Fasst man die bisher dargestellten Ergebnisse zusammen, so zeigt sich, dass das C-terminale PL Motiv ESEV des NS1 Proteins im Hintergrund eines H5N1 Virus nicht als Virulenzdeterminante gewertet werden sollte. So führte dieses Motiv in Zellkultur zu einer Attenuierung der Virusreplikation auf Säugerzellen und zeigte keinen signifikanten

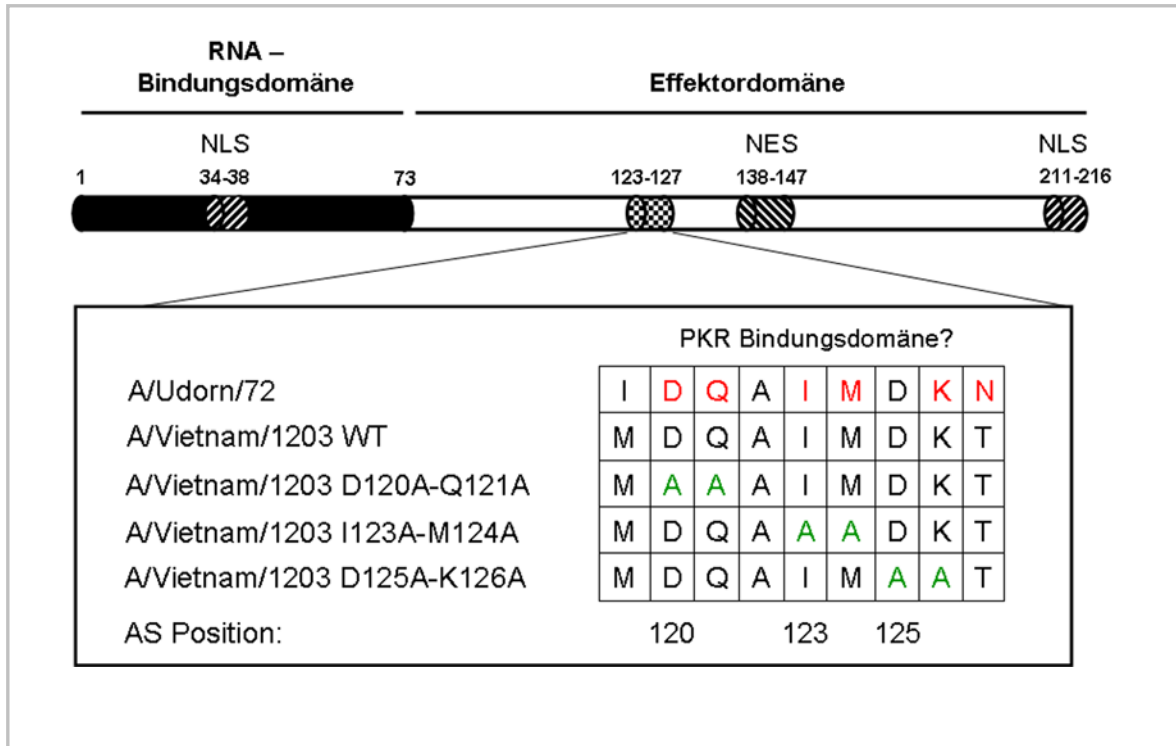
Einfluss auf die Virulenz des korrespondierenden rekombinanten Virus in der Maus und dem Huhn.

Das NS1 Protein des Influenza A Virus (A/NS1) greift als multifunktionaler Virulenzfaktor in viele zelluläre Prozesse ein, um die virale Replikation zu fördern. Die Interaktion mit der antiviralen Kinase PKR ist dabei ein wichtiger Schritt zur Blockierung des antiviralen Status der Wirtszelle. Eine erste Studie zeigte, dass auch das NS1 Protein eines H5N1 Influenza Virus mit PKR interagiert und dessen Aktivierung inhibiert, jedoch konnte der genaue Mechanismus dafür noch nicht abschließend geklärt werden (Ma *et al.* 2009). Im folgenden Teil dieser Arbeit wurde nun der Fokus der Untersuchungen auf eine mögliche Interaktion des VN/1203-NS1 Proteins mit der dsRNA abhängigen Proteinkinase R (PKR) gesetzt, mit dem Ziel weitere Kenntnisse über den Mechanismus und den Einfluss dieser Interaktion auf die virale Replikation zu erlangen.

### **3.3 Charakterisierung der Interaktion des VN/1203 NS1 Proteins mit PKR**

In der Literatur ist beschrieben, dass das NS1 Protein als PKR-Antagonist fungiert. Jedoch ist noch nicht abschließend geklärt, auf welche Art und Weise dies geschieht. Lu *et al.* (1995) beschrieben für Influenza A Viren eine dsRNA-Sequestrierung durch NS1, während Min *et al.* (2007) eine direkte PKR-Bindung postulierten, die eine Aktivierung von PKR verhindert. Dementsprechend wurden in der Literatur verschiedene AS Positionen im NS1 Protein der Influenza A Viren beschrieben, die für die Blockade der PKR Aktivierung essentiell sein könnten. Für den postulierten Mechanismus der dsRNA-Sequestrierung wurden die AS R38 und K41 im NS1 Protein als wichtig erachtet, da sie die RNA Bindung ermöglichen (Donelan *et al.* 2003). Für den postulierten Mechanismus der direkten Bindung von NS1 an PKR wurden dagegen die AS Positionen 123-127 des Influenza A/Udorn/72 NS1 Proteins (Min *et al.* 2007) als essentiell beschrieben. Für das NS1 Protein der Influenza B Viren hingegen konnte gezeigt werden, dass für die Interaktion mit PKR die dsRNA-Bindungsaktivität beider Proteine notwendig ist (Dauber *et al.* 2009). Es ist daher nicht auszuschließen, dass es für den Mechanismus der Inhibition der PKR durch NS1 Stamm-spezifische Unterschiede geben könnte. Welcher Mechanismus für das NS1 Protein des VN/1203 Virus zutrifft sollte im Folgenden geklärt werden.

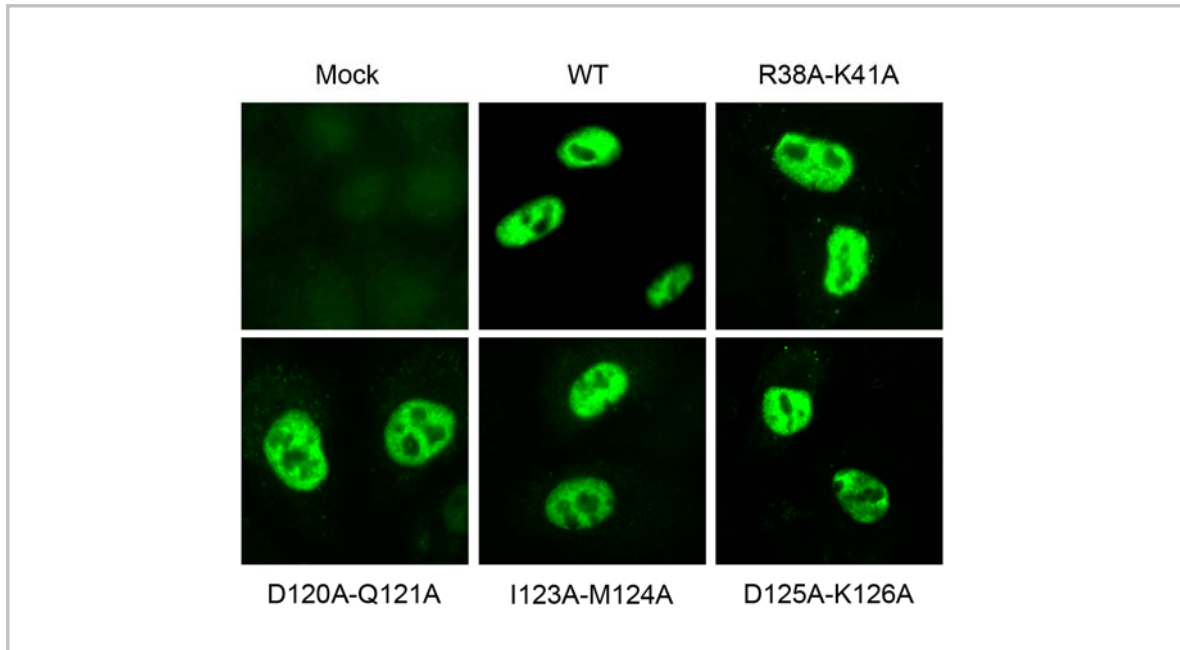




**Abb. 3.18: Schematische Darstellung des NS1 Proteins des A/Vietnam/1203/04 Influenza Virus.** Der hervorgehobene Bereich stellt die mögliche PKR-Bindungsdomäne im NS1 Protein dar. Zum direkten Vergleich wurden die im NS1 Protein des Influenza A/Udorn/72 Virus untersuchten Aminosäuren (Min *et al.* 2007) rot markiert. Der VN/1203-WT NS1 Sequenz stehen die mutierten NS1 Proteine gegenüber. Die Aminosäuresubstitutionen zu Alanin sind grün dargestellt.

### 3.3.2 Untersuchung der Expression und Lokalisation der NS1 Mutanten R38A-K41A, D120A-Q121A, I123A-M124A und D125A-K126A

Nach erfolgter Mutagenese wurden die Expression und die intrazelluläre Lokalisation der verschiedenen NS1 Mutanten untersucht. Dabei sollte insbesondere geklärt werden, ob die Substitutionen an Position 38 und 41 zu Alanin die Kernlokalisierung des NS1 Proteins beeinflussen, da AS 38 Teil des nukleären Lokalisationssignals (NLS) von andern NS1 Proteinen ist (Melen *et al.* 2007). Dazu wurden humane A549 Epithelzellen mit den entsprechenden pHW-NS Plasmiden transfiziert und 24 Std. nach Transfektion fixiert und permeabilisiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit einem primären polyklonalem Kaninchen anti-GST-A/NS1 Antikörper und einem sekundären anti-Kaninchen Antikörper inkubiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert (Abbildung 3.19). Dabei zeigte sich, dass alle NS1 Proteine im Nukleoplasma lokalisiert waren und annähernd gleiche Expressionsstärke aufwiesen.



**Abb. 3.19: Intrazelluläre Lokalisation von NS1-WT und Proteinmutanten.** Humane A549 Epithelzellen wurden jeweils mit je 1µg der Plasmide pHW-NS-WT, -R38A-K41A, -D120A-Q121A, -I123A-M124A oder -D125A-K126A transfiziert. 24 Std. nach Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mittels eines polyklonalen Kaninchen anti-GST-A/NS1 Antikörpers und eines sekundären anti-Kaninchen Antikörpers gefärbt. Die NS1 Proteine wurden durch indirekte Immunfluoreszenzanalyse nachgewiesen.

### 3.3.3 *In-vitro*-Analyse der Interaktionsfähigkeit der NS1-Protein Varianten mit PKR

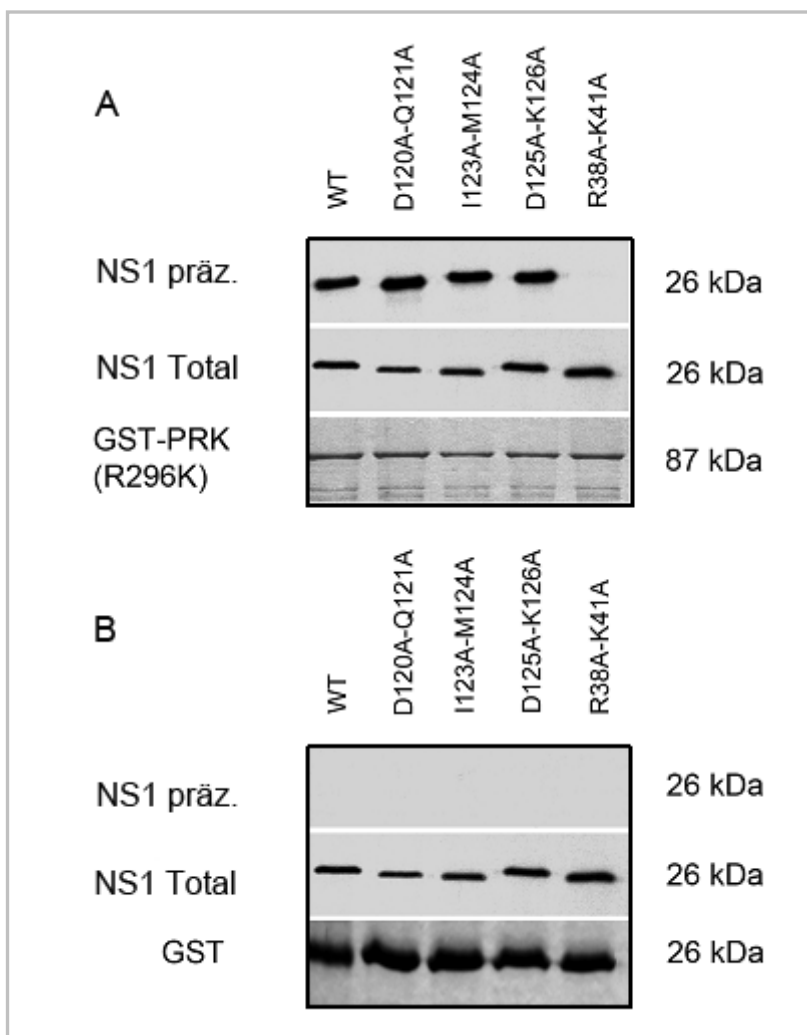
Um zu überprüfen, welcher der in der Literatur postulierten Mechanismen (dsRNA Sequestrierung oder direkte PKR Bindung) die Inhibition der PKR Aktivität durch das NS1 Protein des VN/1203 Virus bewirkt, wurde im Folgenden die Bindungsfähigkeit der verschiedenen NS1 Protein-Mutanten an PKR in einer GST-Kopräzipitation untersucht. Das für diese Studie verwendete PKR Konstrukt (Abbildung 3.20) war N-terminal an GST gekoppelt und enthielt die Aminosäuresubstitution K296R. Diese Mutation inaktiviert die Kinase-Aktivität der PKR, wodurch eine Überexpression in Bakterien ermöglicht wurde.



**Abb. 3.20: Schematische Abbildung des GST-PKR Fusionsproteins.** Abgebildet ist PKR mit den beiden dsRNA Bindungsdomänen (DRBD) sowie dem Linker und der Kinasedomäne. Zudem sind die Positionen des GST und der K296R Mutation angedeutet.

## Ergebnisse

Nach Aufreinigung des GST-PKR-Fusionsproteins aus dem Bakterienlysat wurde dieses an eine Glutathion-Sepharose-Matrix gekoppelt. Die NS1 Proteine hingegen wurden für diese Studie *in vitro* translatiert und gleichzeitig durch radioaktives S<sup>35</sup>-Methionin markiert. Im Folgenden inkubierten die NS1 Proteine in einem Ansatz mit dem an einer Glutathion-Sepharose-Matrix gekoppelten GST-PKR-Fusionsprotein. Abbildung 3.21A zeigt, dass mit Ausnahmen der NS1 R38A-K41A Protein-Mutante alle anderen NS1 Protein Variationen effizient mit dem GST-PKR-Fusionsprotein präzipitierten (NS1 präzipitiert, präz.). Der Nachweis einer gleichmäßigen eingesetzten A/NS1-Menge (NS1 Total) ist im Input (*in vitro*-translatierten A/NS1 Proteine) zu erkennen, ebenso eine einheitliche GST-PKR-Fusionsprotein-Expression. Um unspezifische Bindungen der *in vitro*-translatierten A/NS1 Proteine auszuschließen, erfolgte eine Präzipitationsuntersuchung der Proteine mit reinem GST. Die Abbildung 3.21B lässt erkennen, dass die einzelnen eingesetzten A/NS1 Proteine nicht unspezifisch mit GST interagierten. Diese Ergebnisse zeigten, dass die für eine direkte Interaktion des A/Udorn/72 NS1 Proteins mit PKR beschriebenen AS 123-124 bzw. 126 im NS1 Protein des VN/1203 Virus offensichtlich keine Rolle spielten.



**Abb. 3.21: GST-PKR Interaktionsstudie mit verschiedenen NS1 Protein Mutanten.** Bakteriell exprimiertes GST bzw. das GST-PKR-Fusionsprotein (R296K) wurden zusammen mit *in vitro* translatierten und radioaktiv markierten NS1 Proteinen in die Präzipitationsstudie eingesetzt. Präzipitation der NS1 Konstrukte mit A) dem GST-PKR (R296K) Fusionsprotein und B) mit GST.

### **3.3.4 Erzeugung rekombinanter Influenza VN/1203 Viren**

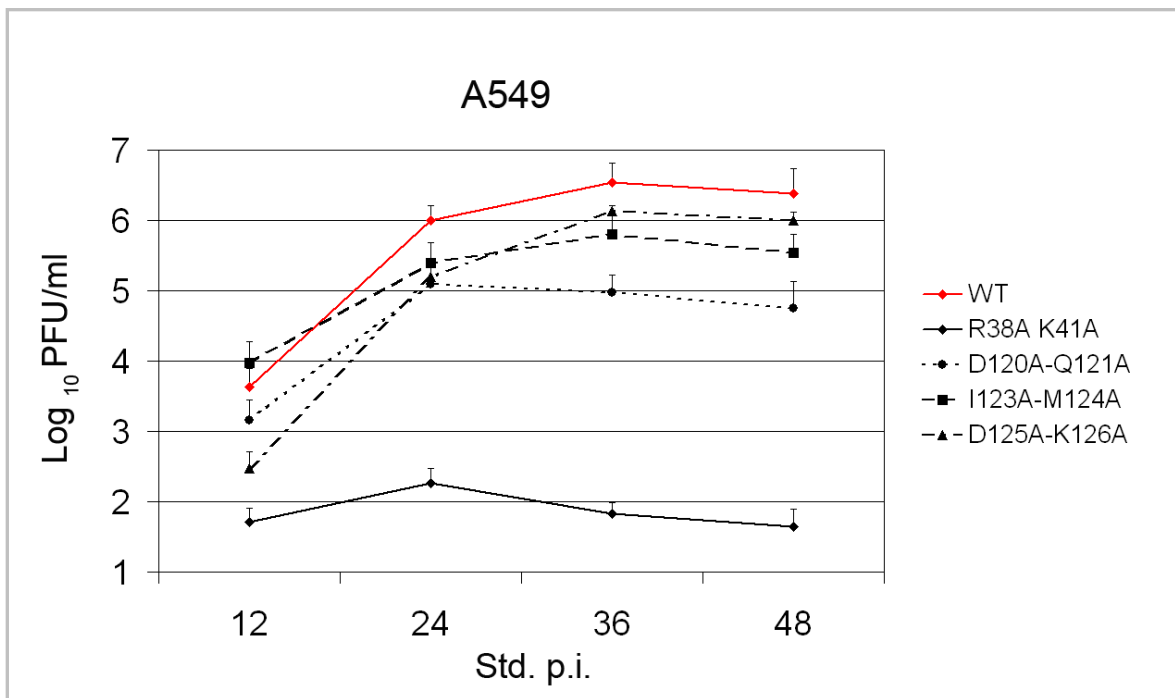
Weitere rekombinante Influenza VN/1203 Viren wurden generiert, um die Auswirkungen der jeweiligen Veränderungen im NS1 Protein auf die Virusreplikation und die Induktion von Phospho-PKR bei Infektion zu analysieren. Dementsprechend wurde das jeweilige pHW-VN-1203-NS Plasmid (pHW-VN-1203-NS-R38A-K41A, pHW-VN-1203-NS-D120A-Q121A, pHW-VN-1203-NS-I123A-M124A, pHW-VN-1203-NS-D125A-K126A) zusammen mit den übrigen sieben Plasmiden (pHW-VN-1203-HA, pHW-VN-1203-NA, pHW-VN-1203-PB2, pHW-VN-1203-PB1, pHW-VN-1203-PA, pHW-VN-1203-NP, pHW-VN-1203-M), die für das Influenza Genom kodieren, in humane 293T Zellen transfiziert und anschließend in 11-Tage-alten embryonierten Hühnereiern passagiert. Die Bestimmung der Stock Virustiter mittels Avicell-Plaque-Test zeigte, dass die Virustiter der R38A-K41A und D120A-Q121A Mutanten mit  $5,66 \times 10^5$  PFU/ml bzw.  $1,7 \times 10^6$  PFU/ml unter dem für das WT Virus erreichten Titer von  $6,25 \times 10^7$  PFU/ml lagen. Dies lässt ein attenuiertes Viruswachstum dieser Mutanten vermuten. Um sicherzustellen, dass nur die gewünschten Mutationen im NS1 Protein der rekombinanten Viren vorhanden waren, wurde von jedem angefertigten Virusstock die virale RNA aus der Allantoisflüssigkeit isoliert, revers-transkribiert und die cDNA des NS Segments mittels spezifischer Primer sequenziert.

### **3.3.5 Multizyklische Replikationsanalyse auf humanen, murinen und aviären Zellen**

Zur Charakterisierung der Virusmutanten R38A-K41A, D120A-Q121A, I123A-M124A und D125A-K126A wurde zunächst untersucht, wie diese im Vergleich zum WT Virus in humanen A549 Epithelzellen replizieren. Die Zellen wurden mit einer  $MOI=0,001$  infiziert, um eine multizyklische Replikation bis 48 Std. p.i. untersuchen zu können. Alle 12 Std. p.i. wurden Proben vom Überstand entnommen und durch das gleiche Volumen an Infektionsmedium ersetzt. Die im Überstand enthaltenen Viren wurden mittels Avicell-Plaque-Test im Doppelansatz getitert. Die Analyse der Virustiter (Abbildung 3.22) zeigte, dass die R38A-K41A Virusmutante stark in ihrer Replikationsfähigkeit eingeschränkt war und sich im Vergleich zum WT um ca. 5 Log-Stufen schwächer vermehrte. Die bei Produktion des Virusstocks beobachtete Attenuierung in 11-Tage-alten Bruteiern hingegen betrug auf A549 Zellen im Vergleich zum WT nur ca. 2 Log-Stufen. Betrachtet man die Vermehrung der Virusmutanten mit Veränderungen im Bereich der Aminosäurepositionen 120-126, zeigte sich, dass hierbei die Replikation der D120A-Q121A Mutante im Vergleich zum WT um ca. 2 Log-Stufen vermindert war. Die



Virusmutanten I123A-M124A und D125A-K126A replizierten im Vergleich zum WT um 1 bzw. 0,5 Log-Stufe niedriger.

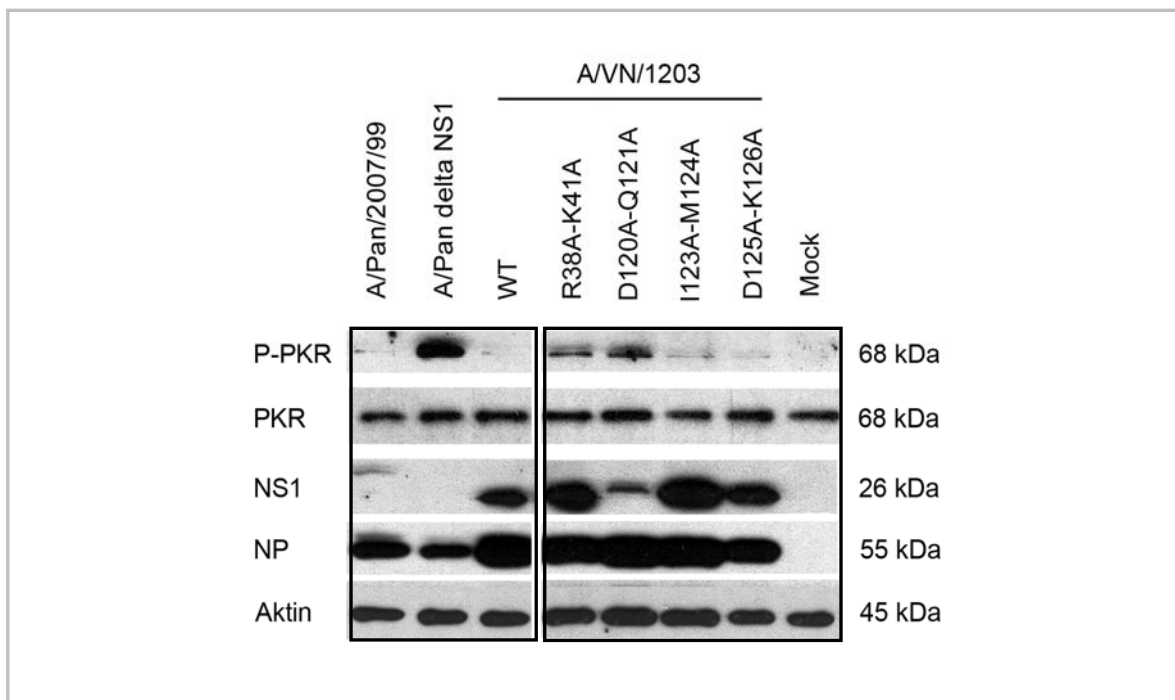


**Abb. 3.22: Replikationsanalyse auf humanen A549 Epithelzellen.** Humane A549 Epithelzellen wurden mit einer MOI=0,001 mit den rekombinanten VN/1203 - WT, -R38A-K41A, -D120A-Q121A, -I123A-M124A oder -D125A-K126A infiziert. 12, 24, 36 und 48 Std. p.i. wurde Zellkulturüberstand entnommen. Der Titer der darin enthaltenen Viren wurde mittels Avicell-Plaque-Test auf MDCKII-Zellen bestimmt. Abgebildet sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils einem biologischen Duplikat. Fehlerbalken geben die SEM an.

### 3.3.6 Nachweis von Phospho-PKR in infizierten A549 Epithelzellen

Im Weiteren wurde untersucht, ob die unterschiedlich verlaufenden Replikationskurven der verschiedenen Virusmutanten durch eine Aktivierung von PKR (Phosphorylierung von PKR zu P-PKR) zu erklären ist. Dazu wurden humane A549 Epithelzellen mit einer MOI=1 mit den entsprechenden Viren infiziert. 16 Std. nach Infektion wurden die Zellen mittels RIPA Puffer lysiert und die Zelllysate im Immunoblot auf Phospho-PKR analysiert. Neben den zu untersuchenden VN/1203 Viren wurden als Kontrollen auch das saisonale H3N2 A/Panama/2007/99 Influenza Virus und eine A/Panama Virusmutante, die kein NS1 mehr exprimiert (A/Pan ΔNS1), verwendet. Die Immunoblot Analyse in Abbildung 3.22 zeigt, dass es bei Infektion mit dem saisonalen A/Panama/2007/99 Virus zu keiner Phosphorylierung von PKR kam, während die Infektion mit A/Pan ΔNS1 eine starke Phosphorylierung zur Folge hatte (Abbildung 3.23). Nach Infektion mit den Influenza VN/1203-R38A-K41A oder VN/1203-D120A-Q121A Viren konnte ebenfalls eine

Phosphorylierung von PKR nachgewiesen werden, während dies bei einer Infektion mit WT-Virus oder den Virusmutanten I123A-M124A und D125A-K126A nicht der Fall war. Für den Nachweis der NS1 Proteine im Immunoblot wurde ein polyklonaler Kaninchen Anti-GST-A/NS1-Antikörper verwendet, der gegen das NS1 Protein des Influenza A/PR8 gemacht war. Dieser erkennt das NS1 Protein des A/Pan/2007/99 Virus nur schlecht, wodurch die schwache Bande in Abbildung 3.22 zu erklären ist. Dagegen stellt sich für die VN/1203-NS1 Mutante D120A-Q121A die Frage, ob diese schwächer exprimiert wurde oder durch das Kaninchen Serum nur schlecht zu detektieren war.

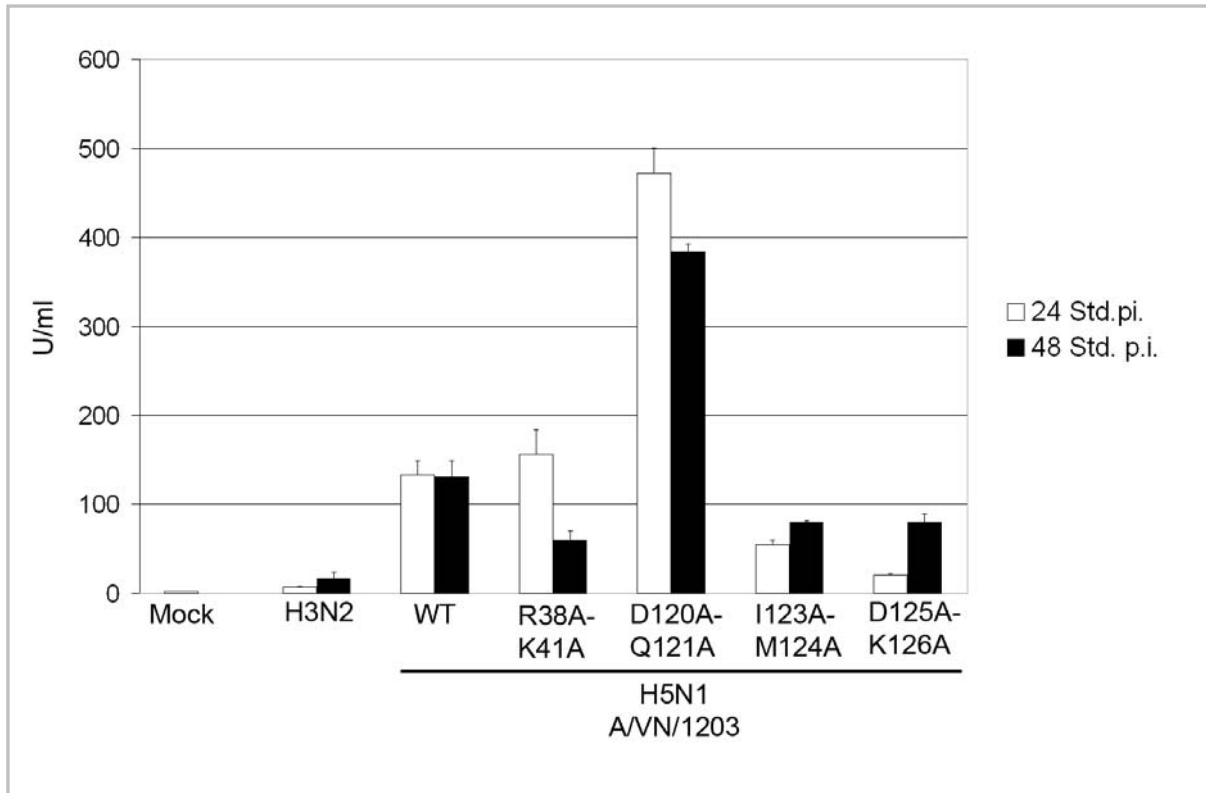


**Abb. 3.23: Nachweis von P-PKR in infizierten A549 Zellen.** Humane A549 Epithelzellen wurden mit den Viren A/Panama/2007/99, A/Panama  $\Delta$ NS1 (delta NS1), VN/1203- WT, -R38A-K41A, -D120A-Q121A, -I123A-M124A oder -D125A-K126A mit einer MOI=1 infiziert. 16 Std p.i. wurden die Zellen mittels RIPA Puffer lysiert und das Zelllysate mittels Immunoblot Analyse auf die Expression von P-PKR, PKR, NS1, NP und Aktin hin untersucht.

### 3.3.7 Analyse der IFN- $\beta$ Sekretion in infizierten A549 Zellen

Da es sich bei PKR um eine durch Typ I IFN induzierbare Kinase handelt (siehe Abschnitt 1.6), wurde im Folgenden auch überprüft, welche Konzentrationen an IFN- $\beta$  im Laufe der Infektion von infizierten Zellen sekretiert werden. Dazu wurden die Zellen mit einer MOI=0,01 der verschiedenen Virus Mutanten infiziert und die Proben entsprechend Kapitel 3.2.7 nach 24 und 48 Std. durch einen IFN- $\beta$  ELISA Test gemessen. Der Test zeigte, dass eine Infektion mit der D120A-Q121A Mutante zur stärksten gemessenen Sekretion von IFN- $\beta$  führte. Diese war im Vergleich zu A/Pan/2007/99 67-fach höher und

3-fach höher als beim VN/1203 WT (Abbildung 3.24). Die Menge an IFN- $\beta$  in den mit R38A-K41A Virus infizierten Zellen war im Vergleich zu VN/1203-WT hingegen nur minimal erhöht und bedingt durch die abfallenden Virustiter 48 Std. p.i. bereits vermindert.

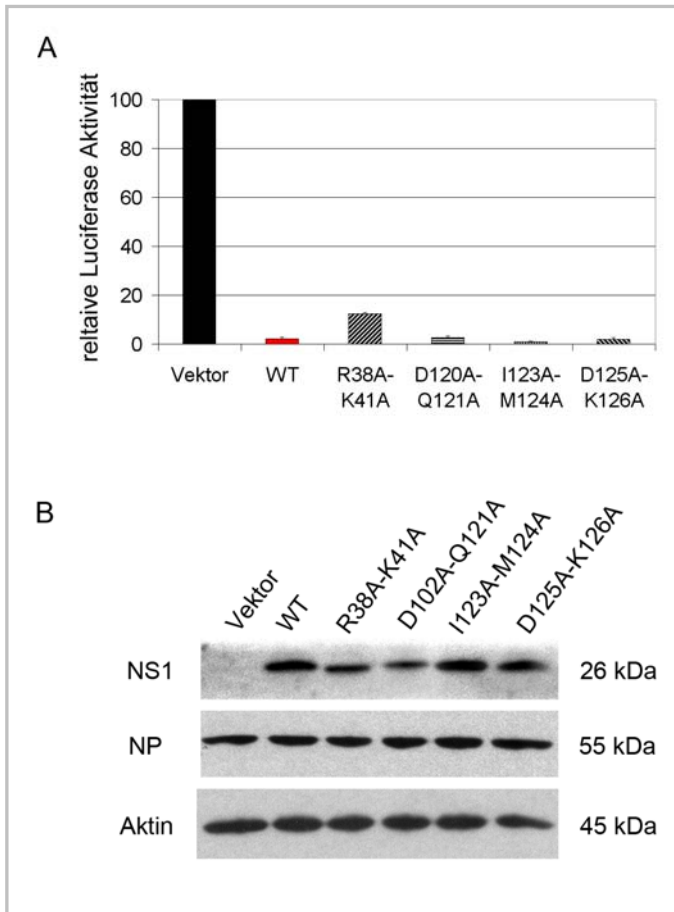


**Abb. 3.24: Analyse der IFN- $\beta$  Sekretion von infizierten A549 Zellen.** Humane A549 Epithelzellen wurden mit rekombinanten H5N1 Influenza VN/1203-WT, -R38A-K41A, -D120A-Q121A, -I123A-M124A oder -D125A-K126A Viren oder dem Influenza A/Pan/2007/99 Virus mit einer MOI=0,01 infiziert. 24 und 48 Std. p.i. wurden Aliquots der Zellkulturüberstände entnommen und diese mittels ELISA auf ihren Gehalt an IFN- $\beta$  hin untersucht. Fehlerbalken geben die SEM an.

### 3.3.8 Die Inhibition der Virus-vermittelten Aktivierung des IFN- $\beta$ Promotors ist bei der R38A-K41A NS1 Mutante leicht reduziert

Da die verschiedenen rekombinanten Viren eine unterschiedlich starke Sekretion von IFN- $\beta$  in infizierten Zellen induzierten (Abschnitt 3.3.7), wurde in einem weiteren Experiment analysiert, ob die verschiedenen Mutationen (R38A-K41A, -D120A-Q121A, -I123A-M124A oder -D125A-K126A) die Fähigkeit des NS1 Proteins beeinflussen, die IFN-Induktion zu inhibieren. Dazu wurde in MDCKII Zellen neben dem IFN- $\beta$  Reporter gen das jeweilige A/NS1 Protein von VN/1203 koexprimiert und die Zellen anschließend mit A/PR8/ $\Delta$ NS1 Virus infiziert (Abbildung 3.25). Als Kontrolle wurde der Leervektor pHW2000 zusammen mit dem IFN- $\beta$  Reporter gen koexprimiert. Die Expression des VN/1203 WT NS1 Proteins konnte hier die Promotoraktivierung, die durch das A/PR8/ $\Delta$ NS1 Virus induziert wurde,

fast vollständig inhibieren. Eine ähnlich starke Inhibition wurde durch die Koexpression der Mutanten D120A-Q121A, I123A-M124A und D125A-K126A erreicht. Die NS1 Mutation D120A-Q121A sollte somit in der Lage sein, die Induktion von IFN- $\beta$  im gleichen Maße wie das WT NS1 Protein zu inhibieren. Die R38A-K41A Mutante hingegen zeigt im Vergleich zum WT eine leicht erhöhte Induktion des IFN- $\beta$  Promotors. In Abbildung 3.25B wurde mittels Immunoblot Analyse die Expression der jeweiligen NS1 Proteine sowie die Infektion mit dem A/PR8/ $\Delta$ NS1 Virus (NP) nachgewiesen.



**Abb. 3.25: Funktionelle Analyse der NS1 Proteine im IFN- $\beta$  Luciferase-Reportertest.** A) MDCKII Zellen wurden mit dem IFN- $\beta$  Promotor –Luciferase Reporterplasmid p125-Luc und den Expressionsplasmiden für VN/1203/NS1 -WT, -R38A-K41A, -D120A-Q121A, -I123A-M124A oder -D125A-K126A oder dem Leervektor (pHW2000) transfiziert. Als interne Kontrolle wurde zudem in allen Ansätzen zur späteren Normalisierung das Plasmid pRL-TK-Luc kotransfiziert, das für die *Renilla* Luciferase unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors kodiert. 24 Std. nach Transfektion wurden die Zellen durch Infektion mit A/PR8  $\Delta$ NS1 Virus (MOI=1) stimuliert. Die Luciferase Aktivität im Zellextrakt wurde 8 Std. p.i. bestimmt. Der Wert für die Virus-induzierte Erhöhung in Vektor transfizierten Zellen wurde auf 100% gesetzt und mit der Erhöhung in NS1-exprimierenden Zellen verglichen. B) Nachweis der Virus Infektion und Expressionskontrolle der transfizierten NS1 Konstrukte mittels Immunoblot. Fehlerbalken geben die SEM an

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass das NS1 Protein des VN/1203 Virus die Aktivierung der PKR vorwiegend durch seine RNA-Bindungsdomäne (R38-K41) inhibiert, da die NS1-Mutante R38A-K41A *in vitro* nicht mehr mit PKR präzipitierte, diese in infizierten Zellen nicht inhibierte und die entsprechende Virusmutante stark in ihrer Replikation eingeschränkt war. Die für die NS1-Mutante D120A-Q121A in Abbildung 3.23 gezeigte Phosphorylierung von PKR hingegen könnte durch das Zusammenspiel der extrem erhöhten IFN- $\beta$  Konzentration und der reduzierten Menge von NS1 D120A-Q121A während der Infektion verursacht werden.

## 4. Diskussion

### 4.1 Übersicht über die Ziele der Arbeit

Die durch Influenza A Viren des Subtyps H5N1 verursachten Infektionen zeichnen sich durch schwere Atemwegserkrankungen und hohe Mortalitätsraten von ca. 60% aus. Wenngleich die bisherige Transmission dieser Viren von Mensch-zu-Mensch sehr ineffizient verläuft, besteht doch die Gefahr, dass sie diese Fähigkeit zukünftig erlangen könnten und es so zur weiteren Ausbreitung kommen könnte.

Um neue Therapieansätze entwickeln zu können, ist das Verständnis der Mechanismen essentiell, die zur hohen Virulenz der H5N1 Influenza Viren führen. Im Infektionsverlauf von Influenza Viren spielt das NS1 Protein als multifunktionaler Virulenzfaktor eine wichtige Rolle, in dem es u. a. die angeborene Immunantwort der Wirtszelle antagonisiert. Die Funktionen des NS1 Proteins werden durch zelluläre Interaktionspartner vermittelt. Auf Seiten des NS1 Proteins kommen diese Interaktionen entweder durch die N-terminale RNA-Bindedomäne oder die C-terminale Protein-Protein-Interaktionsdomäne zu Stande. Bis heute sind daher diverse NS1-Interaktionspartner beschrieben und diskutiert (Abbildung 1.8) (Hale *et al.* 2008a).

Wenngleich viele Funktionen von A/NS1 Proteinen zwischen verschiedenen Stämmen konserviert sind, so gibt es doch stammspezifische Eigenschaften, die nur im homogenen Virushintergrund zur Geltung kommen. Ziel dieser Arbeit war es daher, im „natürlichen“ Hintergrund des VN/1203-Virus (H5N1) zwei Eigenschaften des NS1 Proteins zu untersuchen. Hierbei sollte im ersten Teil dieser Arbeit der Einfluss eines C-terminalen PDZ-Liganden (PL) Motivs auf die Virulenz dieses H5N1 Isolates charakterisiert werden und im zweiten Teil die Interaktion dieses NS1 Proteins mit der dsRNA-abhängigen Kinase R (PKR), die für den Aufbau des antiviralen Status der Wirtszelle wichtig ist, untersucht werden.

### 4.2 Das C-terminale PDZ-Liganden Motiv des NS1 Proteins wirkt nicht als Virulenzdeterminante eines H5N1 Influenza Virus

Kürzlich zeigten Sequenzanalysen aviärer Influenza Viren, dass die C-terminalen vier Aminosäuren (ESEV) mit der Konsensussequenz zellulärer PL Motive übereinstimmen (Obenauer *et al.*, 2006). Bei PL Motiven handelt es sich um kurze interne oder C-terminale Sequenzen, die sequenzabhängig von zellulären PDZ Domänen erkannt werden. Diese wiederum sind modular aufgebaute Protein-Protein Interaktionsdomänen, die die Bildung von Proteinkomplexen ermöglichen und in unterschiedlichen Organismen

wie Pflanzen, Bakterien, Hefen, Metazoa und Drosophila vorkommen. Dementsprechend kommen PDZ Domänen in einer Vielzahl zellulärer Proteine vor, die vor allem in zellulären Signalwegen und dem Aufbau und Erhalt von Zellpolarität beteiligt sind (Harris und Lim 2001; Hung und Sheng 2002). Während das ESEV Motiv in aviären Influenza Viren hoch konserviert ist, findet sich in humanen saisonalen Isolaten vorwiegend die Aminosäuresequenz RSKV. Obenauer und Kollegen (Obenauer *et al.*, 2006) zeigten zudem in einem *in vitro* Bindungstest, dass von zwei exemplarisch ausgewählten NS1 Proteinen (ein aviäres H6N1 und ein humanes H3N2 NS1 Protein) nur das aviäre NS1 Protein in der Lage ist, *in vitro* an bis zu 30 verschiedene humane PDZ Domänen zu binden. Sie postulierten daher, dass die Gegenwart eines aviären NS1 Proteins in der Wirtszelle zur Blockierung diverser zellulärer Signalwege führen und somit als Virulenzdeterminante zur hohen Pathogenität beitragen könnte. Wenngleich ein erster Einfluss auf die Virulenz des Maus-adaptierten Influenza A/WSN/33 Virus (H1N1) von Jackson und Kollegen gezeigt werden konnte (Jackson *et al.* 2008), so blieb jedoch die Frage offen, ob dieses Motiv auch zur Virulenz eines hoch-pathogenen H5N1 Virus beiträgt.

Die Untersuchungen zum ersten Teil dieser Arbeit, der „Charakterisierung des Einflusses des PL Motivs auf die Virulenz des VN/1203 Virus“ ließen sich daher in drei Schwerpunkte einteilen:

1. Charakterisierung des Einflusses der NS1 Mutanten VN/1203-ESEV und -RSKV auf die virale Replikation in humaner, muriner und aviärer Zellkultur im Vergleich zum WT
2. Analyse der Antagonisierung von IFN- $\beta$  durch VN/1203 NS1 Proteine im Vergleich zu einem saisonalen Isolat
3. Bestimmung der Virulenz der rekombinanten VN/1203-WT, -ESEV und -RSKV Viren in der Maus und dem Huhn

### **4.2.1 Charakterisierung des Einflusses der NS1 Mutanten VN/1203-ESEV und -RSKV auf die virale Replikation in humaner, muriner und aviärer Zellkultur im Vergleich zum WT**

Das NS1 Protein des VN/1203 Virus weist, wie schon in Abschnitt 1.9 beschrieben, eine C-terminale Verkürzung um 10 Aminosäuren auf. Um den Einfluss des „aviären“ ESEV und des „humanen“ RSKV Motivs auf die virale Replikation studieren zu können, wurden zunächst NS1 Mutanten durch zielgerichtete Mutagenese generiert. Hierbei genügte die

einfache Substitution einer Base, um das Stoppcodon aufzuheben und somit den C-Terminus zu rekonstituieren. Die entstandene NS1 Mutante endete dabei „natürlich“ auf die „aviäre“ Sequenz ESEV (Abbildung 3.2). Basierend auf dieser NS1 Variante wurden in einem weiteren Schritt die Aminosäuren ESEV zu RSKV substituiert. Dementsprechend unterscheiden sich beide Mutanten sowohl in der Länge als auch in der Sequenz der vier C-terminalen Aminosäuren vom WT NS1 Protein. Während die Rekonstitution des C-Terminus bei der NS1-ESEV-Variante zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz des NEP/NS2 führte, resultierte die Substitution der Aminosäuren E222R bei der NS1-RSKV-Variante zwangsweise in der Veränderung S70G im NEP/NS2 Protein des RSKV-Plasmids.

Nach Generierung rekombinanter Viren, die sich nur im NS-Segment von einander unterschieden, wurden diese hinsichtlich ihrer Replikationsfähigkeit auf humanen alveolaren A549 Epithelzellen, murinen NIH 3T3 Fibroblasten, und Hühnerembryo-Fibroblasten charakterisiert. Auf allen Zellen wuchs das rekombinante WT Virus im Vergleich zu den Mutanten zu höchsten Titern. Interessanterweise war das ESEV Virus im Vergleich zum rekombinanten WT und dem RSKV Virus sowohl auf humaner, als auch auf muriner Zellkultur attenuiert. Die Ursache für diese Attenuierung ist hierbei vermutlich im ESEV Motiv zu sehen und nicht in der Verlängerung des NS1 C-Terminus begründet, da bei dem RSKV Virus, dessen C-Terminus ebenfalls rekonstituiert wurde, lediglich eine zeitliche Verzögerung der Virusreplikation zu beobachten war. Da keine Unterschiede zwischen den drei Viren hinsichtlich der Virusreplikation in Hühnerzellen detektiert werden konnten, bleibt zu vermuten, dass das NS1 Protein des ESEV Virus möglicherweise durch das PL Motiv mit säugerspezifischen Faktoren interagiert, welche die Virusreplikation zumindest im Hintergrund des VN/1203 Virus in Zellkultur hemmen. Die für das RSKV Virus im Vergleich zum WT beobachtete zeitliche Verzögerung der Virusreplikation hingegen könnte entweder mit dem rekonstituierten C-Terminus zusammenhängen, da das „humane“ RSKV Motiv nach Obenauer und Kollegen kaum eine Bindung an humane PDZ Domänen vermittelte (Obenauer *et al.* 2006), oder aber durch die im NEP/NS2 Protein gelegene Substitution S70G verursacht worden sein.

Um zu überprüfen, ob die Substitution im NEP/NS2 Protein einen Einfluss auf den Transport von vRNPs hatte, wurde die intrazelluläre Lokalisation des NP Proteins während der Infektion untersucht. Hierbei zeigte sich für alle drei Virusvarianten, dass das NP Protein während eines Infektionszyklus zu frühen Zeitpunkten im Kern akkumulierte und im weiteren Verlauf in das Zytoplasma transportiert wurde (Daten nicht gezeigt), so



dass davon auszugehen ist, dass die Funktionen des NEP/NS2 Proteins nicht beeinträchtigt sind. Zusammengefasst stehen diese Ergebnisse im Gegensatz zu Daten von Jackson und Kollegen, die keinen Einfluss des ESEV und RSKV Motivs auf die Replikationsfähigkeit ihrer mutierten A/WSN/33-Viren fanden (Jackson *et al.* 2008). Die Analysen der viralen Proteinexpression jedenfalls zeigten keine erkennbaren Veränderungen der Expressionsrate, weder hinsichtlich des Zeitpunkts, zu dem die Proteine exprimiert wurden, noch der Menge an Protein, die produziert wurde (Abbildung 3.4). Einzig die intrazelluläre Lokalisation des NS1 Proteins wies leichte Unterschiede in humanen A549 Zellen auf, die so nicht in primären Hühnerembryo-Fibroblasten zu beobachten waren (Abbildung 3.6). Vorstellbar ist, dass eine mögliche Interaktion des ESEV Motivs mit einem PDZ enthaltenden Protein für die partielle Retention des NS1 Proteins im Zellkern verantwortlich sein könnte. Analysiert man die von Obenauer und Kollegen identifizierte PDZ enthaltenden Proteine hinsichtlich ihrer zellulären Lokalisation, so könnte es sich hierbei zum Beispiel um LIMK2 handeln, für das eine nukleäre und nukleoläre Lokalisation beschrieben wurde (Goyal *et al.* 2006). Letzendlich bleibt der entsprechende Bindungspartner hierfür jedoch noch aufzuklären. Die Funktionen der unterschiedlichen PDZ enthaltenden Proteine aus der Studie von Obenauer und Kollegen werden in 4.2.3 ausführlicher beschrieben.

### **4.2.2 Analyse der Antagonisierung von IFN- $\beta$ durch VN/1203 NS1 Proteine im Vergleich zu einem saisonalen Isolat**

Um die beobachteten Unterschiede weiter zu charakterisieren, wurden die drei NS1 Varianten hinsichtlich ihrer primären Funktion, der Antagonisierung der Typ I IFN Antwort, untersucht. Hierzu wurde getestet, ob und wie gut die verschiedenen VN/1203 NS1 Proteine im Vergleich zu einem saisonalen NS1 Protein die Aktivierung eines IFN- $\beta$  Promotors *in vitro* in einem Luziferase-Reportertest inhibieren können. Abbildung 3.7 zeigt, dass alle NS1 Proteine die Aktivierung ähnlich gut inhibieren konnten und dementsprechend diese Funktion nicht durch die Aminosäuren des C-Terminus beeinflusst wurde. Zudem wurde die „*in vivo*“ Situation während der Replikation in Zellkultur untersucht, indem die Konzentration sekretierten IFN- $\beta$  im Überstand infizierter Zellen gemessen wurde. Während das saisonale Virus in der Lage war, die Sekretion von IFN- $\beta$  effizient während der Infektion zu inhibieren, kam es bei Infektion mit VN/1203 Viren zur Ausschüttung großer Mengen IFN- $\beta$  (Abbildung 3.8). Diese Ergebnisse stimmen mit vorherigen Studien überein, welche zeigten, dass eine H5N1 Infektion im Vergleich zu einer Infektion mit saisonalen Influenza Viren zu einer starken Induktion des IFN- $\beta$  in

primären humanen Makrophagen (Cheung *et al.* 2002; Hui *et al.* 2009), bronchialen Epithelzellen (Chan *et al.* 2005) und primären HUVEC Zellen (Schmolke *et al.* 2009) führte.

Die im Vergleich zum WT und RSKV Virus niedrigeren Mengen sekretierten IFN- $\beta$  in den Überständen ESEV Virus infizierter Zellen sind vermutlich eher auf niedrigere Virustiter 24 und 48 Std p.i. zurückzuführen (Abbildung 3.3), als auf eine verbesserte Inhibition der IFN- $\beta$  Induktion. D.h. diese Zellen sekretierten vermutlich weniger IFN- $\beta$ , da weniger vRNAs vorlagen, wodurch es zu einer schwächeren Aktivierung des RIG-I Signalweges kam und in Folge dessen weniger IFN- $\beta$  induziert und sekretiert wurde (Abbildung 1.11). Bisher konnte nicht geklärt werden, warum H5N1 Viren während der Infektion nicht in der Lage sind, die Induktion des IFN- $\beta$  zu inhibieren, bzw. warum die hohen Mengen an IFN- $\beta$  nicht zu einer drastischen Reduktion der Virusreplikation führen. Bisher wurde daher vermutet, dass H5N1 und saisonale Influenza Viren die Typ I IFN Antwort durch unterschiedliche Signalwege aktivieren. Jedoch deuten weitere Untersuchungen der unserer Arbeitsgruppe an, dass die Unterschiede zwischen saisonalen und H5N1 Influenza Viren nicht durch unterschiedliche Signalwege zu erklären sind, sondern vermutlich eher durch eine unterschiedlich starke Aktivierung des RIG-I Signalweges zu Stande kommen.

### **4.2.3 Bestimmung der Virulenz der rekombinanten VN/1203-WT, -ESEV und -RSKV Viren in der Maus und dem Huhn**

Für die Untersuchung von Pathogen-Wirt-Interaktionen während der Infektion werden oft Studien in immortalisierten Kulturzellen als Model-System durchgeführt. Dieses System spiegelt jedoch nicht die *in vivo* Situation eines Wirtsorganismus hinsichtlich der Komplexität der verschiedenen Zelltypen und der Immunantwort wider. So ist letztendlich die Frage, ob das ESEV-Motiv einen Einfluss auf die Virulenz des Virus im entsprechenden Wirt hat, nur mittels Tierversuch zu klären.

Die Bestimmung der Virulenz in der Maus und dem Huhn zeigte nur geringfügige Unterschiede zwischen den drei rekombinanten Viren. In beiden Spezies waren alle drei VN/1203 Viren hoch-pathogen, was teilweise durch die multibasische Spaltstelle im HA (Abschnitt 1.4.1) zu erklären ist. Um auch geringe Unterschiede in der Pathogenität dieser Viren in der Maus feststellen zu können, wurden diese mit einer niedrigen, aber noch letalen Dosis (5PFU) infiziert. Das WT Virus schien hierbei etwas virulenter als die ESEV und RSKV Viren zu sein. Jedoch konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich Virusverbreitung und Viruslast in den verschiedenen Mausorganen festgestellt werden.

Entsprechend den Vorgaben der für Tierversuche zuständigen Behörde (Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo)) mussten die Mäuse bei Verlust von 20% des ursprünglichen Körpergewichts oder bei entsprechend schweren Krankheitssymptomen euthanasiert werden. Es sei darauf hingewiesen, dass vergleichende Studien aus anderen Ländern ihre Tiere erst bei 30% Verlust des Körpergewichts euthanasieren und es somit zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen kann. Vergleicht man die Virustiter der Mausorgane mit den Ergebnissen der Virusreplikation auf muriner Zellkultur, ist festzustellen, dass das ESEV Virus in der Maus keine erkennbare Attenuierung zeigt. Dies könnte zwei Ursachen haben. Zum einen könnte in Zellkultur ein Faktor fehlen, der für die virale Replikation wichtig ist, wodurch das Wachstum auf muriner Zellkultur limitiert ist. Zum anderen könnte ein Faktor existieren, der die virale Replikation limitiert, jedoch im komplexen Model eines Organismus vom Virus umgangen oder aber inhibiert werden kann. Im Gegensatz zu zuvor publizierten Daten (Jackson *et al.* 2008) führte das ESEV Virus im Vergleich zum WT und RSKV Virus zu keiner erhöhten Lungenpathologie. In allen Fällen konnte Virusantigen über die ganze Lunge verteilt nachgewiesen werden (Abbildung 3.12).

Die Infektion von Hühnern zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Viren. So belegte die Bestimmung des intravenösen Pathogenitäts-Index (IVPI) entsprechend des OIE Standard Protokolls (OIE, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for terrestrial animals, 2008), dass alle drei Viren hoch-pathogen sind (IVPI: WT = 3,00 ESEV = 3,00 RSKV = 2,99). Der IVPI gibt den Mittelwert der klinischen Einstufung von intravenös infizierten zehn 6-Wochen-alten Hühnern an. Viren werden als hoch-pathogen bezeichnet, wenn ihr IVPI größer als 1,2 nach 10 Tagen Beobachtung ist. Dabei werden die Hühner wie folgt eingestuft: 0 [gesund], 1 [krank], 2 [schwer krank] und 3 [tot]. Auch die oronasale Infektion von Hühnern bestätigte diese Ergebnisse. Wenngleich in diesem Versuch zwei Hühner überlebten, so zeigte sich in der Auswertung der Rachen- und Kloaken-Tupfer, die auf virale RNA mittels *real time* RT PCR untersucht wurden, dass diese Tiere nicht erfolgreich infiziert wurden.

Weitere Versuche unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass die Substitution der multibasischen Spaltstelle im HA Protein zu einer monobasischen Spaltstelle ausreichte, um das VN/1203 Virus im Huhn vollständig zu attenuieren, so dass bei intravenöser Infektion alle Hühner überlebten.

#### 4.2.4 Zusammenfassung der ersten Fragestellung

Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass das „aviäre“ ESEV Motiv am C-Terminus des NS1 Proteins keinen signifikanten Einfluss auf die Virulenz des hochpathogenen H5N1 VN/1203 Virus hat, jedoch die Replikationseigenschaften in humanen und murinen Zellen beeinflusst. Diese Ergebnisse stimmen daher mit dem Befund einer bioinformatischen Studie von Lycett und Kollegen überein, die keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Virulenz in Säugern und dem PL Motiv ESEV des NS1 Proteins fanden (Lycett *et al.* 2009).

Im Gegensatz zu den für VN/1203 beschriebenen Daten zeigten Jackson und Kollegen hingegen, dass die Einführung des ESEV Motivs im Hintergrund des Maus-adaptierten A/WSN/33 Virus keinen Einfluss auf die Virusreplikation in MDCK Zellen hat, jedoch die Virulenz dieser Viren in der Maus erhöht (Jackson *et al.* 2008). Es besteht daher die Möglichkeit, dass das ESEV Motiv im NS1 Protein die virale Pathogenität in Abhängigkeit des Virusstamms und des Wirts moduliert.

Eine Recherche in der SMART Datenbank (Letunic *et al.* 2009) nach PDZ enthaltenden Proteinen ergibt für den Menschen 214 und für das Huhn (*Gallus gallus domesticus*) bisher 168 Treffer PDZ enthaltender Proteine. PDZ Domänen sind in der Lage, sequenzspezifisch Protein-Protein Interaktionen zu vermitteln. Daher spielen PDZ Domänen enthaltende Proteine u. a. eine wichtige Rolle im zielgerichteten Transport von Proteinen zu spezifischen Membrankomponenten, dem Aufbau von supramolekularen Proteinkomplexen sowie der Entstehung von Zellpolarität (Hung und Sheng 2002; Spaller 2006). PDZ Domänen können dabei hinsichtlich ihrer Bindungsspezifität variieren und verschiedene Klassen von PL Motiven binden (Hung und Sheng 2002). Zudem kann die Bindung eines einzelnen PL Motivs zu verschiedenen PDZ Domänen unterschiedlich reguliert werden. Es ist daher wahrscheinlich, dass die zeitliche und räumliche Organisation PDZ basierter Interaktionen durch intrazelluläre und extrazelluläre Signale reguliert wird (Hung und Sheng 2002). Zudem konnten verschiedene Studien zeigen, dass nicht nur die 4 C-terminalen Aminosäuren an der spezifischen PDZ Bindung beteiligt sind, sondern auch die 5 davorliegenden Aminosäuren diese Bindung beeinflussen (Songyang *et al.* 1997; Niethammer *et al.* 1998; Kozlov *et al.* 2000).

Die in der Studie von Obenauer und Kollegen identifizierten humanen PDZ-Domänen enthaltenden Proteine geben einen ersten Hinweis auf mögliche zelluläre Bindungspartner des NS1 Proteins. Die hierbei identifizierten Proteine variieren hinsichtlich ihrer Funktionen in der Zelle und können entsprechend der NCBI Gene Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) verschiedene Namen bzw. Abkürzungen

tragen. Im Folgenden sind einige humane PDZ-Domänen enthaltende Proteine aufgelistet, die in der Studie von Obenauer und Kollegen durch das aviäre NS1 gebunden wurden (Tabelle 4.1).

**Tab. 4.1: Humane PDZ –Domänen enthaltende Proteine aus Obenauer *et al.*, 2006**

<b>Protein</b>	<b>Synonym</b>	<b>Protein ID</b>	<b>GeneID:</b>
X11L2;	Mint3; APBA3; MGC:15815;	NP_958817	9546
X11	Mint1; APBA1; X11A; D9S411E; X11ALPHA;	NP_000475	320
Rho guanine exchange factor 12	LARG; PRO2792; KIAA0382; DKFZp686O2372; ARHGEF12	NP_056128	23365
Human 36 kDa carboxyl terminal LIM domain protein	hCLIM1; PDLIM1; CLP36; CLP-36; CLIM1;	NP_066272	9124
Reversion-induced LIM protein	RIL; PDLIM4	NP_003676	8572
KIAA0613	PDLIM6; ZASP; CYPHER; ORACLE; ldb3z1; ldb3z4; FLJ35865; KIAA01613; LDB3	BAA31588	11155
Lim motif-containing protein kinase 2	LIMK2	NP_005560	3985
<b>MAGUK's</b>			
chapsyn-110	DLG2; PSD93; PSD-93; FLJ37266; MGC131811;KFZp781D1854; KFZp781E0954;	NP_001355	1740
Synapse-associated protein 102	DLG3; MRX; XLMR; MRX90; NEDLG; SAP102; KIAA1232;	NP_066943	1741
Brain-specific angiogenesis inhibitor associated protein	AIP3; BAP1; WWP3; BAIAP1; MAGI-1; TNRC19; MAGI1	NP_004733	9223
Membrane associated guanylate kinase-related	MAGI-3; MGC163281; dJ730K3.2; RP4-730K3.1; MAGI3	NP_690864	260425
Pals1-associated tight junction protein	Cipp; PATJ; FLJ26982; InaD-like; INADL,	AAM28433	10207
Scribble	CRIB1; SCRIB1; SCRIB1; Vartul; SCRIB	NP_056171	23513
Multiple PDZ domain protein	MUPP1; FLJ25909; FLJ34626; FLJ90240; DKFZp781P216; MPDZ	NP_003820	8777

Die von Obenauer und Kollegen als X11 und X11L2 beschriebenen Proteine sind unter anderem unter den Synonymen APBA1 und APBA3 bzw. Mint1 und Mint3 in der Literatur zu finden. Hierbei handelt es sich um Adapterproteine, die mit dem für die Alzheimer Krankheit verantwortlich gemachten *amyloid precursor* Protein (APP) interagieren sollen (Xie *et al.* 2005). Daneben wird dem als Mint3 beschriebenen Protein unter anderem eine regulatorische Funktion bei der Lokalisation von Furin im Trans-Golgi-Netzwerk

zugeordnet (Han *et al.* 2008). Sollte das NS1 Protein *in vivo* mit Mint3 interagieren und dadurch die intrazelluläre Lokalisation von Furin verändern, könnte dies die Effizienz der Spaltung des HA Proteins beeinflussen.

Eine weitere Gruppe von Proteinen (*Lim motif-containing protein kinase 2*, *Human 36 kDa carboxyl terminal LIM domain protein*, *Reversion-induced LIM protein* und KIAA0613 Protein), die in der Arbeit von Obenauer und Kollegen identifiziert wurden, enthalten neben PDZ Domänen auch so genannte LIM Domänen. Bei LIM Domänen handelt es sich um hoch-konservierte cysteinreiche Strukturen, die zwei Zink-Finger-Motive enthalten und Protein-Protein Interaktionen vermitteln. Die hier beschriebenen LIM und PDZ Domänen enthaltenden Proteine sowie der *Rho guanine exchange factor 12* regulieren die Zellproliferation entweder als Teil des RhoA Signalfweges zur Organisation des Aktin-Zytoskeletts (Shea *et al.* 2008; Aittaleb *et al.* 2009) oder durch direkte Interaktion mit Aktin bzw. Aktin-Stress-Fasern (Vallénus und Makela 2002; Vallénus *et al.* 2004). Für das Influenza NP Protein, das ein Bestandteil von vRNPs ist, wurde eine direkte Bindung an F-Aktin beschrieben (Digard *et al.* 1999). Sollte sich *in vivo* eine Interaktion des Influenza NS1 Proteins mit den zellulären Aktinzytoskelett-modulierenden Proteinen bestätigen, könnte dies einen wesentlichen Einfluss auf den Transport von vRNPs aus dem Kern in das Zytoplasma haben.

Des Weiteren finden sich in der Liste von Obenauer und Kollegen 4 von 24 im humanen Genom beschriebene Proteine der MAGUK (Membran-assoziierte-Guanylat-Kinase) Familie: *Synapse-associated protein 102*, *Channel-associated protein of synapse-110* (Chapsyn-110), MAGI-1 und MAGI-3. Diese Proteinfamilie zeichnet sich durch den Besitz einer C-terminalen katalytisch inaktiven Guanylat-Kinase, sowie einer SH3 Domäne und einer bis mehreren PDZ Domänen aus (Harris und Lim 2001; Hung und Sheng 2002). Generell interagieren MAGUK Proteine mit Glutamat Rezeptoren oder Ionen Kanälen und fungieren hierbei als sogenannte *Scaffold*-Proteine, die am Aufbau multimerer Proteinkomplexe beteiligt sind (Harris und Lim 2001; Hung und Sheng 2002). Dementsprechend sind MAGUK Proteine an der prä- oder postsynaptischen Seite von Synapsen lokalisiert oder an Zell-Zell Kontakten von Epithelzellen, wie *Tight Junctions* oder *Adherens Junctions* zu finden.

Neben MAGI-3 sind die Proteine *Pals1-associated tight junction protein* (PATJ), Scrib und das *Multiple PDZ domain protein* (MPDZ) ebenfalls in *Tight*- bzw. *Adherens-Junctions* von Epithelzellen lokalisiert und sind wesentlich an der Entstehung von Zellpolarität beteiligt (Javier 2008). Interessanterweise sind diese vier zellulären Proteine Ziele von viralen Proteinen onkogener Viren, wie dem E6 Protein des humanen Papilloma Virus (HPV)

(Doorbar 2006), dem Tax Protein des humanen T-lymphotrophen Typ 1 Virus (HTLV) und dem E4-ORF1 Protein des Adenovirus (Glaunsinger *et al.* 2000; Okajima *et al.* 2008). Die Interaktionen dieser viralen Proteine mit MAGI-3, PATJ, MPDZ und Scrib bewirken in der Regel den Verlust von apikal-basaler Zellpolarität und den Bruch von Zell-Zell Kontakten (*Tight- / Adherens- Junctions*) (Javier 2008). Dies hat u. a. die Bildung von Krebszellen zur Folge. Dem Scrib Protein wurde neben dem Aufbau und Erhalt von Membranpolaritäten von Epithelien, Neuronen und T-Zellen (Humbert *et al.* 2003; Kim und Sheng 2004; Ludford-Menting *et al.* 2005; Yeh *et al.* 2008) auch eine Rolle während der Apoptose zugeschrieben. So soll es nach Aktivierung der Kaspase 3 durch die Todesrezeptoren (*death receptors*) FAS oder TNFR-1/2 zur Spaltung von hScrib kommen (Sone *et al.* 2008). Da für Influenza Viren bisher keine oncogenen Eigenschaften beschrieben sind, ist nicht davon auszugehen, dass das NS1 Protein ähnlich wie die viralen Proteine E6, Tax oder E4-ORF1 wirkt. Jedoch ist aus der Literatur bekannt, dass Influenza Viren regulierend auf die Induktion der Apoptose wirken (Ehrhardt und Ludwig 2009), so dass eine Interaktion von NS1 und Scrib möglicherweise zur Regulation der Apoptose beiträgt.

Letztendlich bleibt es jedoch fraglich, ob das unterschiedliche Bindungsverhalten des aviären und humanen NS1 Proteins in der Studie von Obenauer und Kollegen alleine auf die Unterschiede des PL Motivs zurück zu führen ist, da die beiden verwendeten NS1 Proteine sich in insgesamt 37 AS unterscheiden. Daher bleibt zu klären, ob eine PDZ spezifische Interaktion des NS1 Proteins mit zellulären Proteinen während einer H5N1 Infektion wirklich statt findet, und welcher zelluläre Mechanismus dadurch betroffen sein könnte.

Fragt man sich, welche anderen Faktoren für die hohe Virulenz des VN/1203 Virus verantwortlich sein könnten, so zeigt eine Analyse des viralen Genoms, dass VN/1203 über eine multibasische Spaltstelle im HA Protein verfügt. Diese ermöglicht eine Spaltung durch ubiquitär exprimierte Subtilisin-ähnliche Proteasen der Furinfamilie, wodurch es zu einer systemischen Infektion kommen kann. Weitere Experimente unserer Arbeitsgruppe belegen, dass eine Substitution der multibasischen Spaltstelle zu einer monobasischen Spaltstelle das VN/1203 Virus in Hühnern komplett attenuiert, so dass alle infizierten Tiere überleben. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Rezeptor-Bindungsdomäne des VN/1203 HA Proteins wesentlich zur systemischen Infektion und damit zur hohen Pathogenität in Mäusen beiträgt (Yen *et al.* 2009). Daneben besitzt das VN/1203 Virus auch die E627K Substitution im PB2 Protein, die eine effiziente Replikation in Säugerzellen ermöglichen soll (Massin *et al.* 2001). Vergleicht man das VN/1203 Virus mit



dem VN/1194/04 Virus, einem nahe verwandten H5N1 Isolat, das keine C-terminale Verkürzung aufweist, so zeigt sich, dass diese beiden Viren sich hinsichtlich ihrer Virulenz in Mäusen unterscheiden. Die 50 %ige letale Virus-Dosis (MLD<sub>50</sub>) beträgt für das VN/1203 Virus ~1 PFU (Yen *et al.* 2005), für das VN/1194/04 Virus hingegen ~16 PFU (Ichinohe *et al.* 2007). Eine Analyse der Gensegmente zeigt, dass sich die Viren in insgesamt 13 AS voneinander unterscheiden (Tabelle 4.2).

**Tab. 4.2: Vergleich der Aminosäuresequenz von VN/1203/04 und VN/1194/04**

Segment	AS Position	VN/1203/04	VN/1194/04
PB2	60	Asp	His
	391	Gln	Glu
PB1	178	Phe	Asp
	384	Leu	Val
PA	142	Glu	Lys
	327	Ala	Glu
	421	Ile	Ser
HA	52	Lys	Thr
NA	54	Phe	Leu
	264	Asn	Asp
	324	Tyr	Gly
NS	71	Gly	Glu
	216	Stopp	Lys

Welche Aminosäuresubstitutionen letztendlich für die unterschiedliche Virulenz in der Maus verantwortlich sind bleibt zu klären. Hierbei könnte eine vergleichende Mutationsanalyse des Influenza VN/1194/04 Isolates die Frage klären, ob das PL Motiv möglicherweise einen Einfluss auf die Virulenz von Influenza Viren hat, die „natürlich“ auf das ESEV Motiv enden, und ob der Verlust des PL Motivs bei VN/1203 durch kompensatorische Mutationen in anderen viralen Proteinen ausgeglichen wird.

Letztendlich scheint für das VN/1203 WT Virus die C-terminale Verkürzung des NS1 Proteins die optimale Anpassung für die virale Replikation zu sein, da in allen hier beschriebenen Experimenten die verkürzte Form zu höchsten Titern wuchs. Auch die momentan zirkulierende neue H1N1 Variante weist eine C-terminale Verkürzung des NS1 Proteins um 11 AS auf. Diese Verkürzung ist jedoch nicht durch Adaptation an den Menschen neu erworben, sondern ist innerhalb der klassischen Schweinegrippe Viren, aus dem das NS Segment ursprünglich stammt, weit verbreitet. Ob der bisherige „milde“ Verlauf der neuen H1N1 Variante auf die C-terminale Verkürzung des NS1 Proteins zurückzuführen ist, ist anhand der hier beschriebenen Daten zu bezweifeln, jedoch kann letztendlich ein Stamm-spezifischer Einfluss des PL Motivs auf die Virulenz nicht ausgeschlossen werden. Prinzipiell sind bei saisonalen Influenza Viren C-terminale



Verkürzungen des NS1 Proteins nicht ungewöhnlich. So konnten bisher NS1 Proteine mit 202, 217, 219, 220, 230, und 237 Aminosäuren Länge isoliert werden (Parvin *et al.* 1983). Vergleicht man die NS1 Proteine verschiedener humaner Influenza Isolate, so zeigt sich, dass von 937 Influenza Isolaten aller Subtypen 3,6 % eine C-terminale Verkürzung des NS1 Proteins um 10-13 Nukleotide aufweisen. Von 164 humanen Influenza Isolaten des Subtyps H5N1 weisen 1,8 % eine derartige C-terminale Verkürzung auf. Betrachtet man die H5N1 Isolate aviären Ursprungs so zeigt sich, dass von 743 Isolaten 1,6 % eine C-terminale Verkürzung um 12 AS und 6,7 % um 2 AS besitzen. In allen Fällen kommt es dadurch zur partiellen oder vollständigen Deletion des PL Motivs. Somit stellt sich die Frage, ob dieses Motiv eine funktionelle Rolle für die virale Replikation in Säugern und Vögeln spielt.

### **4.3 Untersuchungen zur Interaktion des VN/1203 NS1 Proteins mit PKR**

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Interaktion des VN/1203 NS1 Proteins mit PKR untersucht, da für die NS1 Proteine des A/Udorn/72 (H3N2) und des A/PR/8/34 (H1N1) beschrieben ist, dass sie den antiviralen Status der Wirtszelle durch die Wechselwirkung mit PKR limitieren (Bergmann *et al.* 2000). In der Literatur werden zwei Mechanismen der Wechselwirkung zwischen dem Influenza A Virus NS1 Protein und PKR diskutiert. Die Ergebnisse von Min *et al.* (2007) deuteten auf eine direkte, dsRNA-unabhängige NS1-PKR-Bindung hin, wobei die Aminosäurepositionen 123-127 des NS1 Proteins die Bindung und Inhibition vermitteln sollen. Demgegenüber wurde von Lu *et al.* und Tan und Katze eine dsRNA-abhängige NS1-PKR-Interaktion beschrieben (Lu *et al.* 1995; Tan und Katze 1998). Für das NS1 Protein der Influenza B Viren hingegen konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die dsRNA-Bindungsaktivität des B/NS1 Proteins und der PKR für die Interaktion nötig ist (Dauber B. 2008).

Da zu Beginn dieser Arbeit noch keine Interaktion eines NS1 Proteins eines H5N1 Influenza Virus mit PKR beschrieben war und auch der genaue Mechanismus der Inhibition der PKR Aktivierung aufzuklären blieb, sollte im zweiten Teil dieser Arbeit daher die Interaktion des VN/1203 NS1 Proteins mit PKR näher charakterisiert sowie ihr Einfluss auf die virale Replikation bestimmt werden. Die hierfür verwendeten NS1 Mutanten trugen entweder Aminosäuresubstitutionen in der RNA Bindungsdomäne (Aminosäurepositionen 38 und 41) oder in der potentiellen PKR Bindungsdomäne (Aminosäurepositionen 123-127). Hierbei wurden die Schwerpunkte wie folgt gesetzt:

1. Analyse der Interaktion von NS1 mit PKR *in vitro* in einer GST-Kopräzipitation
2. Charakterisierung des Einflusses der NS1 Mutanten auf die virale Replikation

#### **4.3.1 Analyse der Interaktion von NS1 mit PKR *in vitro* in einer GST-Kopräzipitation**

In einem ersten Präzipitationsexperiment konnte zunächst *in vitro* die Bindung des VN/1203 NS1 WT Proteins an PKR gezeigt werden (Abbildung 3.20), so dass zu vermuten ist, dass auch das NS1 Protein des VN/1203 Virus während der Infektion zur Inhibierung des antiviralen Status *in vivo* mit PKR interagiert. Im nächsten Schritt wurde untersucht, welche NS1 Domäne an der PKR Bindung beteiligt sein könnte. Dafür wurden NS1 Mutanten generiert, deren dsRNA- bzw. potentielle PKR-Bindungsfähigkeit inhibiert war. Die in vielen Studien verwendete Substitution der Aminosäuren Arginin 38 und Lysin 41 zu Alanin blockiert die dsRNA-Bindungsfähigkeit des NS1 Proteins (Wang *et al.* 1999; Bornholdt und Prasad 2008). Die hierbei betroffenen Aminosäuren spielen zwar auch eine Rolle in dem NLS1 des NS1 Proteins (Melen *et al.* 2007), jedoch konnte keine unterschiedliche intrazelluläre Lokalisation zwischen den verschiedenen NS1 Mutanten festgestellt werden. Die Mutationen in dem NLS1 des NS1 Proteins könnten durch die AS K213 und R214 des NLS2 kompensiert werden, so dass es hinsichtlich der intrazellulären Lokalisation zu keiner Veränderung kommt.

Neben der dsRNA-bindungsdefizienten NS1 Mutante wurden auch NS1 Mutanten generiert, deren potentielle PKR Bindungsdomäne mutiert war. Dazu wurden im NS1 Protein des VN/1203 Virus die AS D120-Q121, I123-M124 oder D125-K126 gegen Alanin ausgetauscht. Die Mutante D120A-Q121A diente hierbei als Kontrolle, da in Analogie zur Studie von Min und Kollegen kein Verlust der Bindungsfähigkeit von NS1 an PKR durch diese Mutation erwartet wurde (Min *et al.* 2007).

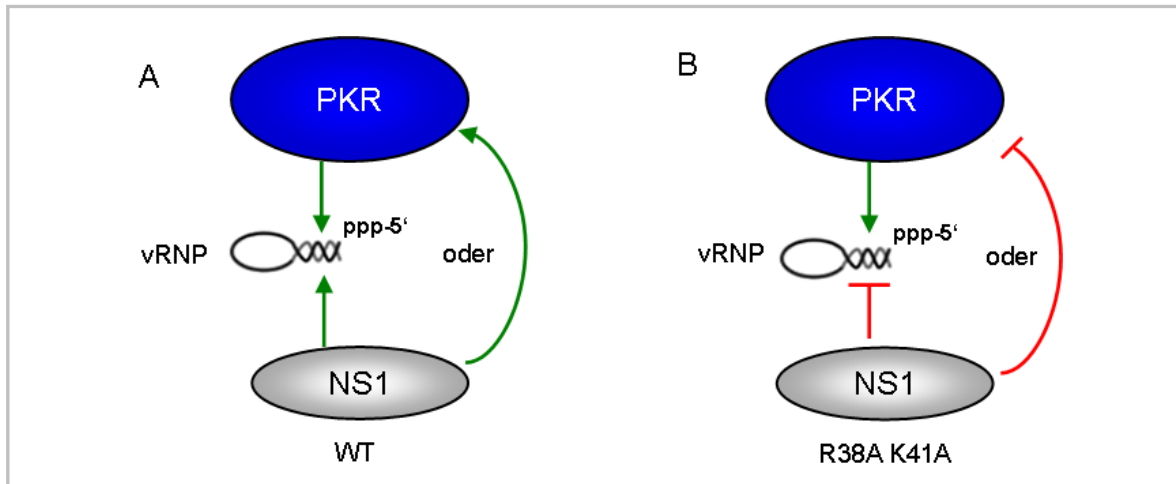
Die in Abschnitt 3.3.3 beschriebenen GST-Kopräzipitationen zeigten, dass die Bindung des NS1 Proteins an PKR von der dsRNA-Bindungsdomäne (R38, K41) des NS1 Proteins abhängig war, da die entsprechende NS1 Mutante R38A-K41A nicht mit dem PKR-Konstrukt präzipitierte. Die AS 120-126 des VN/1203 NS1 Proteins spielten hingegen keine Rolle für eine Bindung an PKR. Somit stehen diese Ergebnisse im Gegensatz zur Studie von (Min *et al.* 2007), die für das NS1 Protein des Influenza A/Udorn/72 Virus (H3N2) eine direkte Bindung durch die AS 123-124 und 126-127 an PKR postuliert hatten. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass auch der Mechanismus der NS1-PKR Interaktion Stamm-spezifisch sein könnte.

### 4.3.2 Charakterisierung des Einflusses der NS1 Mutanten auf die virale Replikation

Im Folgenden wurden mit den verschiedenen NS1 Mutanten rekombinante VN/1203 Viren generiert, um einen Einfluss der unterschiedlichen Mutationen auf die virale Replikation untersuchen zu können. Abbildung 3.21 zeigt eine drastische Attenuierung des VN/1203 R38A-K41A Virus um bis zu 5 Log Stufen im Vergleich zum WT Virus. Die Aminosäuresubstitutionen an den Positionen 123-126 führten interessanterweise ebenfalls zu einer Attenuierung der Viren um 0,5 bis 1 Log Stufe (Abbildung 3.21). Das ursprünglich als Kontrolle erzeugte rekombinante VN/1203 D120A-Q121A Virus zeigte hierbei im Vergleich zum WT Virus überraschenderweise eine Attenuierung um 2 Log Stufen.

Die Ermittlung des Phosphorylierungsstatus von PKR in infizierten Zellen sollte zeigen, ob aktiviertes PKR die Ursache für die oben beschriebenen Attenuierungen ist. Nachdem die Inhibition der PKR Phosphorylierung durch das VN/1203 WT Virus im Vergleich zu einem saisonalen H3N2 Virus und einem rekombinanten  $\Delta$ NS1 Virus bestätigt wurde, wurde der Mechanismus dieser Inhibition mit Hilfe der dsRNA-bindungsdefizienten NS1 Virusmutante R38A-K41A oder der entsprechenden Virusmutanten im Bereich der potentiellen PKR Bindungsdomäne (D120A-Q121A, I123A-M124A und D125A-K126A) näher charakterisiert. Hierbei konnte phosphoryliertes PKR in Zellen nachgewiesen werden, die mit dem rekombinanten VN/1203 R38A-K41A Virus infiziert wurden (Abbildung 3.22). Diese Aktivierung von PKR, welche durch den Verlust der PKR Bindungsfähigkeit des NS1 Proteins zustande kommt, erklärt die starke Attenuierung des rekombinanten VN/1203-Virus mit der dsRNA-bindungsdefizienten NS1 Mutante während der Virusreplikation. Die Ergebnisse zeigen, dass für die Bindung und Inhibierung der PKR-Aktivierung die dsRNA-Bindungsdomäne (Aminosäurepositionen 38 und 41) des VN/1203-NS1 Proteins essentiell ist. Eine Inhibierung von PKR durch den postulierten Mechanismus der dsRNA Sequestrierung, der keine NS1-PKR Bindung benötigt, ist daher eher unwahrscheinlich. Für das NS1 Protein des Influenza B Virus konnte gezeigt werden, dass eine Interaktion mit PKR von der dsRNA-Bindungsdomäne abhängig ist (Dauber *et al.* 2009). Die Bildung eines physikalischen Komplexes von B/NS1 und PKR wird hierbei sehr wahrscheinlich durch Bindung an vRNA bzw. vRNPs vermittelt (Dauber *et al.* 2009). Ein ähnlicher Mechanismus wäre durchaus auch für das Influenza A/VN/1203 NS1 Protein denkbar, denn obwohl die NS1 Proteine von Influenza A und B Viren nur eine rund 20 %ige Sequenzhomologie aufweisen, besitzen sie eine ähnliche dsRNA-Bindungsdomäne (Typ A: AS 1-73, Typ B: AS 1-93) (Yin *et al.* 2007). Es ist daher

anzunehmen, dass auch die Interaktion zwischen dem A/NS1 Protein des VN/1203 und PKR über eine RNA-Spezies wie z.B. vRNA/vRNP vermittelt wird und zur Bildung eines physikalischen NS1-PKR Komplexes führt.



**Abb. 4.1: Schematische Abbildung der Interaktion von VN/1203-NS1 mit PKR.** A) Das NS1-WT Protein interagiert mit PKR über seine dsRNA Bindungsdomäne R38 & K41 (grüne Pfeile). Hierbei bindet das NS1 Protein möglicherweise an vRNPs. Eine direkte Bindung an PKR, die ebenfalls durch die Aminosäuren R38 & K41 vermittelt sein könnte, ist jedoch nicht gänzlich auszuschließen. B) Die Aminosäuresubstitution R38A-K41A im NS1 Protein eliminiert die Bindung und somit jegliche Interaktion mit PKR.

Des Weiteren konnte jedoch phosphoryliertes PKR auch in Zellen nachgewiesen werden, die mit der rekombinanten VN/1203 D120A-Q121A Virusmutante infiziert wurden. Die Mutanten I123A-M124A und D125A-K126A inhibierten entgegen den Studien von Min und Kollegen weiterhin die PKR Aktivierung (Min *et al.* 2007). Diese Ergebnisse können unterschiedlich interpretiert werden: Zum einen könnte die D120A-Q121A Mutation im NS1 Protein dessen Faltung verändern, so dass die Inhibition der PKR Phosphorylierung nicht mehr stattfinden kann. Zum anderen könnte die verstärkte Phosphorylierung von PKR durch die in Abbildung 3.22 zu beobachtende schwächere Expression der NS1 D120A-Q121A Mutante zu erklären sein. Die AS D120 und Q121 haben daher vermutlich keinen Einfluss auf die Inhibition der PKR-Phosphorylierung, so dass „nur“ die in der infizierten Zelle exprimierten Mengen des NS1 Proteins nicht ausreichen würden, um alle PKR Proteine zu inhibieren. In diesem Zusammenhang wurde daher auch überprüft, ob das schwache Expressionsniveau des NS1 Proteins zu einer erhöhten Sekretion von IFN- $\beta$  führt. Entsprechende Analysen infizierter A549 Zellen belegen, dass es bei Infektion mit der D120A-Q121A Virusmutante tatsächlich zu einer ca. 4-fach erhöhten Sekretion von IFN- $\beta$  (~500 IU) im Vergleich zum WT (~120 IU) kommt (Abbildung 3.24). Diese erhöhte Sekretion ist allerdings nicht auf einen Defekt der NS1 D120A-Q121A Mutante

zurückzuführen, da sie ebenso effizient wie das WT NS1 Protein die Induktion eines IFN- $\beta$  Promotors im Luziferase-Reporter-Gen-Test inhibierte.

### 4.3.3 Zusammenfassung der zweiten Fragestellung

Die Mechanismen verschiedener Viren zur Inhibierung der antiviralen Funktion von PKR sind vielfältig. So kodiert z.B. das Adenovirus für einen PKR-Pseudoaktivator (VAI RNA). Dieser Faktor VAI RNA bindet an die dsRNA-Bindedomäne von PKR und verhindert somit die PKR-Aktivierung durch dsRNA (Min *et al.* 2007). Daneben inhibiert auch das US11 Protein des humanen Herpesvirus Typ 1 die PKR-Aktivierung (Peters *et al.* 2002). Zusätzlich wurden Virusfamilien beschrieben, die RNA-Bindeproteine kodieren, die dsRNA von PKR sequestrieren und somit die Aktivierung von PKR verhindern. Ein solches dsRNA-Bindeprotein ist das E3L Protein des Vaccinia Virus (Chang *et al.* 1992; Garcia *et al.* 2006; Min *et al.* 2007).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten an, dass das NS1 Protein des VN/1203 Virus PKR hauptsächlich durch seine dsRNA-Bindedomäne (R38 und K41) antagonisiert. Hierbei spielen die AS R38 und K41 eine essentielle Rolle für die *in vitro* Bindung an PKR. Da beide Proteine über eine RNA Bindedomäne verfügen, ist die Interaktion möglicherweise durch die Bindung an eine bestimmte RNA-Spezies vermittelt. Dies würde einen einheitlichen Mechanismus zur Inhibierung von PKR durch A/NS1 und B/NS1 Proteine bedeuten (Dauber *et al.* 2009). Jedoch kann zum jetzigen Zeitpunkt auch eine direkte Bindung des VN/1203 NS1 Proteins an PKR durch die Aminosäuren R38 und K41 nicht ausgeschlossen werden. Die Aminosäuren 123-126 des NS1 Proteins spielen hingegen bei der Inhibierung der PKR-Aktivierung keine essentielle Rolle während die Mutationen D120A-Q121A vermutlich überwiegend die Faltung bzw. Stabilität des Proteins beeinflussen.

Damit stehen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im Gegensatz zu Daten aus der Arbeitsgruppe von R.M. Krug. Diese beschrieben sowohl, dass das NS1 Protein dsRNA sequestriert (Lu *et al.* 1995), als auch, dass die dsRNA-Bindungsaktivität im NS1 Protein während einer Influenza A/Udorn/72 (H3N2)-Infektion nicht nötig sei (Li *et al.* 2006) und nur eine direkte Interaktion über die NS1 Aminosäuresequenz 123-127 die Bindung und Inhibierung von PKR vermittelt (Li *et al.* 2006; Min *et al.* 2007).

Eine Ursache für die unterschiedlichen postulierten Mechanismen könnte die Sequenz-Variation des NS1 Proteins der verschiedenen Influenza A Virus Subtypen sein. So vermuteten schon Melen und Kollegen, dass die Rolle der dsRNA-Bindungsfähigkeit im NS1 Protein Stamm-spezifisch sei (Melen *et al.* 2007). Dies würde bedeuten, dass

manche NS1 Proteine die PKR Aktivierung durch eine direkte Protein-Protein-Interaktion inhibieren, während andere NS1 Proteine dsRNA sequestrieren, so dass PKR nicht aktiviert werden kann. Des Weiteren könnten unterschiedliche experimentelle Bedingungen verschiedener Labore ein weiterer Grund für die verschiedenen postulierten Mechanismen sein. Um hierfür eine eindeutige Antwort zu finden, müssten die NS1 Proteine verschiedener Subtypen parallel in einer Studie mit einheitlichen experimentellen Bedingungen auf ihre Fähigkeit, PKR zu inhibieren, untersucht werden.

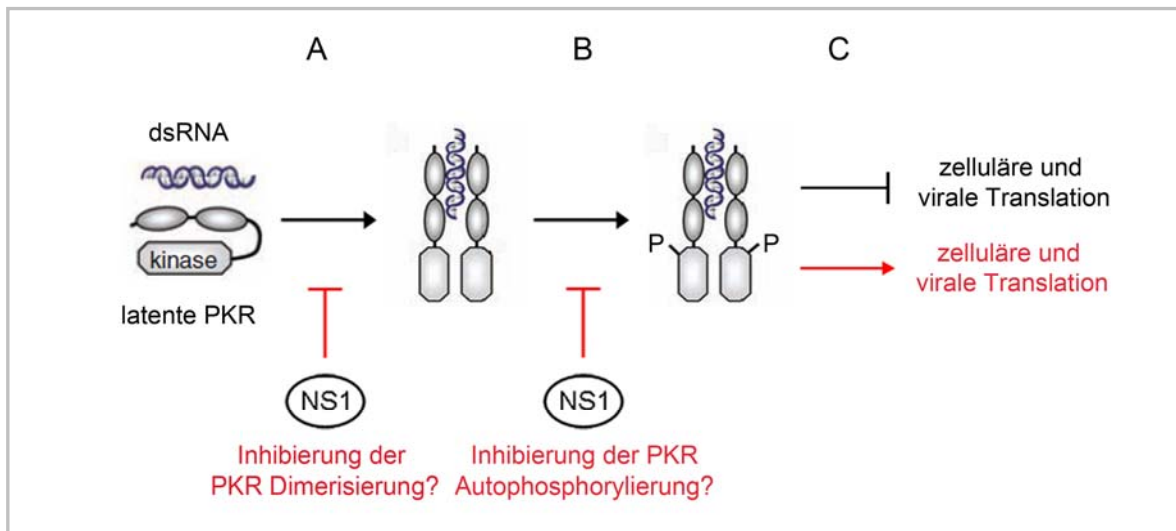
### 4.4 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit erworbenen Kenntnisse über den Einfluss des C-terminalen PL Motivs ESEV auf das hoch-pathogene Influenza VN/1203 Virus des Subtyps H5N1 belegen, dass das ESEV Motiv keine Rolle für die Pathogenität dieses Virus in der Maus und dem Huhn spielt. Es ist daher fraglich, ob Interaktionen der VN/1203 NS1 ESEV Variante mit PDZ Domänen enthaltenden Proteinen die virale Replikation beeinflussen. Vergleichende Analysen der Bindungsfähigkeit der VN/1203 NS1 -WT, -ESEV und -RSKV Proteine an humane PDZ Domänen mittels der PDZ Array Kits I-IV von Panomics würden klären, ob das ESEV Motiv im Vergleich zu den anderen Varianten tatsächlich spezifische Bindungen an PDZ Domänen enthaltende humane Proteine ermöglicht. Zudem könnten mögliche Unterschiede zu dem bei Obernauer und Kollegen verwendeten A/Blue-winged teal/MN/993/80 (H6N6) Isolat aufgezeigt werden. Mittels GST-Präzipitationsanalysen könnte die Bindung dieser identifizierten Proteine *in vitro* verifiziert werden. Desweiteren würden Koimmunpräzipitationsanalysen infizierter Zellen klären, ob eine Bindung auch während einer Infektion stattfindet. Durch die Ergebnisse von Jackson und Kollegen (Jackson *et al.* 2008) kann ein Stamm-spezifischer Einfluss des PL Motivs auf die Virulenz anderer Influenza Viren nicht ausgeschlossen werden. Untersuchungen des H5N1 Influenza A/VN/1194/04 Isolats könnten klären, ob das PL Motiv hierbei einen Einfluss auf die Virulenz hat, da dessen NS1 Protein „natürlich“ auf das PL Motiv ESEV endet.

In dieser Arbeit konnte des Weiteren gezeigt werden, dass das VN/1203 NS1 Protein mit PKR interagiert und hierfür die dsRNA-Bindungsdomäne (Aminosäuren R38 & K41) des NS1 Proteins essentiell ist. Weitere Analysen sind jedoch notwendig, um den genauen Mechanismus der Inhibition von PKR durch NS1 aufzuklären.

Zunächst müsste untersucht werden, ob die NS1-PKR Bindung durch die Bindung an eine RNA-Spezies wie z.B. vRNA bzw. vRNPs vermittelt wird, oder ob die AS R38 und K41 eine direkte Bindung an PKR vermitteln. Hierzu könnte man in GST-Kopräzipitationen steigende Mengen an dsRNA hinzutitrieren und überprüfen, ob die Bindungseffizienz von

NS1 an PKR zunimmt. Alternativ sollte ein Verdau mit entsprechenden RNAsen die Bindung eliminieren. Des Weiteren sind die Fragen zu klären, ob NS1 mit dem PKR Monomer oder Dimer interagiert, und ob NS1 durch Interaktion mit PKR bereits dessen Dimerisierung verhindert oder nach erfolgter PKR-Dimerisierung die Autophosphorylierung des PKR Dimers inhibiert (Abbildung 4.2).



**Abb. 4.2: Mögliche Angriffspunkte von NS1 zur Blockierung der PKR-Aktivierung.** NS1 könnte durch verschiedene Mechanismen die PKR-Aktivierung inhibieren. (A) NS1 blockiert die Dimerisierung der PKR Monomere. (B) NS1 inhibiert nach erfolgter PKR-Dimerisierung dessen Autophosphorylierung. (C) Sowohl die Inhibition der PKR-Dimerisierung als auch die Inhibition der PKR-Autophosphorylierung führen nicht zur Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  und somit wird die zelluläre und virale Protein-Translation nicht gestoppt.

Das NS1 Protein des Influenza Virus ist für eine effiziente Virusreplikation essentiell. Durch die umfassende Beschreibung der Funktionen des NS1 Proteins sowie der Aufklärung seiner mechanistischen Grundlagen ist die Entwicklung von lebend-attenuierten Impfstoffen bzw. antiviralen Medikamenten möglich.



### Zusammenfassung

Die Infektionen von Menschen mit hoch-pathogenen aviären Influenza Viren (HPAIV) des Subtyps H5N1 führten bisher zu einer Mortalitätsrate von ca 60 %. Aufgrund des pandemischen Potentials dieser Viren ist die Identifizierung von Virulenzdeterminanten dringend erforderlich, um ein besseres Verständnis über die Pathomechanismen dieser HPAIV zu erhalten. Dieses Wissen ermöglicht es, neue Medikamente zur Behandlung dieser Infektion zu entwickeln. Das Influenza Virus NS1 Protein, dessen primäre Funktionen die Inhibition der Typ I Interferon Antwort und die Limitierung antiviraler Effekte von Interferon induzierten Proteinen wie PKR, OAS/RNase L und RIG-I sind, trägt mit zur Virulenz der Viren in Säugern bei.

Ziel dieser Arbeit war es daher, zwei Funktionen des NS1 Proteins eines HPAIV zu analysieren. Zum einen wurde das kürzlich als Virulenzdeterminante postulierte PDZ-Liganden Motiv ESEV des NS1 Proteins auf seine Rolle in der Pathogenität von HPAIV untersucht. Zum anderen wurde analysiert, ob und wie das NS1 Protein eines HPAIV als PKR Inhibitor wirkt und welchen Einfluss diese Interaktion auf die virale Replikation des HPAIV hat.

Das NS1 Protein der meisten aviären Influenza Viren enthält ein C-terminales PDZ-Liganden Motiv bestehend aus den Aminosäuren ESEV. Im Gegensatz hierzu enden die meisten saisonalen Influenza Viren auf die Aminosäuresequenz RSKV. Bisherige Studien zeigten, dass das „aviäre“ ESEV Motiv *in vitro* an verschiedene humane PDZ Domänen bindet und zur Steigerung der Virulenz eines Maus-adaptierten H1N1 Isolates führt. Im Gegensatz hierzu konnte für das „humane“ RSKV Motiv kaum eine Bindung an PDZ Domänen oder ein Einfluss auf die Virulenz der Viren gezeigt werden. In dieser Arbeit wurde ein prototypisches Influenza Virus des Subtyps H5N1 vom Stamm 1 verwendet, das VN/1203/04 Virus. Das NS1 Protein dieses Virus ist C-terminal verkürzt, so dass das PL Motiv fehlt. Um die Rolle des C-terminalen NS1 Motivs für die Virulenz von H5N1 Viren untersuchen zu können, wurde ein revers-genetisches System etabliert. Dies ermöglichte die Generierung isogener rekombinanter Viren mit einem rekonstituierten C-Terminus, der entweder auf die Aminosäuresequenz ESEV oder RSKV endet. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass im Vergleich zum WT und RSKV Virus die Replikation der ESEV Variante auf humanen alveolaren Zellen und murinen Fibroblasten leicht attenuiert war, während auf primären Hühnerembryo-Fibroblasten kein Unterschied zu beobachten war. Dennoch verursachten alle drei Viren letale Infektionen in Mäusen und Hühnern, bei denen zum einen nur geringfügige Unterschiede hinsichtlich der viralen Titer in verschiedenen Organen festgestellt werden konnten, und es zum anderen kaum

Unterschiede hinsichtlich der letalen Dosis 50 bzw. des Intravenösen Pathogenitätsindexes gab. Diese Ergebnisse lassen daher darauf schließen, dass das C-terminale ESEV Motiv des NS1 Proteins wenig zur Virulenz des VN/1203 Virus in Mäusen und Hühnern beiträgt, jedoch die virale Replikation in humanen Zellen limitiert. Dementsprechend scheint das PL Motiv des NS1 Proteins die virale Pathogenität in einer Stamm- und Wirts-abhängigen Art und Weise zu modulieren.

Des Weiteren wurde untersucht, ob das NS1 Protein des VN/1203 Virus die Aktivierung der dsRNA abhängigen Protein Kinase R (PKR), die für den Aufbau des antiviralen Status der Wirtszelle wichtig ist, inhibiert. Während einer Infektion erkennt PKR virale Nukleinsäuren, wodurch es zur strukturellen Umlagerung des Proteins und damit verbunden zur Dimerisierung und Autophosphorylierung der Kinase kommt. Aktivierte PKR phosphoryliert die alpha Untereinheit des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors 2 (eIF2 $\alpha$ ), wodurch die Translation zellulärer und viraler mRNAs verhindert wird. Dies inhibiert die virale Replikation stark. Für die Inhibition von PKR durch das A/NS1 Protein wurden unterschiedliche Mechanismen postuliert, wie z.B. RNA Sequestrierung (AS R38 und K41) oder direkte NS1-PKR Bindung (AS I123, M124, K126, N127). Daneben konnte für das B/NS1 Protein kürzlich gezeigt werden, dass die Inhibition der PKR von der Fähigkeit zur Bildung eines physikalischen NS1-PKR Komplexes abhängt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen, dass das VN/1203 NS1 Protein als PKR Inhibitor wirkt, und zeigen, dass die Inhibition durch die Aminosäuren R38 und K41 vermittelt wird, welche die Bindung von RNA ermöglichen. Desweiteren sind diese AS für eine effiziente virale Replikation essentiell und werden auch für eine Interaktion von NS1 mit PKR in einer GST-Kopräzipitation benötigt. Dies deutet auf einen ähnlichen Mechanismus der PKR Inhibition durch die Influenza A und B Viren hin.

### Summary

Highly pathogenic avian influenza viruses (HPAIV) of the subtype H5N1 have caused a high mortality rate of about 60% in humans. Due to the potential pandemic threat by H5N1 viruses, the identification of virulence determinants and their mode of action are fundamental for a better understanding of the pathogenicity mechanisms of these viruses and for the development of new drugs to treat the infections. The influenza virus non-structural NS1 protein, that has a major function in the inhibition of type I IFN and limitation of the antiviral effects of IFN-induced proteins including PKR, OAS/RNase L and RIG-I, is known to contribute to the virulence in mammals. Therefore the goal of this study was to investigate two different functions of the NS1 protein of a HPAIV:

On the one hand the influence of a newly predicted virulence determined the PDZ ligand motif was analysed in the background of a HPAIV. On the other hand it was analysed if and how the NS1 protein of HPAIV also functions as PKR inhibitor and which influence this interaction may have on viral replication.

The NS1 proteins of most avian influenza viruses contain the C-terminal PDZ ligand (PL) amino acid motif ESEV, while the corresponding NS1 proteins of seasonal human strains carry the C-terminal sequence RSKV. The “avian” ESEV motif facilitates binding to multiple human PDZ domains *in vitro*, and increases virulence when introduced into the NS1 protein of mouse–adapted H1N1 influenza virus. In contrast, the RSKV motif binds poorly to PDZ domains and has little effect on virulence. In this study the prototypic H5N1 clade 1 influenza A/VN/1203/04 virus that expresses a truncated NS1 protein lacking the PL motif was examined. To elucidate the role of the C-terminal NS1 motif for the virulence of H5N1 influenza virus, a reverse genetic approach was utilized to generate isogenic recombinant viruses with full-length reconstitution of the NS1 C-terminus, ending with either the ESEV or RSKV motif. Compared to the WT and RSKV viruses, the ESEV variant was slightly attenuated for replication on human alveolar cells and murine fibroblasts, but not on avian cells. However, all three viruses caused highly lethal infections in mice and chickens, with little differences in viral organ titers and lethal dose 50 or intravenous pathogenicity index, respectively. These results suggest that the C-terminal ESEV motif in the NS1 protein contributed little to the virulence of the VN/1203 virus in mice and chickens, but restricted viral replication in human cells. The PL motif in NS1 therefore appeared to modulate viral pathogenicity in a strain- and host-dependent manner.

## Summary

---

Furthermore it was examined whether the A/VN1203-NS1 protein inhibits the double-stranded (ds) RNA dependent protein kinase R (PKR), which is a key mediator of the innate immune defense. Activation of PKR during infection involves recognition of viral nucleic acids, which induces a structural rearrangement leading to dimerization and autophosphorylation of the kinase. Activated PKR phosphorylates the alpha subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2a) and thereby blocks the translation of cellular and viral mRNAs. This strongly reduces the viral replication. Different mechanisms were predicted for PKR inhibition by the A/NS1 protein including RNA sequestration (amino acids R38 and K41) or direct binding (amino acids I123, M124, K126, N127). Interestingly, it was recently shown for the B/NS1 protein that inhibition of PKR depends on its capacity to form a physical complex with PKR. The results of the present study confirm that the VN/1203 NS1 protein functions as PKR inhibitor and show that this inhibition depends on amino acids R38 & K41, which are known to facilitate RNA binding and which were essential for efficient viral replication. In addition, these amino acids were also required for the interaction of the NS1 protein with PKR in a GST pulldown assay, indicating similar mechanisms for Influenza A and B viruses to inhibit PKR activation.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
A	Adenin
$\alpha$	Antikörper
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C-terminal	Carboxyterminal
ca.	circa
cDNA	kopierte (copy/complementary) DNA
Ci	Curie (1 Ci = $3,7 \times 10^{10}$ Bq)
cLSM	Konfokales Laser Scan Mikroskop (engl.: <i>confocal laser scanning microscopy</i> )
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Da	Dalton
DABCO	1,4-Diazabicyklo-[2,2,2]-oktan
ddNTP	2'-Dideoxyribonukleotid-triphosphat
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	2'-Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleotid-triphosphat
DRBM	Doppelstrang-RNA-Bindemotiv
ds	Doppelstrang (engl.: double strand)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
engl.	englisch
<i>et al.</i>	und andere (lateinisch: <i>et alteri</i> )
FCS	fötales Kälberserum (engl.: <i>fetal calf serum</i> )

## Abkürzungsverzeichnis

---

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
G	Guanin
g	Gramm
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein (engl.: green fluorescent protein)
GST	Glutathion-S-Transferase
°C	Grad Celsius
HA	Hämagglutinin
HCl	Salzsäure
H <sub>2</sub> O	Wasser
HRP	Meerrettich-Peroxidase (engl.horseradish peroxidase)
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IVT	<i>in-vitro</i> -Translation
IPTG	Isopropyl-β-Thiogalactopyranidose
k	kilo
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KoIP	Koimmunpräzipitation
l	Liter
LB	Luria Bertani (-Medium)
μ	Mikro
m	milli
M	Molar (mol/l)
mA	Miliampere
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
MEM	Minimal Essential Medium
min	Minute
Mock	Blindwert, Negativkontrolle
MOI	Multiplicity of Infection
mRNA	messenger RNA
NA	Neuraminidase
NCR	Nicht Kodierende Region (engl.: non-coding region)
NES	Kernexportsignal (engl.: nuclear export signal)

## Abkürzungsverzeichnis

---

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
NLS	Kernlokalisierungssignal (engl.: nuclear localization signal)
nm	Nanometer
NP	Nukleoprotein
NS	Nichtstrukturprotein
nt	Nukleotide
N-terminal	Aminoterminal
OD	optische Dichte
PACT	protein activator of interferon-induced Protein Kinase, PKR
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
PFU	Plaque-bildende Einheiten (engl.: plaque forming units)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Konzentration (lateinisch: <i>potentia hydrogenii</i> )
<i>p.i.</i>	nach der Infektion (lateinisch: <i>post infectionem</i> )
PKR	dsRNA-abhängige Proteinkinase R
PL	PDZ-Ligand
PP	Probenpuffer
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoprotein-Komplex
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium dodecylsulfat)
s	Sekunde
Std.	Stunden
T	Tyrosin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris/Borsäure/EDTA-Puffer
TBST	Tris Buffered Saline mit Tween
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin
TPCK	(Tosylamido-2-Phenyl)Ethylchloromethylketon



## Abkürzungsverzeichnis

---

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Enzymeinheit (engl.: unit)
ÜN	über Nacht
∞	unendlich
UV	Ultraviolett
V	Volt
vRNA	virale RNA
vRNP	virale Ribonukleoproteine
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

- Aittaleb, M., G. Gao, C. R. Evelyn, R. R. Neubig und J. J. Tesmer (2009). "A conserved hydrophobic surface of the LARG pleckstrin homology domain is critical for RhoA activation in cells." Cell Signal **21**(11): 1569-1578.
- Alexander, D. J. (2000). "A review of avian influenza in different bird species." Vet Microbiol **74**(1-2): 3-13.
- Alonso-Caplen, F. V. und R. M. Krug (1991). "Regulation of the extent of splicing of influenza virus NS1 mRNA: role of the rates of splicing and of the nucleocytoplasmic transport of NS1 mRNA." Mol Cell Biol **11**(2): 1092-1098.
- Andrejeva, J., K. S. Childs, D. F. Young, T. S. Carlos, N. Stock, S. Goodbourn und R. E. Randall (2004). "The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(49): 17264-17269.
- Beigel, J. H., J. Farrar, A. M. Han, F. G. Hayden, R. Hyer, M. D. de Jong, S. Lochindarat, T. K. Nguyen, T. H. Nguyen, T. H. Tran, A. Nicoll, S. Touch und K. Y. Yuen (2005). "Avian influenza A (H5N1) infection in humans." N Engl J Med **353**(13): 1374-1385.
- Bergmann, M., A. Garcia-Sastre, E. Carnero, H. Pehamberger, K. Wolff, P. Palese und T. Muster (2000). "Influenza virus NS1 protein counteracts PKR-mediated inhibition of replication." J Virol **74**(13): 6203-6206.
- Bonnet, M. C., C. Daurat, C. Ottone und E. F. Meurs (2006). "The N-terminus of PKR is responsible for the activation of the NF-kappaB signaling pathway by interacting with the IKK complex." Cell Signal **18**(11): 1865-1875.
- Borden, E. C., G. C. Sen, G. Uze, R. H. Silverman, R. M. Ransohoff, G. R. Foster und G. R. Stark (2007). "Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine." Nat Rev Drug Discov **6**(12): 975-990.
- Bornholdt, Z. A. und B. V. Prasad (2008). "X-ray structure of NS1 from a highly pathogenic H5N1 influenza virus." Nature **456**(7224): 985-988.
- Burgui, I., T. Aragon, J. Ortin und A. Nieto (2003). "PABP1 and eIF4GI associate with influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes." J Gen Virol **84**(Pt 12): 3263-3274.
- Chan, M. C., C. Y. Cheung, W. H. Chui, S. W. Tsao, J. M. Nicholls, Y. O. Chan, R. W. Chan, H. T. Long, L. L. Poon, Y. Guan und J. S. Peiris (2005). "Proinflammatory cytokine responses induced by influenza A (H5N1) viruses in primary human alveolar and bronchial epithelial cells." Respir Res **6**: 135.
- Chang, H. W., J. C. Watson und B. L. Jacobs (1992). "The E3L gene of vaccinia virus encodes an inhibitor of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(11): 4825-4829.
- Chen, B. J., G. P. Leser, D. Jackson und R. A. Lamb (2008). "The influenza virus M2 protein cytoplasmic tail interacts with the M1 protein and influences virus assembly at the site of virus budding." J Virol **82**(20): 10059-10070.
- Chen, B. J., G. P. Leser, E. Morita und R. A. Lamb (2007). "Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase, but not the matrix protein, are required for assembly and budding of plasmid-derived virus-like particles." J Virol **81**(13): 7111-7123.
- Chen, W., P. A. Calvo, D. Malide, J. Gibbs, U. Schubert, I. Bacik, S. Basta, R. O'Neill, J. Schickli, P. Palese, P. Henklein, J. R. Bennink und J. W. Yewdell (2001). "A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death." Nat Med **7**(12): 1306-1312.
- Cheung, C. Y., L. L. Poon, A. S. Lau, W. Luk, Y. L. Lau, K. F. Shortridge, S. Gordon, Y. Guan und J. S. Peiris (2002). "Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease?" Lancet **360**(9348): 1831-1837.
- Claas, E. C., A. D. Osterhaus, R. van Beek, J. C. De Jong, G. F. Rimmelzwaan, D. A. Senne, S. Krauss, K. F. Shortridge und R. G. Webster (1998). "Human influenza A

- H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus." Lancet **351**(9101): 472-477.
- Compans, R. W., J. Content und P. H. Duesberg (1972). "Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus." J Virol **10**(4): 795-800.
- Conenello, G. M., D. Zamarin, L. A. Perrone, T. Tumpey und P. Palese (2007). "A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence." PLoS Pathog **3**(10): 1414-1421.
- Conzelmann, K. K. (2004). "Reverse genetics of mononegavirales." Curr Top Microbiol Immunol **283**: 1-41.
- Dauber, B., L. Martinez-Sobrido, J. Schneider, R. Hai, Z. Waibler, U. Kalinke, A. Garcia-Sastre und T. Wolff (2009). "Influenza B virus ribonucleoprotein is a potent activator of the antiviral kinase PKR." PLoS Pathog **5**(6): e1000473.
- Dauber B., M.-S. L., Schneider J., Hai R., Waibler Z., Kalinka U., Garcia-Sastre A., Wolff T. (2008). Blockade Of The Antiviral Kinase PKR By The NS1 Protein Of Influenza B Virus Occurs Through An RNA-Dependent Interaction That Is Crucial For Virulence.
- de Jong, M. D., C. P. Simmons, T. T. Thanh, V. M. Hien, G. J. Smith, T. N. Chau, D. M. Hoang, N. V. Chau, T. H. Khanh, V. C. Dong, P. T. Qui, B. V. Cam, Q. Ha do, Y. Guan, J. S. Peiris, N. T. Chinh, T. T. Hien und J. Farrar (2006). "Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia." Nat Med **12**(10): 1203-1207.
- de la Luna, S., P. Fortes, A. Beloso und J. Ortin (1995). "Influenza virus NS1 protein enhances the rate of translation initiation of viral mRNAs." J Virol **69**(4): 2427-2433.
- Desselberger, U., V. R. Racaniello, J. J. Zazra und P. Palese (1980). "The 3' and 5'-terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity." Gene **8**(3): 315-328.
- Dias, A., D. Bouvier, T. Crepin, A. A. McCarthy, D. J. Hart, F. Baudin, S. Cusack und R. W. Ruigrok (2009). "The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit." Nature **458**(7240): 914-918.
- Digard, P., D. Elton, K. Bishop, E. Medcalf, A. Weeds und B. Pope (1999). "Modulation of nuclear localization of the influenza virus nucleoprotein through interaction with actin filaments." J Virol **73**(3): 2222-2231.
- Donelan, N. R., C. F. Basler und A. Garcia-Sastre (2003). "A recombinant influenza A virus expressing an RNA-binding-defective NS1 protein induces high levels of beta interferon and is attenuated in mice." J Virol **77**(24): 13257-13266.
- Doorbar, J. (2006). "Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer." Clin Sci (Lond) **110**(5): 525-541.
- Ducatez, M. F., C. M. Olinger, A. A. Owoade, S. De Landtsheer, W. Ammerlaan, H. G. Niesters, A. D. Osterhaus, R. A. Fouchier und C. P. Muller (2006). "Avian flu: multiple introductions of H5N1 in Nigeria." Nature **442**(7098): 37.
- Egorov, A., S. Brandt, S. Sereinig, J. Romanova, B. Ferko, D. Katinger, A. Grassauer, G. Alexandrova, H. Katinger und T. Muster (1998). "Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells." J Virol **72**(8): 6437-6441.
- Ehrhardt, C. und S. Ludwig (2009). "A new player in a deadly game: influenza viruses and the PI3K/Akt signalling pathway." Cell Microbiol **11**(6): 863-871.
- Ehrhardt, C., T. Wolff, S. Pleschka, O. Planz, W. Beermann, J. G. Bode, M. Schmolke und S. Ludwig (2007). "Influenza A virus NS1 protein activates the PI3K/Akt pathway to mediate antiapoptotic signaling responses." J Virol **81**(7): 3058-3067.
- Falcon, A. M., P. Fortes, R. M. Marion, A. Beloso und J. Ortin (1999). "Interaction of influenza virus NS1 protein and the human homologue of Staufin in vivo and in vitro." Nucleic Acids Res **27**(11): 2241-2247.

- Flick, R., G. Neumann, E. Hoffmann, E. Neumeier und G. Hobom (1996). "Promoter elements in the influenza vRNA terminal structure." *RNA* **2**(10): 1046-1057.
- Fortes, P., A. Beloso und J. Ortin (1994). "Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks mRNA nucleocytoplasmic transport." *EMBO J* **13**(3): 704-712.
- Fouchier, R. A., V. Munster, A. Wallensten, T. M. Bestebroer, S. Herfst, D. Smith, G. F. Rimmelzwaan, B. Olsen und A. D. Osterhaus (2005). "Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls." *J Virol* **79**(5): 2814-2822.
- Gabriel, G., M. Abram, B. Keiner, R. Wagner, H. D. Klenk und J. Stech (2007). "Differential polymerase activity in avian and mammalian cells determines host range of influenza virus." *J Virol* **81**(17): 9601-9604.
- Gabriel, G., A. Herwig und H. D. Klenk (2008). "Interaction of polymerase subunit PB2 and NP with importin alpha1 is a determinant of host range of influenza A virus." *PLoS Pathog* **4**(2): e11.
- Gack, M. U., R. A. Albrecht, T. Urano, K. S. Inn, I. C. Huang, E. Carnero, M. Farzan, S. Inoue, J. U. Jung und A. Garcia-Sastre (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): 439-449.
- Gao, W., A. C. Soloff, X. Lu, A. Montecalvo, D. C. Nguyen, Y. Matsuoka, P. D. Robbins, D. E. Swayne, R. O. Donis, J. M. Katz, S. M. Barratt-Boyes und A. Gambotto (2006). "Protection of mice and poultry from lethal H5N1 avian influenza virus through adenovirus-based immunization." *J Virol* **80**(4): 1959-1964.
- Garaigorta, U. und J. Ortin (2007). "Mutation analysis of a recombinant NS replicon shows that influenza virus NS1 protein blocks the splicing and nucleo-cytoplasmic transport of its own viral mRNA." *Nucleic Acids Res* **35**(14): 4573-4582.
- Garcia-Sastre, A. (2001). "Inhibition of interferon-mediated antiviral responses by influenza A viruses and other negative-strand RNA viruses." *Virology* **279**(2): 375-384.
- Garcia-Sastre, A., A. Egorov, D. Matassov, S. Brandt, D. E. Levy, J. E. Durbin, P. Palese und T. Muster (1998). "Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems." *Virology* **252**(2): 324-330.
- Garcia, M. A., J. Gil, I. Ventoso, S. Guerra, E. Domingo, C. Rivas und M. Esteban (2006). "Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action." *Microbiol Mol Biol Rev* **70**(4): 1032-1060.
- Glaunsinger, B. A., S. S. Lee, M. Thomas, L. Banks und R. Javier (2000). "Interactions of the PDZ-protein MAGI-1 with adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus E6 oncoproteins." *Oncogene* **19**(46): 5270-5280.
- Gomez-Puertas, P., C. Albo, E. Perez-Pastrana, A. Vivo und A. Portela (2000). "Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding." *J Virol* **74**(24): 11538-11547.
- Govorkova, E. A., J. E. Rehg, S. Krauss, H. L. Yen, Y. Guan, M. Peiris, T. D. Nguyen, T. H. Hanh, P. Puthavathana, H. T. Long, C. Buranathai, W. Lim, R. G. Webster und E. Hoffmann (2005). "Lethality to ferrets of H5N1 influenza viruses isolated from humans and poultry in 2004." *J Virol* **79**(4): 2191-2198.
- Goyal, P., D. Pandey und W. Siess (2006). "Phosphorylation-dependent regulation of unique nuclear and nucleolar localization signals of LIM kinase 2 in endothelial cells." *J Biol Chem* **281**(35): 25223-25230.
- Greenspan, D., P. Palese und M. Krystal (1988). "Two nuclear location signals in the influenza virus NS1 nonstructural protein." *J Virol* **62**(8): 3020-3026.
- Guan, Y., L. L. Poon, C. Y. Cheung, T. M. Ellis, W. Lim, A. S. Lipatov, K. H. Chan, K. M. Sturm-Ramirez, C. L. Cheung, Y. H. Leung, K. Y. Yuen, R. G. Webster und J. S. Peiris (2004). "H5N1 influenza: a protean pandemic threat." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(21): 8156-8161.

- Hale, B. G. und R. E. Randall (2007). "PI3K signalling during influenza A virus infections." Biochem Soc Trans **35**(Pt 2): 186-187.
- Hale, B. G., R. E. Randall, J. Ortin und D. Jackson (2008). "The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses." J Gen Virol **89**(Pt 10): 2359-2376.
- Hale, B. G., R. E. Randall, J. Ortin und D. Jackson (2008a). "The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses." J Gen Virol **89**(Pt 10): 2359-2376.
- Han, J., Y. Wang, S. Wang und C. Chi (2008). "Interaction of Mint3 with Furin regulates the localization of Furin in the trans-Golgi network." J Cell Sci **121**(Pt 13): 2217-2223.
- Harris, B. Z. und W. A. Lim (2001). "Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly." J Cell Sci **114**(Pt 18): 3219-3231.
- Hatada, E., S. Saito und R. Fukuda (1999). "Mutant influenza viruses with a defective NS1 protein cannot block the activation of PKR in infected cells." J Virol **73**(3): 2425-2433.
- Hatta, M., P. Gao, P. Halfmann und Y. Kawaoka (2001). "Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses." Science **293**(5536): 1840-1842.
- Helenius, A. (1992). "Unpacking the incoming influenza virus." Cell **69**(4): 577-578.
- Hirst, G. K. (1941). "The Agglutination of Red Cells by Allantoic Fluid of Chick Embryos Infected with Influenza Virus." Science **94**(2427): 22-23.
- Hoffmann, B., T. Harder, E. Starick, K. Depner, O. Werner und M. Beer (2007). "Rapid and highly sensitive pathotyping of avian influenza A H5N1 virus by using real-time reverse transcription-PCR." J Clin Microbiol **45**(2): 600-603.
- Hoffmann, E., G. Neumann, Y. Kawaoka, G. Hobom und R. G. Webster (2000). "A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(11): 6108-6113.
- Hoffmann, E., J. Stech, Y. Guan, R. G. Webster und D. R. Perez (2001). "Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses." Arch Virol **146**(12): 2275-2289.
- Hui, K. P., S. M. Lee, C. Y. Cheung, I. H. Ng, L. L. Poon, Y. Guan, N. Y. Ip, A. S. Lau und J. S. Peiris (2009). "Induction of proinflammatory cytokines in primary human macrophages by influenza A virus (H5N1) is selectively regulated by IFN regulatory factor 3 and p38 MAPK." J Immunol **182**(2): 1088-1098.
- Hulse-Post, D. J., J. Franks, K. Boyd, R. Salomon, E. Hoffmann, H. L. Yen, R. J. Webby, D. Walker, T. D. Nguyen und R. G. Webster (2007). "Molecular changes in the polymerase genes (PA and PB1) associated with high pathogenicity of H5N1 influenza virus in mallard ducks." J Virol **81**(16): 8515-8524.
- Humbert, P., S. Russell und H. Richardson (2003). "Dlg, Scribble and Lgl in cell polarity, cell proliferation and cancer." Bioessays **25**(6): 542-553.
- Hung, A. Y. und M. Sheng (2002). "PDZ domains: structural modules for protein complex assembly." J Biol Chem **277**(8): 5699-5702.
- Ichinohe, T., S. Tamura, A. Kawaguchi, A. Ninomiya, M. Imai, S. Itamura, T. Odagiri, M. Tashiro, H. Takahashi, H. Sawa, W. M. Mitchell, D. R. Strayer, W. A. Carter, J. Chiba, T. Kurata, T. Sata und H. Hasegawa (2007). "Cross-protection against H5N1 influenza virus infection is afforded by intranasal inoculation with seasonal trivalent inactivated influenza vaccine." J Infect Dis **196**(9): 1313-1320.
- Jackson, D., M. J. Hossain, D. Hickman, D. R. Perez und R. A. Lamb (2008). "A new influenza virus virulence determinant: The NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(11): 4381-4386.
- Jacobs, B. L. und J. O. Langland (1996). "When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA." Virology **219**(2): 339-349.



- Javier, R. T. (2008). "Cell polarity proteins: common targets for tumorigenic human viruses." *Oncogene* **27**(55): 7031-7046.
- Kates, M., A. C. Allison, D. A. Tyrell und A. T. James (1962). "Origin of lipids in influenza virus." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **27**: 293-301.
- Kawaoka, Y. und R. G. Webster (1988). "Sequence requirements for cleavage activation of influenza virus hemagglutinin expressed in mammalian cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(2): 324-328.
- Kido, H., M. Murakami, K. Oba, Y. Chen und T. Towatari (1999). "Cellular proteinases trigger the infectivity of the influenza A and Sendai viruses." *Mol Cells* **9**(3): 235-244.
- Kim, E. und M. Sheng (2004). "PDZ domain proteins of synapses." *Nat Rev Neurosci* **5**(10): 771-781.
- Klenk, H. D. und W. Garten (1994). "Host cell proteases controlling virus pathogenicity." *Trends Microbiol* **2**(2): 39-43.
- Kochs, G., A. Garcia-Sastre und L. Martinez-Sobrido (2007). "Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein." *J Virol* **81**(13): 7011-7021.
- Kozlov, G., K. Gehring und I. Ekiel (2000). "Solution structure of the PDZ2 domain from human phosphatase hPTP1E and its interactions with C-terminal peptides from the Fas receptor." *Biochemistry* **39**(10): 2572-2580.
- Kuzuhara, T., D. Kise, H. Yoshida, T. Horita, Y. Murazaki, A. Nishimura, N. Echigo, H. Utsunomiya und H. Tsuge (2009). "Structural basis of the influenza A virus RNA polymerase PB2 RNA-binding domain containing the pathogenicity-determinant lysine 627 residue." *J Biol Chem* **284**(11): 6855-6860.
- Letunic, I., T. Doerks und P. Bork (2009). "SMART 6: recent updates and new developments." *Nucleic Acids Res* **37**(Database issue): D229-232.
- Li, K. S., Y. Guan, J. Wang, G. J. Smith, K. M. Xu, L. Duan, A. P. Rahardjo, P. Puthavathana, C. Buranathai, T. D. Nguyen, A. T. Estoepangestie, A. Chaisingh, P. Auewarakul, H. T. Long, N. T. Hanh, R. J. Webby, L. L. Poon, H. Chen, K. F. Shortridge, K. Y. Yuen, R. G. Webster und J. S. Peiris (2004). "Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia." *Nature* **430**(6996): 209-213.
- Li, S., J. Y. Min, R. M. Krug und G. C. Sen (2006). "Binding of the influenza A virus NS1 protein to PKR mediates the inhibition of its activation by either PACT or double-stranded RNA." *Virology* **349**(1): 13-21.
- Li, Y., Y. Yamakita und R. M. Krug (1998). "Regulation of a nuclear export signal by an adjacent inhibitory sequence: the effector domain of the influenza virus NS1 protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(9): 4864-4869.
- Li, Z., H. Chen, P. Jiao, G. Deng, G. Tian, Y. Li, E. Hoffmann, R. G. Webster, Y. Matsuoka und K. Yu (2005). "Molecular basis of replication of duck H5N1 influenza viruses in a mammalian mouse model." *J Virol* **79**(18): 12058-12064.
- Li, Z., Y. Jiang, P. Jiao, A. Wang, F. Zhao, G. Tian, X. Wang, K. Yu, Z. Bu und H. Chen (2006). "The NS1 gene contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses." *J Virol* **80**(22): 11115-11123.
- Lin, D., J. Lan und Z. Zhang (2007). "Structure and function of the NS1 protein of influenza A virus." *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **39**(3): 155-162.
- Lu, Y., X. Y. Qian und R. M. Krug (1994). "The influenza virus NS1 protein: a novel inhibitor of pre-mRNA splicing." *Genes Dev* **8**(15): 1817-1828.
- Lu, Y., M. Wambach, M. G. Katze und R. M. Krug (1995). "Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor." *Virology* **214**(1): 222-228.
- Ludford-Menting, M. J., J. Oliaro, F. Sacirbegovic, E. T. Cheah, N. Pedersen, S. J. Thomas, A. Pasam, R. Iazzolino, L. E. Dow, N. J. Waterhouse, A. Murphy, S. Ellis,

- M. J. Smyth, M. H. Kershaw, P. K. Darcy, P. O. Humbert und S. M. Russell (2005). "A network of PDZ-containing proteins regulates T cell polarity and morphology during migration and immunological synapse formation." *Immunity* **22**(6): 737-748.
- Luo, G. X., W. Luytjes, M. Enami und P. Palese (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): 2861-2867.
- Lycett, S. J., M. J. Ward, F. I. Lewis, A. F. Poon, S. L. Kosakovsky Pond und A. J. Brown (2009). "Detection of mammalian virulence determinants in highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses: multivariate analysis of published data." *J Virol* **83**(19): 9901-9910.
- Ma, W., D. Brenner, Z. Wang, B. Dauber, C. Ehrhardt, K. Hogner, S. Herold, S. Ludwig, T. Wolff, K. Yu, J. A. Richt, O. Planz und S. Pleschka (2009). "The NS-segment of an H5N1 highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) is sufficient to alter Replication Efficiency, cell tropism and host range of an H7N1 HPAIV." *J Virol*.
- Maines, T. R., X. H. Lu, S. M. Erb, L. Edwards, J. Guarner, P. W. Greer, D. C. Nguyen, K. J. Szretter, L. M. Chen, P. Thawatsupha, M. Chittaganpitch, S. Waicharoen, D. T. Nguyen, T. Nguyen, H. H. Nguyen, J. H. Kim, L. T. Hoang, C. Kang, L. S. Phuong, W. Lim, S. Zaki, R. O. Donis, N. J. Cox, J. M. Katz und T. M. Tumpey (2005). "Avian influenza (H5N1) viruses isolated from humans in Asia in 2004 exhibit increased virulence in mammals." *J Virol* **79**(18): 11788-11800.
- Manche, L., S. R. Green, C. Schmedt und M. B. Mathews (1992). "Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI." *Mol Cell Biol* **12**(11): 5238-5248.
- Massin, P., S. van der Werf und N. Naffakh (2001). "Residue 627 of PB2 is a determinant of cold sensitivity in RNA replication of avian influenza viruses." *J Virol* **75**(11): 5398-5404.
- Matlin, K. S., H. Reggio, A. Helenius und K. Simons (1981). "Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line." *J Cell Biol* **91**(3 Pt 1): 601-613.
- Mazur, I., D. Anhlan, D. Mitzner, L. Wixler, U. Schubert und S. Ludwig (2008). "The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein." *Cell Microbiol* **10**(5): 1140-1152.
- McAuley, J. L., F. Hornung, K. L. Boyd, A. M. Smith, R. McKeon, J. Bennink, J. W. Yewdell und J. A. McCullers (2007). "Expression of the 1918 influenza A virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia." *Cell Host Microbe* **2**(4): 240-249.
- Melen, K., L. Kinnunen, R. Fagerlund, N. Ikonen, K. Y. Twu, R. M. Krug und I. Julkunen (2007). "Nuclear and nucleolar targeting of influenza A virus NS1 protein: striking differences between different virus subtypes." *J Virol* **81**(11): 5995-6006.
- Min, J. Y., S. Li, G. C. Sen und R. M. Krug (2007). "A site on the influenza A virus NS1 protein mediates both inhibition of PKR activation and temporal regulation of viral RNA synthesis." *Virology* **363**(1): 236-243.
- Modrow, S. und Falke, D. (1998). "Molekulare Virologie." *Spektrum Akad. Verlag*. Heidelberg, Berlin, Oxford; 1. korrigierter Nachdruck. ISBN 3-86025-274-7
- Munster, V. J. und R. A. Fouchier (2009). "Avian influenza virus: of virus and bird ecology." *Vaccine* **27**(45): 6340-6344.
- Nanduri, S., B. W. Carpick, Y. Yang, B. R. Williams und J. Qin (1998). "Structure of the double-stranded RNA-binding domain of the protein kinase PKR reveals the molecular basis of its dsRNA-mediated activation." *Embo J* **17**(18): 5458-5465.
- Nemeroff, M. E., X. Y. Qian und R. M. Krug (1995). "The influenza virus NS1 protein forms multimers in vitro and in vivo." *Virology* **212**(2): 422-428.
- Neumann, G., G. G. Brownlee, E. Fodor und Y. Kawaoka (2004). "Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation." *Curr Top Microbiol Immunol* **283**: 121-143.



- Neumann, G., T. Noda und Y. Kawaoka (2009). "Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus." Nature **459**(7249): 931-939.
- Newby, C. M., L. Sabin und A. Pekosz (2007). "The RNA binding domain of influenza A virus NS1 protein affects secretion of tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interferon in primary murine tracheal epithelial cells." J Virol **81**(17): 9469-9480.
- Niethammer, M., J. G. Valtschanoff, T. M. Kapoor, D. W. Allison, R. J. Weinberg, A. M. Craig und M. Sheng (1998). "CRIPT, a novel postsynaptic protein that binds to the third PDZ domain of PSD-95/SAP90." Neuron **20**(4): 693-707.
- O'Neill, R. E., J. Talon und P. Palese (1998). "The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins." EMBO J **17**(1): 288-296.
- Obenauer, J. C., J. Denson, P. K. Mehta, X. Su, S. Mukatira, D. B. Finkelstein, X. Xu, J. Wang, J. Ma, Y. Fan, K. M. Rakestraw, R. G. Webster, E. Hoffmann, S. Krauss, J. Zheng, Z. Zhang und C. W. Naeve (2006). "Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates." Science **311**(5767): 1576-1580.
- Okajima, M., M. Takahashi, M. Higuchi, T. Ohsawa, S. Yoshida, Y. Yoshida, M. Oie, Y. Tanaka, F. Gejyo und M. Fujii (2008). "Human T-cell leukemia virus type 1 Tax induces an aberrant clustering of the tumor suppressor Scribble through the PDZ domain-binding motif dependent and independent interaction." Virus Genes **37**(2): 231-240.
- Palese, P. (1977). "The genes of influenza virus." Cell **10**(1): 1-10.
- Palese, P., K. Tobita, M. Ueda und R. W. Compans (1974). "Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase." Virology **61**(2): 397-410.
- Parvin, J. D., J. F. Young und P. Palese (1983). "Nonsense mutations affecting the lengths of the NS1 nonstructural proteins of influenza A virus isolates." Virology **128**(2): 512-517.
- Pathak, V. K., D. Schindler und J. W. Hershey (1988). "Generation of a mutant form of protein synthesis initiation factor eIF-2 lacking the site of phosphorylation by eIF-2 kinases." Mol Cell Biol **8**(2): 993-995.
- Peiris, J. S., W. C. Yu, C. W. Leung, C. Y. Cheung, W. F. Ng, J. M. Nicholls, T. K. Ng, K. H. Chan, S. T. Lai, W. L. Lim, K. Y. Yuen und Y. Guan (2004). "Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease." Lancet **363**(9409): 617-619.
- Peters, G. A., D. Khoo, I. Mohr und G. C. Sen (2002). "Inhibition of PACT-mediated activation of PKR by the herpes simplex virus type 1 Us11 protein." J Virol **76**(21): 11054-11064.
- Pinto, L. H., L. J. Holsinger und R. A. Lamb (1992). "Influenza virus M2 protein has ion channel activity." Cell **69**(3): 517-528.
- Platanias, L. C. (2005). "Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling." Nat Rev Immunol **5**(5): 375-386.
- Qiu, Y., M. Nemeroff und R. M. Krug (1995). "The influenza virus NS1 protein binds to a specific region in human U6 snRNA and inhibits U6-U2 and U6-U4 snRNA interactions during splicing." RNA **1**(3): 304-316.
- Randall, R. E. und S. Goodbourn (2008). "Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures." J Gen Virol **89**(Pt 1): 1-47.
- Sadler, A. J. und B. R. Williams (2007). "Structure and function of the protein kinase R." Curr Top Microbiol Immunol **316**: 253-292.
- Salomon, R., J. Franks, E. A. Govorkova, N. A. Ilyushina, H. L. Yen, D. J. Hulse-Post, J. Humberd, M. Trichet, J. E. Rehg, R. J. Webby, R. G. Webster und E. Hoffmann (2006). "The polymerase complex genes contribute to the high virulence of the human H5N1 influenza virus isolate A/Vietnam/1203/04." J Exp Med **203**(3): 689-697.

- Salvatore, M., C. F. Basler, J. P. Parisien, C. M. Horvath, S. Bourmakina, H. Zheng, T. Muster, P. Palese und A. Garcia-Sastre (2002). "Effects of influenza A virus NS1 protein on protein expression: the NS1 protein enhances translation and is not required for shutoff of host protein synthesis." *J Virol* **76**(3): 1206-1212.
- Samuel, C. E. (1993). "The eIF-2 alpha protein kinases, regulators of translation in eukaryotes from yeasts to humans." *J Biol Chem* **268**(11): 7603-7606.
- Sanger, F., S. Nicklen und A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-5467.
- Schmolke, M., D. Viemann, J. Roth und S. Ludwig (2009). "Essential impact of NF-kappaB signaling on the H5N1 influenza A virus-induced transcriptome." *J Immunol* **183**(8): 5180-5189.
- Seo, S. H., E. Hoffmann und R. G. Webster (2004). "The NS1 gene of H5N1 influenza viruses circumvents the host anti-viral cytokine responses." *Virus Res* **103**(1-2): 107-113.
- Shea, K. F., C. M. Wells, A. P. Garner und G. E. Jones (2008). "ROCK1 and LIMK2 interact in spread but not blebbing cancer cells." *PLoS One* **3**(10): e3398.
- Shin, Y. K., Y. Li, Q. Liu, D. H. Anderson, L. A. Babiuk und Y. Zhou (2007). "SH3 binding motif 1 in influenza A virus NS1 protein is essential for PI3K/Akt signaling pathway activation." *J Virol* **81**(23): 12730-12739.
- Skehel, J. J. und D. C. Wiley (2000). "Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin." *Annu Rev Biochem* **69**: 531-569.
- Skorko, R., D. F. Summers und J. M. Galarza (1991). "Influenza A virus in vitro transcription: roles of NS1 and NP proteins in regulating RNA synthesis." *Virology* **180**(2): 668-677.
- Sone, K., S. Nakagawa, K. Nakagawa, S. Takizawa, Y. Matsumoto, K. Nagasaka, T. Tsuruga, H. Hiraike, O. Hiraike-Wada, Y. Miyamoto, K. Oda, T. Yasugi, K. Kugu, T. Yano und Y. Taketani (2008). "hScrib, a human homologue of Drosophila neoplastic tumor suppressor, is a novel death substrate targeted by caspase during the process of apoptosis." *Genes Cells* **13**(7): 771-785.
- Songyang, Z., A. S. Fanning, C. Fu, J. Xu, S. M. Marfatia, A. H. Chishti, A. Crompton, A. C. Chan, J. M. Anderson und L. C. Cantley (1997). "Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains." *Science* **275**(5296): 73-77.
- Spaller, M. R. (2006). "Act globally, think locally: systems biology addresses the PDZ domain." *ACS Chem Biol* **1**(4): 207-210.
- Steel, J., A. C. Lowen, S. Mubareka und P. Palese (2009). "Transmission of influenza virus in a mammalian host is increased by PB2 amino acids 627K or 627E/701N." *PLoS Pathog* **5**(1): e1000252.
- Stieneke-Grober, A., M. Vey, H. Angliker, E. Shaw, G. Thomas, C. Roberts, H. D. Klenk und W. Garten (1992). "Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease." *EMBO J* **11**(7): 2407-2414.
- Suarez, D. L. und M. L. Perdue (1998). "Multiple alignment comparison of the non-structural genes of influenza A viruses." *Virus Res* **54**(1): 59-69.
- Subbarao, E. K., W. London und B. R. Murphy (1993). "A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range." *J Virol* **67**(4): 1761-1764.
- Subbarao, K., A. Klimov, J. Katz, H. Regnery, W. Lim, H. Hall, M. Perdue, D. Swayne, C. Bender, J. Huang, M. Hemphill, T. Rowe, M. Shaw, X. Xu, K. Fukuda und N. Cox (1998). "Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness." *Science* **279**(5349): 393-396.
- Sugrue, R. J. und A. J. Hay (1991). "Structural characteristics of the M2 protein of influenza A viruses: evidence that it forms a tetrameric channel." *Virology* **180**(2): 617-624.
- Suwannakhon, N., S. Pookorn, D. Sanguansermisri, C. Chamnanpood, P. Chamnanpood, R. Wongvilairat, S. Pongcharoen, P. R. Niumsup, D. Kunthalert und P.

- Sanguansermsri (2008). "Genetic characterization of nonstructural genes of H5N1 avian influenza viruses isolated in Thailand in 2004-2005." *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **39**(5): 837-847.
- Tan, S. L. und 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): 757-766.
- Tarendeau, F., T. Crepin, D. Guilligay, R. W. Ruigrok, S. Cusack und D. J. Hart (2008). "Host determinant residue lysine 627 lies on the surface of a discrete, folded domain of influenza virus polymerase PB2 subunit." *PLoS Pathog* **4**(8): e1000136.
- Tiley, L. S., M. Hagen, J. T. Matthews und M. Krystal (1994). "Sequence-specific binding of the influenza virus RNA polymerase to sequences located at the 5' ends of the viral RNAs." *J Virol* **68**(8): 5108-5116.
- To, K. F., P. K. Chan, K. F. Chan, W. K. Lee, W. Y. Lam, K. F. Wong, N. L. Tang, D. N. Tsang, R. Y. Sung, T. A. Buckley, J. S. Tam und A. F. Cheng (2001). "Pathology of fatal human infection associated with avian influenza A H5N1 virus." *J Med Virol* **63**(3): 242-246.
- Tran, T. H., T. L. Nguyen, T. D. Nguyen, T. S. Luong, P. M. Pham, V. C. Nguyen, T. S. Pham, C. D. Vo, T. Q. Le, T. T. Ngo, B. K. Dao, P. P. Le, T. T. Nguyen, T. L. Hoang, V. T. Cao, T. G. Le, D. T. Nguyen, H. N. Le, K. T. Nguyen, H. S. Le, V. T. Le, D. Christiane, T. T. Tran, J. Menno de, C. Schultsz, P. Cheng, W. Lim, P. Horby und J. Farrar (2004). "Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam." *N Engl J Med* **350**(12): 1179-1188.
- Vallenius, T. und T. P. Makela (2002). "Clik1: a novel kinase targeted to actin stress fibers by the CLP-36 PDZ-LIM protein." *J Cell Sci* **115**(Pt 10): 2067-2073.
- Vallenius, T., B. Scharm, A. Vesikansa, K. Luukko, R. Schafer und T. P. Makela (2004). "The PDZ-LIM protein RIL modulates actin stress fiber turnover and enhances the association of alpha-actinin with F-actin." *Exp Cell Res* **293**(1): 117-128.
- Wang, P., P. Palese und R. E. O'Neill (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): 1850-1856.
- Wang, W. und R. M. Krug (1996). "The RNA-binding and effector domains of the viral NS1 protein are conserved to different extents among influenza A and B viruses." *Virology* **223**(1): 41-50.
- Wang, W., K. Riedel, P. Lynch, C. Y. Chien, G. T. Montelione und R. M. Krug (1999). "RNA binding by the novel helical domain of the influenza virus NS1 protein requires its dimer structure and a small number of specific basic amino acids." *RNA* **5**(2): 195-205.
- Wang, X., C. F. Basler, B. R. Williams, R. H. Silverman, P. Palese und A. Garcia-Sastre (2002). "Functional replacement of the carboxy-terminal two-thirds of the influenza A virus NS1 protein with short heterologous dimerization domains." *J Virol* **76**(24): 12951-12962.
- Webster, R. G., W. J. Bean, O. T. Gorman, T. M. Chambers und Y. Kawaoka (1992). "Evolution and ecology of influenza A viruses." *Microbiol Rev* **56**(1): 152-179.
- Whittaker, G., M. Bui und A. Helenius (1996). "The role of nuclear import and export in influenza virus infection." *Trends Cell Biol* **6**(2): 67-71.
- Whittaker, G. R. (2001). "Intracellular trafficking of influenza virus: clinical implications for molecular medicine." *Expert Rev Mol Med* **2001**: 1-13.
- WHO (2005). "Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia." *Emerg Infect Dis* **11**(10): 1515-1521.
- Wolff, T. und S. Ludwig (2009). "Influenza viruses control the vertebrate type I interferon system: factors, mechanisms, and consequences." *J Interferon Cytokine Res* **29**(9): 549-557.

- Wolff, T., F. Zielecki, M. Abt, D. Voss, I. Semmler und M. Matthaei (2008). "Sabotage of antiviral signaling and effectors by influenza viruses." Biol Chem **389**(10): 1299-1305.
- Wright, P. F., Webster, R.G. (2007). Orthomyxoviruses. Fields Virology. D. M. Knipe. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. **5**: 1533-1579.
- Xie, Z., D. M. Romano und R. E. Tanzi (2005). "RNA interference-mediated silencing of X11alpha and X11beta attenuates amyloid beta-protein levels via differential effects on beta-amyloid precursor protein processing." J Biol Chem **280**(15): 15413-15421.
- Yasuda, J., S. Nakada, A. Kato, T. Toyoda und A. Ishihama (1993). "Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix." Virology **196**(1): 249-255.
- Yeh, J. H., S. S. Sidhu und A. C. Chan (2008). "Regulation of a late phase of T cell polarity and effector functions by Crtam." Cell **132**(5): 846-859.
- Yen, H. L., J. R. Aldridge, A. C. Boon, N. A. Ilyushina, R. Salomon, D. J. Hulse-Post, H. Marjuki, J. Franks, D. A. Boltz, D. Bush, A. S. Lipatov, R. J. Webby, J. E. Rehg und R. G. Webster (2009). "Changes in H5N1 influenza virus hemagglutinin receptor binding domain affect systemic spread." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(1): 286-291.
- Yen, H. L., N. A. Ilyushina, R. Salomon, E. Hoffmann, R. G. Webster und E. A. Govorkova (2007). "Neuraminidase inhibitor-resistant recombinant A/Vietnam/1203/04 (H5N1) influenza viruses retain their replication efficiency and pathogenicity in vitro and in vivo." J Virol **81**(22): 12418-12426.
- Yen, H. L., A. S. Monto, R. G. Webster und E. A. Govorkova (2005). "Virulence may determine the necessary duration and dosage of oseltamivir treatment for highly pathogenic A/Vietnam/1203/04 influenza virus in mice." J Infect Dis **192**(4): 665-672.
- Yin, C., J. A. Khan, G. V. Swapna, A. Ertekin, R. M. Krug, L. Tong und G. T. Montelione (2007). "Conserved surface features form the double-stranded RNA binding site of non-structural protein 1 (NS1) from influenza A and B viruses." J Biol Chem **282**(28): 20584-20592.
- Yoneyama, M., M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, S. Akira und T. Fujita (2004). "The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses." Nat Immunol **5**(7): 730-737.
- Zamarin, D., A. Garcia-Sastre, X. Xiao, R. Wang und P. Palese (2005). "Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1." PLoS Pathog **1**(1): e4.
- Zhirnov, O. P. und H. D. Klenk (2007). "Control of apoptosis in influenza virus-infected cells by up-regulation of Akt and p53 signaling." Apoptosis **12**(8): 1419-1432.
- Zhirnov, O. P., T. E. Konakova, T. Wolff und H. D. Klenk (2002). "NS1 protein of influenza A virus down-regulates apoptosis." J Virol **76**(4): 1617-1625.

## Publikationen

Florian Zielecki, Ilia Semmler, Donata Kalthoff, Susanne Mael, Achim D. Gruber, Martin Beer, and Thorsten Wolff. Pathogenicity determinants of virulent avian H5N1 influenza viruses in the mammalian host: The role of the C-terminal ESEV motif in the viral NS1 protein. J Virol **in preparation**.

Kolesnikova, L., Strecker, T., Morita, E., Zielecki, F., Mittler, E., Crump, C. and Becker, S. (2009) Vacuolar protein sorting pathway contributes to the release of Marburg virus. J Virol 83(5): 2327-2337.

Wolff, T., Zielecki, F., Abt, M., Voss, D., Semmler, I. and Matthaei, M. (2008). Sabotage of antiviral signaling and effectors by influenza viruses. Biol Chem 389(10): 1299-1305.

Groseth, A., Hoenen, T., Alimonti, J.B., Zielecki, F., Ebihara, H., Theriault, S., Stroher, U., Becker, S. and Feldmann, H. (2007). In vitro evaluation of antisense RNA efficacy against filovirus infection by use of reverse genetics. J Infect Dis 196 Suppl2: S382-389.

## Vortrag

Florian Zielecki, Ilia Semmler, Donata Kalthoff, Susanne Mael, Achim D. Gruber, Martin Beer, and Thorsten Wolff. Pathogenicity determinants of virulent avian H5N1 influenza viruses in the mammalian host: The role of the C-terminal ESEV motif in the viral NS1 protein. Euroflu Consortium Meeting; Frankfurt; November 2009

## Poster

Florian Zielecki, Ilia Semmler, and Thorsten Wolff. Analysing pathogenicity determinants of avian H5N1 influenza viruses in the mammalian host: The role of the PDZ recognition domain of the viral NS1 protein. Annual Meeting of the German Society for Virology; Leipzig; März 2009

Florian Zielecki, Ilia Semmler, and Thorsten Wolff. Analysing pathogenicity determinants of avian H5N1 influenza viruses in the mammalian host: The role of the PDZ recognition domain of the viral NS1 protein. Fifth Orthomyxovirus Research Conference; Freiburg; September 2009

Florian Zielecki, Ilia Semmler, Donata Kalthoff, Martin Beer, and Thorsten Wolff. Analysing pathogenicity determinants of avian H5N1 influenza viruses in the mammalian host: The role of the PDZ recognition domain of the viral NS1 protein. Symposium für Zoonosenforschung ;Berlin; Oktober 2009

Florian Zielecki, Ilia Semmler, Donata Kalthoff, Martin Beer, and Thorsten Wolff. Analysing pathogenicity determinants of avian H5N1 influenza viruses in the mammalian host: The role of the PDZ recognition domain of the viral NS1 protein. Nationales Symposium zur Influenzaforschung in Deutschland; Berlin; November 2009

## Danksagung

Bei Herrn PD Dr. Thorsten Wolff möchte ich mich sehr für die Betreuung und die die wissenschaftlich interessanten Diskussionen bedanken, sowie für die Möglichkeit meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe am Robert Koch-Institut anzufertigen.

Bei Herrn Prof. Dr. Mutzel möchte ich mich für seine Bereitschaft bedanken, diese Arbeit von Seiten der Freien Universität Berlin zu betreuen.

Ich danke PD. Dr. med. vet. Martin Beer und Dr. med. vet. Donata Kalthoff am Friedrich-Loeffler-Institut auf der Insel Riems und Prof. Dr. Achim Gruber und Dr. Susanne Mael vom Fachbereich Veterinärmedizin des Institutes für Tierpathologie der Freien Universität Berlin für die exelente Zusammenarbeit.

Ich danke allen ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Pathomechanismen von Influenzaviren P15“ und jetzigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Influenza/Respiratorische Viren FG17“ für die gute Zusammenarbeit, Hilfsbereitschaft und angenehme Arbeitsatmosphäre: Aline, Anne, Andrea, Daniel, Dorothea, Gudrun, Illia, Jana, Karsten, Markus, Melanie, Marion, Viola, Wiebke

Besonderer Dank an Vio, Melle und Anne, dass ihr mich so herzlich ins Büro mit aufgenommen habt.

Gudrun und Andrea danke ich nochmals für die Unterstützung im Laboralltag und ihr offenes Ohr für alle Fragen auch außerhalb des Labors.

Dank an Julia, Jania und Marion fürs Korrekturlesen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich von Anfang an tatkräftig unterstützen und meinen Brüdern, die für die nötige Ablenkung zwischendurch sorgen.

Mein herzlichster Dank geht an Julia für die Hoffnung, Zuversicht und Motivation in dieser arbeitsreichen Zeit.

Alles wird gut ... dieses Jahr!

---