

Analyse der Regulation der RNA-Synthese des Influenza A Virus durch das virale NS2 Protein

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. Karsten Hadenfeld
aus Köln

November 2008

Angefertigt November 2003-November 2008 unter der Leitung von PD Dr. Thorsten Wolff am Robert Koch-Institut Berlin.

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

Datum der Disputation: 09.03.2009

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Influenzaviren.....	1
1.1.1	Klassifizierung	2
1.1.2	Pathogenese	2
1.1.3	Immunologie	4
1.1.4	Epidemiologie	5
1.1.5	Struktur.....	6
1.1.6	Genomaufbau	7
1.1.7	Kodierte Proteine.....	8
1.1.7.1	PB1	9
1.1.7.2	PB2	9
1.1.7.3	PA	10
1.1.7.4	Das Hämagglutinin	10
1.1.7.5	Die Neuraminidase	11
1.1.7.6	Das Nukleoprotein NP	12
1.1.7.7	Die ‚Matrixproteine‘ M1 und M2	13
1.1.7.8	Die ‚Nichtstrukturproteine‘	14
1.1.8	Infektionszyklus	16
1.2	Virale RNA-Synthese.....	17
1.2.1	mRNA-Synthese.....	18
1.2.2	cRNA Synthese	20
1.2.3	vRNA Synthese	21
1.2.4	Regulation des viralen Vermehrungszyklus	21
1.2.4.1	Das Schaltermodell.....	21
1.2.4.2	Das Stabilisierungsmodell	22
1.2.4.3	Zeitliche Regulation der RNA-Synthese	24
1.2.4.4	Zelluläre Faktoren der RNA-Synthese	25
1.2.4.5	Virale Faktoren der RNA-Synthese.....	26
1.3	Transport über die Kernmembran.....	26
1.4	Fragestellung	28
2	MATERIAL UND METHODEN.....	29
2.1	Material.....	29
2.1.1	Virusstämme.....	29
2.1.2	Zelllinien	29
2.1.3	Bakterienstämme	29
2.1.4	Zellkulturmedien, Zusätze und Material	29
2.1.5	Medien für Bakterien.....	30
2.1.6	Plasmide	30
2.1.7	Oligonukleotide.....	31
2.1.8	Enzyme.....	31
2.1.9	Restriktionsendonukleasen.....	31
2.1.10	Kits	32
2.1.11	Primäre Antikörper.....	32
2.1.12	Sekundäre Antikörper.....	32
2.1.13	Puffer und Lösungen	32
2.1.14	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	34
2.1.15	Geräte	35
2.1.16	Software	36

2.2 Methoden	36
2.2.1 Zellkultur	36
2.2.1.1 Passage von Zellen	36
2.2.1.2 Einfrieren von Zellen	37
2.2.1.3 Infektion von Zellen	37
2.2.1.4 Transfektion von Zellen	38
2.2.2 Virologische Methoden	38
2.2.2.1 Virusanzucht im embryonierten Hühnerei	38
2.2.2.2 Plaquetest mittels Flüssigoverlay und Infrarotdetektion	39
2.2.2.3 Hämagglutinations-Test	40
2.2.2.4 Aufreinigen und Ankonzentrieren von Influenzaviren	41
2.2.2.5 Analyse viraler RNA	41
2.2.3 Zellbiologische und Molekularbiologische Methoden	41
2.2.3.1 Präparation von Plasmid-DNA und PCR Produkten	41
2.2.3.2 Reverse Genetik	42
2.2.3.3 Luziferase-Reportergen-Studien	43
2.2.3.4 Northern Blot	43
2.2.3.5 Primer Extension Analyse	45
2.2.3.6 DNA-Sequenzierung	47
2.2.4 Proteinanalytische Methoden	48
2.2.4.1 Bestimmung des Proteingehaltes von Lösungen	48
2.2.4.2 Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)	48
2.2.4.3 Immunoblot	49
2.2.4.4 Immunfluoreszenzmikroskopie	50
2.2.4.5 Immunpräzipitation	50
3 ERGEBNISSE	52
3.1 Das NS2 Protein verringert die Expression vRNA-ähnlicher Reportergenkonstrukte	52
3.2 Expression des NS2 Proteins führt zur Steigerung der vRNA-Replikation	55
3.3 Primer-Extension: Analyse der Expression aller drei viralen RNA-Spezies	57
3.4 Auswirkung von NS2 auf die drei viralen RNA-Spezies eines Influenza A Virus Minigenoms	59
3.5 NS2 interagiert mit der viralen Polymerase	61
3.6 Mutationsanalyse konservierter Aminosäuren im NS2 Protein	62
3.7 Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der mutierten NS2 Proteine	63
3.8 Einfluss mutierter NS2 Proteine auf die RNA-Synthese eines NA-Minigenoms	64
3.9 Plaquetest mit Avicel-Overlay im 48-Well Format	67
3.10 Generierung von rekombinanten Influenzaviren, die mutierte NS2 Proteine exprimieren	69
3.11 Lokalisation der mutierten NS2 Proteine und der Nukleoproteine in der Infektion	71
3.12 Untersuchung der RNA Synthese der rekombinanten Virusmutanten	73
3.13 Einfluss einer Plasmid-gestützten NS2 Überexpression auf eine Infektion mit Influenzaviren	75
4 DISKUSSION	78
4.1 Ziele dieser Arbeit	78

4.2 Einfluss des NS2 Proteins auf die mRNA Synthese der viralen Polymerase	79
4.3 Expression des NS2 Proteins führt zur Steigerung der Negativ-Strang-RNA-Replikation.....	79
4.4 NS2 interagiert mit dem viralen Polymerasekomplex	80
4.5 Mutationsanalyse konservierter Aminosäuren des NS2 Proteins	82
4.6 Auswirkung der NS2-Mutationen in rekombinanten Viren.....	85
4.7 Einfluss von transfiziertem NS2 auf die Infektion	87
4.8 Neues Regulationsmodell der RNA-Synthese von des Influenza A Virus	88
4.9 Ausblick	90
5 ZUSAMMENFASSUNG	92
6 ABSTRACT.....	94
7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	96
8 LITERATURVERZEICHNIS	99

1 Einleitung

Die Bezeichnung *Virus* stammt aus dem Lateinischen und bedeutet soviel wie Gift, Saft oder Schleim. Viren verursachen Krankheiten bei Menschen, Tieren und Pflanzen und sind seit 1892 mit der Entdeckung des Tabakmosaikvirus durch Dmitri Iwanowski bekannt. Viren sind definiert als intrazelluläre Parasiten, die keinen eigenen Stoffwechsel besitzen. Sie bestehen minimal aus einer Erbsubstanz, DNA oder RNA, und sind selbst nichtzellulär.

1.1 Influenzaviren

Influenzaviren sind die Erreger der echten Virus-Grippe. Die echte Grippe wird von grippalen Infekten unterschieden und verläuft meist mit stärkerer Symptomatik als die Letztgenannten. Sie wird durch Viren der Familie der Orthomyxoviren ausgelöst, nämlich Influenza-Viren der Typen A, B und seltener auch C. Der Name *Influenza* (Latein. „Einfluss“) beruht auf der im Altertum und bis ins Mittelalter vorherrschenden Meinung, alle Krankheiten gingen auf den Einfluss der Gestirne zurück. Heute wird nur eine durch Influenzaviren verursachte Erkrankung echte Virusgrippe bezeichnet.

Durch die saisonale Virusgrippe entstehen jährlich immense Kosten und es kommt zu Tausenden von Todesfällen. In der Saison 2006/2007 gab es z.B. in Deutschland ca. 2,7 Millionen Exzess-Konsultationen (über das normale Maß einer Grippewelle hinausgehende ärztliche Konsultationen) und ca. 14.400 Krankenhauseinweisungen (Saisonbericht der Arbeitsgemeinschaft Influenza 2007).

Das natürliche Wirtsreservoir der meisten Influenzaviren sind Wasservögel. Während Influenzavirusinfektionen bei Vögeln in vielen Fällen keine Symptome hervorrufen, kann es bei hochpathogenen Viren zu Epidemien kommen, bei denen Hunderttausende von Tieren sterben bzw. durch den Menschen vorsorglich getötet werden, um eine Weiterverbreitung der Viren zu verhindern. Die Gefährdung durch ein vom Tier zum Menschen und dann von Mensch zu Mensch übertragenes hochpathogenes Influenzavirus ist nicht zu unterschätzen. Das Beispiel der Spanischen Grippe von 1918 mit ca. 40 Millionen Opfern weltweit zeigt deutlich, welche Konsequenzen eine Pandemie, also eine weltweite Epidemie, mit einem humanpathogenen Influenzavirus haben kann.

1.1.1 Klassifizierung

Die Influenzaviren gehören zur Familie der Orthomyxoviren. Die *Orthomyxoviridae* (Griech.: *orthos* = richtig, *myxo* = Schleim) werden in fünf verschiedene Genera unterschieden, nämlich Influenza Typ A-, B-, C- sowie Togoto- und Isaviren. Die Unterscheidung der Influenzaviren wird anhand der unterschiedlichen antigenen Eigenschaften der Matrix-Proteine (M1) und Nukleoproteine (NP) der verschiedenen Typen getroffen. Die Influenza Viren des Typs A sind am besten erforscht, da diese sowohl die weiteste

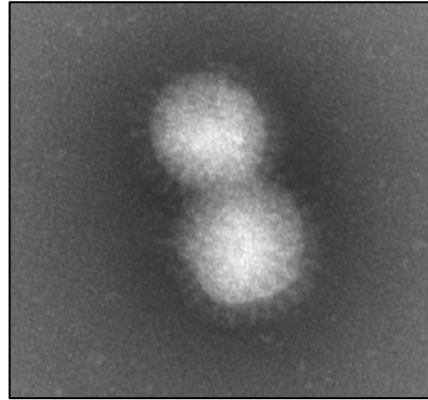


Abbildung 1.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme zweier Influenza A Virionen. (H5N1, mit freundlicher Genehmigung von Dr. N.Bannert)

Verbreitung aufweisen als auch das größte humanpathogene Potential darstellen.

Die Namensgebung der Influenzaviren erfolgt nach einer von der WHO (*World Health Organisation*) festgelegten Nomenklatur, in der zuerst der **Virus-Typ**, dann die **Spezies**, aus der das Virus isoliert wurde (entfällt für ein menschliches Isolat), der **Ort der Isolierung**, die **laufende Nummer** der Isolierung und am Ende das **Jahr der Isolierung** genannt werden. Bei Influenza A Viren wird zusätzlich noch der **Subtyp** angegeben. Die Subtypen werden nach ihren Oberflächenantigenen Hämagglutinin (HA, kurz H) und Neuraminidase (NA, kurz N) klassifiziert, von denen bis heute 16 verschiedene Subtypen für HA und 9 für NA bekannt sind. Ein Beispiel für ein menschliches Influenza A Virus ist Influenza A/Solomon Islands/3/2006 (H1N1), eine der beiden von der WHO für die Impfstoffherstellung empfohlenen Influenza A Virus Komponenten für die Saison 2006/2007 (WHO/EPR - Epidemic and Pandemic Alert Response).

1.1.2 Pathogenese

Die Virusgrippe zählt zu den respiratorischen Erkrankungen, da sich Influenzaviren im Menschen fast ausschließlich in den Epithelien des Atmungstraktes vermehren. Dies limitiert die Ausbreitung der Viren im Körper, ist aber gleichzeitig der Grund für eine rasche Ausbreitung der Viren über ausgeatmete Aerosole.

Die Symptome einer Influenzavirusinfektion sind divers, unter anderem Kopf- und Gliederschmerzen, trockener Husten und hohes Fieber, was dazu führt, dass Influenza

oft mit anderen Atemwegserkrankungen verwechselt wird. Kennzeichnend für Influenzavirusinfektionen ist vor allem das plötzliche, starke Auftreten der oben genannten Symptome und hohes Fieber, das oft innerhalb von 24 h auf 38-40 °C ansteigt (Wright et al., 2006).

Es wird zwischen der unkomplizierten Influenza und schweren Verläufen unterschieden. In den meisten Fällen ist die Influenza eine selbstlimitierende Erkrankung, bei der eine unterstützende und symptomatische Therapie ausreichend ist. Bei einem unkomplizierten Krankheitsverlauf kommt es zur Infektion des oberen Atemtraktes, also Rachen, Luftröhre und obere Bronchien. 48 h nach Infektion ist der Höhepunkt der Virusvermehrung zu verzeichnen, die dann stetig abnimmt, ehe es ca. 4-6 Tage später kaum noch zur Bildung von neuen Viren kommt (Richman et al., 1976). In Kindern können Viren dagegen bis zu 13 Tage nach Auftreten der Symptome nachgewiesen werden. Die höheren Titer und der längere Zeitraum der Virusproduktion bei Kindern sind die Ursache für deren Rolle bei der Verbreitung von Influenzaviren in der Bevölkerung (Wright et al., 2006).

Komplikationen treten häufiger bei älteren oder immunsuprimierten Menschen und Hochschwangeren auf. Die Vorschädigung der Epithelien durch Influenzaviren erleichtert eine Infektion mit anderen Erregern und so kommt es häufig zu einer bakteriellen Sekundärinfektion. Primäre virale Pneumonien, kombiniert viral-bakterielle- oder sekundäre bakterielle Pneumonien führen im schlimmsten Fall zum Tode des Patienten. Dabei kommt es im Gegensatz zum normalen Krankheitsverlauf, auch zu einem Befall des unteren Atemtraktes. Neben den Schäden in der Lunge kann es auch zu Muskelentzündungen, besonders des Herzmuskels (Myokartiden), leichten Formen von Virämie (Nachweis von Influenzaviren im Blut) oder Meningitis bzw. Encephalitis (Hirnhaut- oder Hirn-Entzündung) kommen.

Auf zellulärer Ebene unterdrücken die Viren die Proteinsynthese und induzieren in den befallenen Zellen Apoptose (Hinshaw et al., 1994). Regenerationsvorgänge der Epithelien beginnen ab dem fünften Tag, während noch Zellen sterben, aber es kann bis zu einem Monat dauern bis sich die Atemwege komplett regeneriert haben.

Seit 1997 treten vor allem in Südostasien immer wieder Transmissionen von aviären Influenzaviren auf den Menschen auf. Vor allem H5N1-Infektionen in den letzten Jahren, die aus engem Kontakt mit Nutz-Geflügel resultierten, haben Sterblichkeitsraten von über 60 % (WHO, *Epidemic and pandemic alert response*) gezeigt. Dass der H5N1-Asia-Subtyp im Vergleich zu anderen Serotypen pathogener

ist, kann unter anderem dadurch zustande kommen, dass diese Viren sich im Körper über die Atemwege hinaus ausbreiten, d.h. es kommt zu so genannten systemischen Infektionen. Zurzeit wird auch eine Überreaktion des Immunsystems diskutiert, die zu schlimmeren Krankheitsverläufen führt, weil die Immunabwehr nicht koordiniert ist und dadurch zur Selbstschädigung des Organismus führt. (Hyperzytokinämie, „Cytokine Burst/Storm“ (de Jong et al., 2006)).

1.1.3 Immunologie

Zu den ersten Abwehrmaßnahmen des Atmungstraktes gegen Infektionen gehören die Muzine der Schleimhaut (Barrierefunktion) und die Zilienbewegung der Epithelzellen. Im Falle einer Infektion wehrt sich der menschliche Organismus sowohl mit einer unspezifischen als auch mit einer spezifischen Immunantwort gegen die eingedrungenen Erreger.

Die angeborene oder unspezifische Immunantwort beginnt bei der Erkennung einer Influenzavirusinfektion mit der intrazellulären Detektion von Doppelstrang-RNA. Dies geschieht durch Sensorproteine wie RIG-I, die wiederum die Interferon- β Synthese induzieren (Opitz et al., 2007). Interferon- β sorgt dann über eine Rückkopplungsschleife für die Produktion von Interferon- α und dessen parakrine Sekretion. Die Aktivierung des Interferon- α/β Rezeptors der benachbarten Zellen führt über eine Signalkaskade zur Expression von über 100 verschiedenen Genprodukten (ISGs, Interferon stimulierte Gene). Diese etablieren in den Zellen ein für die Vermehrung der Viren ungeeignetes Milieu, in dem sie zum Beispiel den Abbau viraler und zellulärer Nukleinsäuren fördern (Samuel, 2001).

Die adaptive Immunantwort spielt eine große Rolle bei der Abwehr und letztendlichen Klärung einer Influenzavirusinfektion. Es werden Antikörper gegen HA, NA, NP und beide M Proteine produziert, wobei nur die Antikörper gegen HA und NA mit Resistenz gegen Infektion bzw. Krankheit assoziiert sind (Potter und Oxford, 1979). Antikörper gegen HA können eine Infektion verhindern in dem sie die Infektivität des Virus neutralisieren, wogegen die Antikörper gegen NA die Freisetzung von Viren erst nach erfolgter Infektion einer Zelle verhindern. Die zelluläre Immunität beruht auf zytotoxischen Lymphozyten, die in der Lage sind infizierte Zellen zu lysieren und gleichzeitig B-Zellen zur Produktion von Antikörpern anregen.

1.1.4 Epidemiologie

Inflenzaviren verursachen keine persistierenden oder latenten Infektionen im Menschen. Sie perpetuieren sich durch die Übertragung von Person zu Person in der Bevölkerung (Wright et al., 2006). In der nördlichen Hemisphäre ist die Influenza-Saison meist auf die Monate von Januar bis April beschränkt, in der südlichen Hemisphäre dagegen sind Inflenzaviren zwischen Mai und September nachweisbar. Die Übertragung erfolgt über Aerosole, seltener auch über Kontaktinfektionen (Wright et al., 2006).

Die saisonale Grippe (auch inter pandemische Grippe genannt) nimmt in manchen Jahren epidemische Ausmaße an, d.h. die Zahl der Infizierten, Kranken und der Gestorbenen gehen weit über das erwartete Maß hinaus. In Deutschland kommt es trotz Impfung und Verabreichung antiviraler Mittel zu durchschnittlich 10.000 Todesfällen im Jahr (Saisonabschlussbericht 2002/2003, Arbeitsgemeinschaft Influenza). Dies liegt unter anderem an einer immer noch nicht ausreichenden Impfquote in der Risikogruppe der über 65-jährigen (Mereckiene et al., 2008).

Inflenzaviren besitzen im Gegensatz zu den meisten anderen respiratorischen Viren zwei verschiedene Mechanismen, die ihnen eine Reinfektion von Menschen erlauben: *Antigen-Drift* und *Antigen-Shift* (Wright et al., 2006).

Antigen-Drift wird durch Punktmutationen in den beiden Hauptantigenen HA und NA verursacht, die in der Fehlerrate der viralen RNA-Polymerase begründet liegen. Diese hat keine Korrektur-Lesefunktion und eine dementsprechend hohe Fehlerrate. Wenn die dadurch auftretenden Mutationen antigenene Epitope betreffen, kann dies zu immunevasiven Virus-Varianten führen.

Das Austauschen von beliebigen Gensegmenten zwischen zwei verschiedenen Subtypen von Influenza A Viren während der Doppelinfektion eines Wirtes Reassortierung bezeichnet. Dieses Phänomen kann durch das Austauschen eines der beiden Hauptantigene, HA oder NA, zu einem Virus führen, für welches das Immunsystem des Wirtes völlig naiv ist. Diese Art der Reassortierung wird *Antigen-Shift* genannt.

Inflenzaviren haben im letzten Jahrhundert zu drei große Pandemien geführt. Die erste Pandemie, die ‚Spanische Grippe‘, wurde 1918 durch ein H1N1 Virus ausgelöst. Dieses Virus war nicht reassortiert, sondern war vermutlich ein reines Vogelvirus, das von Vögeln auf Schweine und von diesen auf den Mensch übertragen wurde. Erst durch

Antigene-Drift erwarb es die Möglichkeit der Übertragung von Mensch zu Mensch. Die zweite Pandemie wurde 1957 durch ein reassortiertes Virus hervorgerufen, in dem die Oberflächenantigene HA und NA sowie das PB1 Segment eines aviären H2N2 Stammes mit den restlichen Segmenten des H1N1 Stammes kombiniert waren. Im Jahr 1968 kam es zu einer dritten Pandemie durch ein H3N2 Virus, das ein aviäres HA enthielt welches nur 30 % Sequenzidentität zu dem H2 von 1957 besaß. Antikörper gegen die N2 Neuraminidase schützten allerdings gegen dieses Virus, so dass diese Pandemie weniger Todesopfer forderte als die beiden vorangegangenen. 1977 tauchte in Russland wieder ein H1N1 Virus auf, das seitdem mit dem H3N2 Virus in der menschlichen Bevölkerung koziirkuliert.

Außer den Influenza A Viren spielen auch Influenza B Viren in manchen Jahren eine große Rolle in den saisonalen Grippeepidemien. Allerdings besitzen Influenza B Viren aufgrund des Fehlens eines tierischen Reservoirs und verschiedener Subtypen kein pandemisches Potential.

1.1.5 Struktur

Die Struktur eines Influenza A Virions ist in Abbildung 1.2 schematisch dargestellt. Influenzaviren besitzen eine Lipidhülle, die beim Knospen der Viren von der Lipidmembran der Wirtszelle übernommen wird. Das Virion ist dabei meist rundlich mit einem Durchmesser von ca. 100 nm, kann allerdings auch pleomorph oder filamentös vorkommen, wobei in klinischen Isolaten häufig die filamentöse Morphologie überwiegt. Aus der Lipidschicht ragen die beiden Hauptantigene heraus, die Proteine Hämagglutinin und Neuraminidase, deren Spitzen auch deutlich im elektronen-mikroskopischen Bild zu erkennen sind (siehe auch Abbildung 1.1). Diese Spitzen dienen der Rezeptorbindung (HA) und dem Ablösen der Tochterviren von der Wirtszellmembran nach erfolgter Replikation (NA). Das Verhältnis der beiden Oberflächenantigene zueinander beträgt ungefähr vier HA- auf ein NA-Protein. Innerhalb der Lipiddoppelschicht der Virion-Hülle findet sich das M2-Protein, das als Protonenkanal bei der Freisetzung der Viren innerhalb der Wirtszelle eine Rolle spielt. Direkt unter der Virushülle liegt die Matrix, gebildet durch das Matrixprotein M1. Innerhalb dieser Matrix befinden sich die viralen Ribonukleoproteine (vRNPs), die sich aus den Polymerase-Proteinen PA (*Polymerase Acidic*), PB1 und PB2 (*Polymerase Basic*), dem Nukleoprotein NP sowie jeweils einem der acht verschiedenen Gensegmente zusammensetzen. In einer kürzlich erschienenen Studie (Shaw et al.,

2008) fanden sich außer den viralen Proteinen auch über 30 verschiedene zelluläre Proteine in gereinigten Virionen, aber es ist zurzeit noch unklar, welche davon spezifisch inkorporiert werden und ob die zellulären Proteine wichtig für den Infektionszyklus sind.

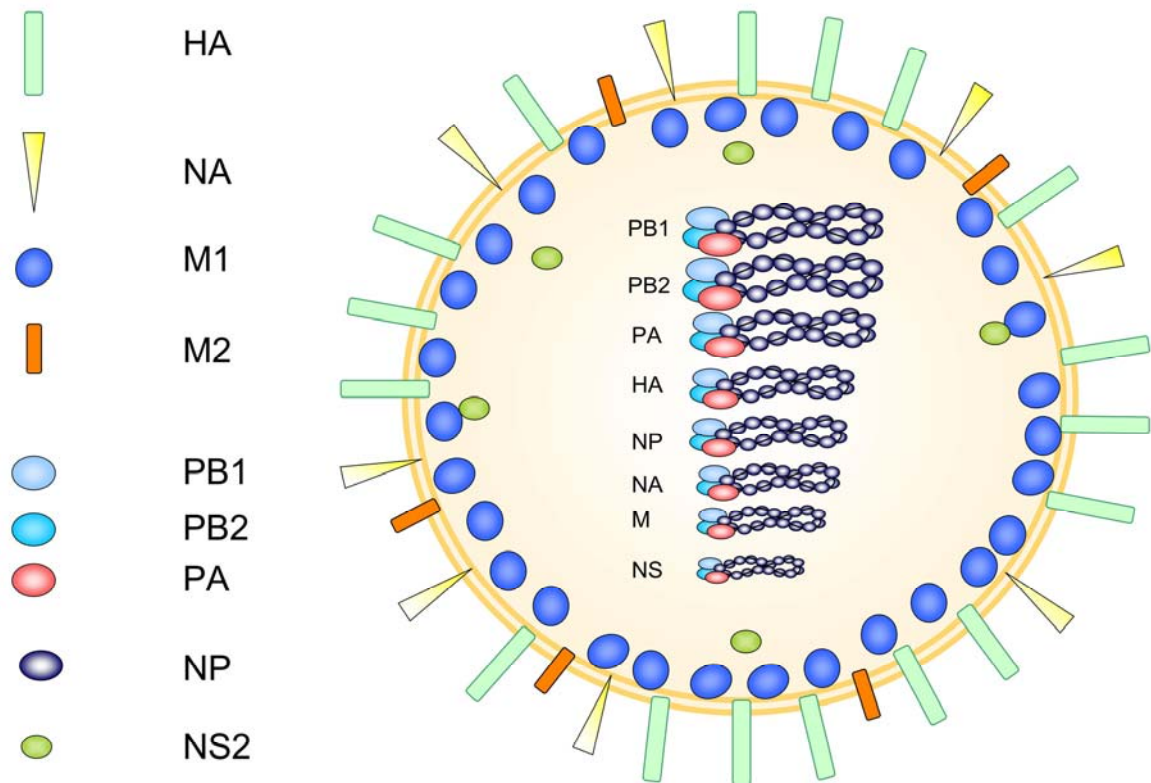


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung eines Influenza A Virions.

1.1.6 Genomaufbau

Das Genom der Influenzaviren besteht aus acht verschiedenen RNA-Segmenten negativer Polarität (virale RNA, vRNA). Negative Polarität bedeutet, dass die virale RNA komplementär zur zellulären mRNA (*messenger RNA*) ist, die *per definitionem* positive Polarität besitzt.

Jedes vRNA Segment enthält nichtkodierende Regionen am 3' und 5' Ende, siehe Abbildung 1.9. Die terminalen 12 bzw. 13 Basen am 3' respektive 5' Ende sind hochkonserviert und für alle Segmente nahezu identisch, während die folgenden nichtkodierenden Bereiche sich segmentspezifisch unterscheiden.

Zwei der acht Segmente (M und NS) kodieren für mRNAs, die gespleißt werden, wodurch jeweils zwei Proteine pro vRNA-Segment translatiert werden (Lamb and Choppin 1979; Lamb and Choppin 1981). Die meisten Influenza A Viren besitzen

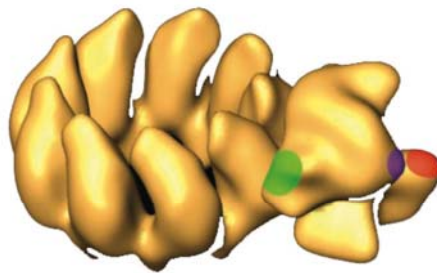
zudem noch ein Hilfsprotein namens PB1-F2, das durch einen alternativen Leserahmen am 5' Ende der PB1 RNA kodiert wird (Chen, Calvo et al. 2001). Insgesamt kodieren die acht Segmente also 11 verschiedene Proteine. Diese sind in Tabelle 1.1 zusammengefasst und werden im folgenden Abschnitt erläutert.

Tabelle 1-1: vRNA Segmente und kodierte Proteine eines Influenza A/Puerto Rico/8/34 Virus

Segment	vRNA (nt)	Kodierte Proteine (aa)	Funktion
1	2341	PB2 (759)	Bestandteil der viralen RNA-Polymerase, bindet an die mRNA-Kappe;
2	2341	PB1 (757) PB1-F2 (87)	Bestandteil der viralen RNA-Polymerase, Endonuklease-Aktivität, Elongation; Proapoptotische Aktivität;
3	2233	PA (716)	Bestandteil der viralen RNA-Polymerase, Protease;
4	1778	HA (550)	Oberflächenglykoprotein, Rezeptorbindung, Fusionsaktivität, Hauptantigen;
5	1565	NP (498)	RNA-Bindung, RNA-Synthese, Kernimport;
6	1413	NA (454)	Oberflächenglykoprotein, Neuraminidaseaktivität;
7	1027	M1 (252) M2 (97)	Matrixprotein, Interaktion mit vRNPs und Oberflächenproteinen, Kernexport Membranprotein, Ionenkanal
8	890	NS1 (230) NS2 (121)	Multifunktional, viraler Interferon-Antagonist Kernexport der vRNPs

1.1.7 Kodierte Proteine

Die drei größten Proteine des Virus bilden zusammen die multifunktionale virale Polymerase (Abbildung 1.3).



Grün = C-Terminale Region von **PB1**
Violett = C-Terminale Region von **PA**
Rot = N-Terminale Region von **PB2**

Abbildung 1.3 Aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen erstelltes 3D-Modell eines Influenza A Virus Ribonukleoprotein-Komplexes (vRNP), bestehend aus den drei Polymeraseuntereinheiten, NP und einer 248 Nukleotide langen Modell-vRNA. Das Modell hat eine Auflösung von 23 Å (2,3 nm). Links befindet sich eine Schlaufe von Nukleoproteinen, um welche die RNA gewickelt ist, und rechts ist der trimere Polymerasekomplex angebunden (Area et al., 2004).

Obwohl biochemische Befunde auf einen tandemartig zusammengebauten Komplex (PA-PB1-PB2) hinwiesen (Biswas et al., 1998; Gonzalez und Ortin, 1999; Poole et al., 2004), ist der Polymerasekomplex gemäß einer 3D Strukturanalyse durch Elektronenmikroskopie und elektronische Bildverarbeitung sehr kompakt, (Area et al., 2004)).

1.1.7.1 PB1

PB1 ist das größere der beiden basischen Polymeraseproteine und besitzt das aktive Zentrum der Polymerasefunktion mit vier entsprechend konservierten Sequenzmotiven (Ishihama und Barbier, 1994) sowie einer Bindungsstelle für Nukleotide. Es bindet sowohl an PB2 als auch an PA und stellt damit das Rückgrat des ternären Polymerasekomplexes (Digard et al., 1989). Außerdem bindet PB1 an vRNA und cRNA (*copy* oder *complementary* RNA) und initiiert damit die virale Transkription respektive die Replikation. Des Weiteren besitzt PB1 eine Endonuklease-Aktivität, die die Wirtszell-mRNA 10-14 Nukleotide nach der 7-Methylguanidin-Kappe schneidet (Li et al., 2001). 2001 wurde das 87 Aminosäuren lange PB1-F2 Protein identifiziert, das von den meisten jedoch nicht allen Influenza A Viren exprimiert wird, also nicht essentiell ist und deswegen auch als ‚Hilfsprotein‘ bezeichnet wird. (Chen et al., 2001). PB1-F2 wird durch einen überlappenden offenen Leserahmen im PB1 Gen in der Nähe des 5'-Endes kodiert. In der Wirtszelle ist es in Mitochondrien lokalisiert und kann Apoptose auslösen.

1.1.7.2 PB2

Die kleinere basische Polymerase-Untereinheit interagiert direkt mit PB1 und NP, aber nicht mit PA. PB2 bindet die methylierte 5'-Kappen-Struktur der prä-mRNA der Wirtszelle und spielt dadurch eine wichtige Rolle bei der mRNA-Synthese der viralen Polymerase. Mutationsanalysen haben gezeigt, dass PB2 auch einen Einfluss auf die Replikation hat, da einige Mutationen sich auf die Replikation auswirken, während die Transkription unbeeinflusst ist (Gastaminza et al., 2003). Während die PA und PB1 Untereinheiten ausschließlich im Wirtszellkern akkumulieren, kann PB2 auch in Mitochondrien lokalisiert sein (Carr et al., 2006).

1.1.7.3 PA

Die PA Untereinheit wird aufgrund ihrer Ladung als saures Polymerase-Protein bezeichnet (*Polymerase Acidic*). PA bindet an PB1 aber nicht an PB2 (Digard et al., 1989). Verschiedene Mutationen innerhalb des PA-Proteins beeinflussen sowohl Transkription als auch Replikation (Krug et al., 1975), was für eine Rolle von PA in beiden Prozessen spricht. PA ist wichtig für die Assemblierung einer funktionstüchtigen Polymerase (Kawaguchi et al., 2005). Nakagawa und Kollegen konnten zeigen, dass PB1, PA und NP in Abwesenheit von PB2 sowohl cRNA als auch mRNA (ohne Kappenstruktur) transkribieren konnten, PA aber für die Synthese von vRNA unabkömmlich war (Nakagawa et al., 1995).

Außerdem besitzt PA die Fähigkeit, Proteine zu spalten. Diese beruht auf einer Serinproteaseaktivität (Sanz-Ezquerro et al., 1995), wobei allerdings Protease- und Polymeraseaktivität nicht miteinander korrelieren (Naffakh et al., 2001).

1.1.7.4 Das Hämagglutinin

Das Hämagglutinin (HA) ist ein homotrimeres Glykoprotein und das Haupt-Oberflächenantigen des Influenza A Virus (Abbildung 1.4). Der Name beruht auf der Fähigkeit des Proteins, Erythrozyten zu agglutinieren. Die Agglutination kommt durch Bindung des HA an sialinsäurehaltige Oberflächenrezeptoren der Erythrozyten zustande. Menschliche und aviäre Influenzaviren unterscheiden sich dabei in ihrer Spezifität für unterschiedlich verknüpfte Sialinsäuren. Aviäre Viren bevorzugen α 2,3-Bindungen, menschliche Viren dagegen α 2,6-Bindungen, die jeweils die Sialinsäuren an das

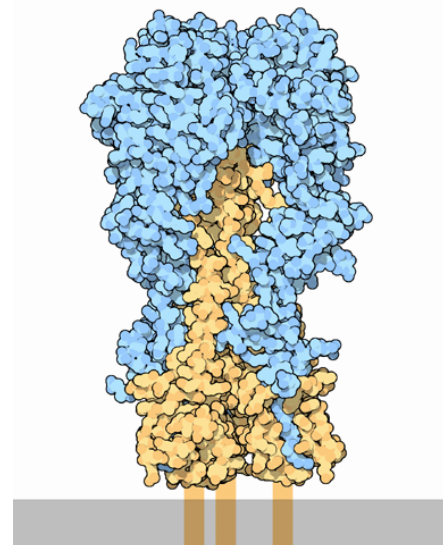


Abbildung 1.4 Zeichnung der Moleküloberfläche nach einer Röntgenstruktur des HAs des 1918 H1 Virus (Gamblin et al., 2004), Illustration D. Goodsell.

distale Glucosemolekül koppeln (Connor et al., 1994). Um in die Wirtszelle eindringen zu können, muss das HA durch eine Protease aktiviert werden. Das ca. 165 kDa große HA0-Protein wird durch Proteasen in die zwei Untereinheiten HA1 und HA2 gespalten und aktiviert (Stegmann, 2000). Wenn das Virus über das HA an die Oberflächenrezeptoren der Zielzelle gebunden hat, wird es über den Clathrin-vermittelten Endozytoseweg innerhalb eines Endosom in die Zelle

aufgenommen (siehe auch 1.1.8 und Abbildung 1.8). Zusätzlich zu diesem klassischen Eintrittsweg gibt es eine weitere Möglichkeit der Aufnahme in die Zelle, die weder durch Clathrin noch durch Caveolin vermittelt wird (Sieczkarski und Whittaker, 2002). Durch den Abfall im pH-Wert der späten Endosomen kommt es zu einer Konformationsänderung des HA2 Moleküls, das Fusionspeptid des HA2 wird exponiert und verankert sich in der Endosomenmembran (s. Abbildung 1.5, rote Strukturen). Durch eine weitere Konformationsänderung zieht das Molekül sich wie ein Scharnier zusammen und dabei die beiden Membranen dicht zueinander. Wenn mehrere benachbarte HA-Moleküle ihre Konformation ändern, bildet sich an dieser Stelle durch einen noch nicht vollständig geklärten Mechanismus eine Pore und die vRNPs können in das Zytoplasma der Wirtszelle gelangen.

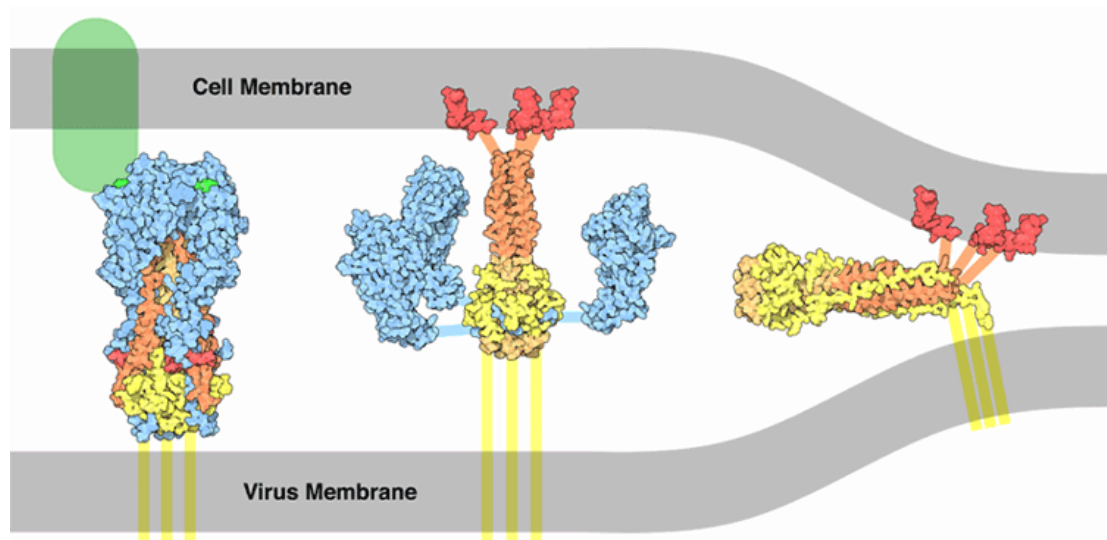


Abbildung 1.5 Illustration des Fusionsmechanismus von HA. Röntgenstrukturen aus (Gamblin et al., 2004), Illustration D. Goodsell. Der zelluläre Rezeptor ist in grün dargestellt und die Fusionspeptide sind rot angefärbt.

Es ist erstaunlich, dass die HA-Moleküle verschiedener Subtypen eine Sequenzidentität von unter 50% haben können, aber die Struktur und Funktion gleichzeitig hoch konserviert ist (Palese und Shaw, 2006).

1.1.7.5 Die Neuraminidase

Neben dem Hämagglutinin ist die Neuraminidase (NA) das zweite prominente Membranprotein in der Hülle der Influenzaviren. Diese erfüllt eine der des HAs entgegengesetzte Funktion, denn während das HA an Zelloberflächenrezeptoren bindet, sorgt die Neuraminidase dafür, dass sich neu gebildete Tochterviren wieder von der Wirtszelle ablösen können.

Die Neuraminidase ist ein 220 kDa großes homotetrameres Glykoprotein, das einen langen Stiel mit einer globulären Kopfdomäne bildet. Der Stiel verankert das Protein in der Hüllmembran, während die enzymatische Funktion in der Kopfdomäne lokalisiert ist. Letztere dient dazu, Sialinsäuren von Rezeptoren auf der Virus- oder Zelloberfläche zu entfernen und so dafür zu sorgen, dass das Virus sich von der Wirtszelle lösen kann. Zudem verhindert sie, dass Viruspartikel miteinander aggregieren (Palese et al., 1974). Außerdem werden auch Bindungen an Sialinsäuren der Schleimhaut getrennt, z.B. an Sialinsäuren der Mucine. Generell gilt es für das Virus, eine optimale Balance zwischen Rezeptorbindung und Rezeptorzerstörung zu finden (Wagner et al., 2002).

1.1.7.6 Das Nukleoprotein NP

Das Nukleoprotein des Influenza A Virus besitzt ein Molekulargewicht von ca. 56 kDa und eine sichelartige Form mit einem kleinen Anhang am C-Terminus (Wu et al., 2007). Nukleoproteine sind definitionsgemäß Proteine, die mit Nukleinsäuren assoziiert sind. Im Falle des Influenza A Virus NPs sind dies die genomischen RNA-Segmente, mit denen es, zusammen mit der trimeren Polymerase, die viralen Ribonukleoproteine (vRNPs) bildet. Die Bindung an die RNA erfolgt dabei mit hoher Affinität, aber sequenzunspezifisch über positiv geladene Aminosäuren des NPs und die negativen Ladungen des Phosphatrückgrats der vRNA (Portela und Digard, 2002). Die RNA ist auch als Bestandteil eines vollständigen vRNPs durch RNasen hydrolysierbar. Dies spricht dafür, dass die RNA außen um die NP Moleküle gewickelt ist. Für dieses Modell spricht weiterhin, dass die Polymerase auf die RNA zugreifen kann, während diese an NP Moleküle gebunden ist. NP ist die Hauptproteinkomponente der vRNPs und für die strukturelle Organisation der vRNPs wichtig. Es bildet auch ohne vRNA Oligomere aus (Ruigrok und Baudin, 1995). NP findet sich in periodischen Abständen auf der RNA, was zu einem festen Verhältnis von einem NP Molekül pro 24-25 Nukleotiden führt (Ortega et al., 2000). Zudem zeigen Röntgenstrukturdaten eine direkte Interaktion von NP mit der Polymerase innerhalb des vRNP-Komplexes (Area et al., 2004). Über die Struktur gebende Funktion hinaus ist NP für die vollständige Replikation und Transkription des viralen Genoms nötig (Honda et al., 1988). Für die Kernlokalisation besitzt das Nukleoprotein zwei Kern-Lokalisations-Sequenzen (*nuclear localisation sequences*, NLS).

1.1.7.7 Die ‚Matrixproteine‘ M1 und M2

Das M-Segment kodiert für zwei Proteine, das Matrixprotein M1 und das Ionenkanalprotein M2.

M1

Das Matrixprotein ist die Hauptstrukturkomponente des Virions mit ca. 3000 Molekülen pro Virion und macht etwa 40 % der gesamten Proteine eines Virions aus. M1 bildet eine Brücke zwischen den in der Lipidhülle verankerten Proteinen HA, NA und M2 zu den vRNPs im Inneren des Virions (Schmitt und Lamb, 2005). Es konnte mehrfach nachgewiesen werden, dass M1 mit Membranen assoziiert (Zhang and Lamb 1996; Ruigrok, Barge et al. 2000). Außerdem interagiert es mit vRNPs (Huang et al., 2001), und NS2 (Yasuda et al., 1993). Aufgrund der Interaktion mit Membranen und der Bindung von vRNPs wurde angenommen, dass M1 die treibende Kraft für das Knospen der Viren von der Wirtszellmembran ist (Latham und Galarza, 2001), wie dies bei den meisten anderen lipidumhüllten Viren der Fall ist. Neueste Erkenntnisse zeigen allerdings, dass HA und NA dafür ausreichen und M1 bei virusähnlichen Partikeln (VLPs) nicht notwendig für eine Knospung ist (Chen, Leser et al. 2007).

Des Weiteren inhibiert M1 die Transkriptionsaktivität der viralen Polymerase (Perez und Donis, 1998; Zvonarjev und Ghendon, 1980). Abbildung 1.6 fasst die Funktionen und deren Lokalisierung in einem Diagramm zusammen.

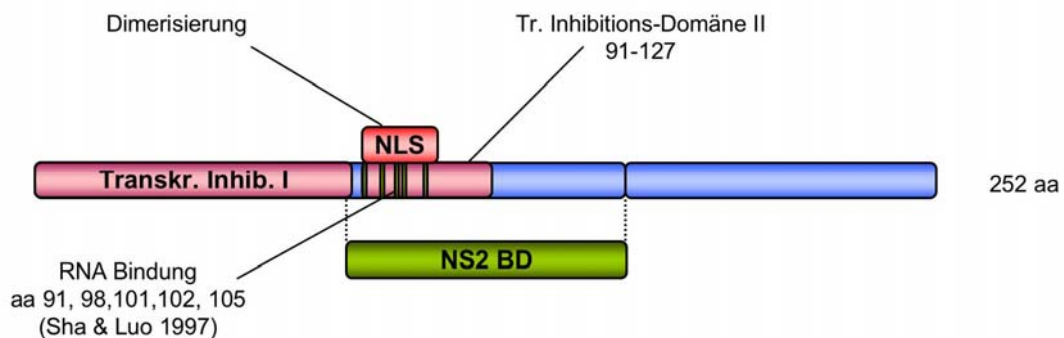


Abbildung 1.6 Diagramm des M1 Proteins des Influenza A Virus inklusive der verschiedenen funktionalen Bereiche. aa, Aminosäure; NS2 BD, NS2 Protein Bindedomäne; NLS, Kernlokalisations-Signal.

M2

Das M2-Protein der Influenza A Viren bildet einen tetrameren Ionenkanal durch die Lipidhülle des Virions, der eine wichtige Rolle bei der Freisetzung der Viren aus den Endosomen übernimmt. Er sorgt dafür, dass H⁺ Ionen aus dem sauren Endosom in das

Innere des Virions gelangen können, wodurch es zur Änderung des pH-Wertes und damit zum Lösen der Bindung von M1 an die vRNPs kommt. Gleichzeitig aktiviert die pH-Wert-Änderung auch die Fusion der endosomalen und viralen Membranen durch das HA. Außer der Transmembrandomäne besitzt es eine kurze Ektodomäne und eine Endodomäne, die mit Palmitat oder Phosphat modifiziert sein kann. Es wurden ca. 20-60 dieser Protonenkanäle pro Virion gefunden (Zebedee und Lamb, 1988), im Vergleich zu HA und NA ist M2 in der viralen Membran daher unterrepräsentiert.

1.1.7.8 Die ‚Nichtstrukturproteine‘

Das kürzeste Segment des Influenza A Virusgenoms kodiert für zwei Proteine und wurde NS-Segment genannt, da zurzeit der Entdeckung beide Proteine nicht im Virion nachgewiesen werden konnten und deswegen als Nichtstrukturproteine NS1 und NS2 bezeichnet wurden. Später jedoch konnte nachgewiesen werden, dass das NS2 Protein in der nicht unbeträchtlichen Kopienzahl von 120 Molekülen pro Virion vorkommt (Richardson und Akkina, 1991). Abbildung 1.7 zeigt den Aufbau des NS Segmentes. Das Segment kodiert für das kolineare NS1 Protein und das durch eine gespleißte mRNA kodierte NS2 Protein. Die mRNA Moleküle der beiden Proteine besitzen am 5'-Ende eine identische 56 Nukleotide lange Sequenz. Nach Prozessierung und Translation besitzen beide Proteine neun identische Aminosäuren an ihrem N-Terminus (Palese und Shaw, 2006).

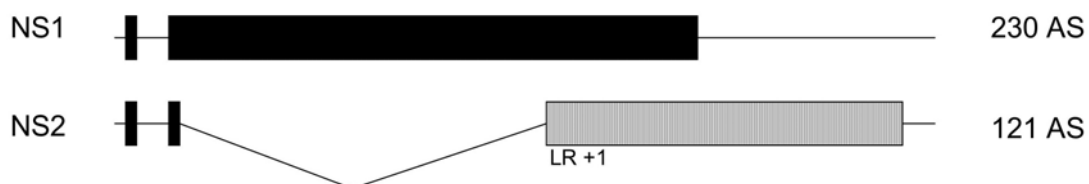


Abbildung 1.7 Struktur des NS-Segments von Influenza A Viren. NS1 wird durch die ungespleißte mRNA kodiert, während die NS2 prä-mRNA ein 473 Nukleotide langes Intron enthält (V-förmige Linie) und im zweiten Exon ein um ein Nukleotid versetztes Leseraster (LR+1, gestrichelter Bereich) verwendet.

Die Leserahmen von NS1 und NS2 überlappen in einem Bereich von 70 Basenpaaren (Lamb und Lai, 1980), im zweiten Exon nutzt NS2 dann das +1 Leseraster. Nur 10 % der NS-prä-mRNA wird zu einer NS2 mRNA gespleißt, der Großteil wird ungespleißt ins Zytoplasma der Wirtszelle exportiert und dort zum NS1 Protein translatiert (Alonso-Caplen und Krug, 1991). Die Regulation dieses alternativen Spleißvorganges ist noch immer unzureichend verstanden (Garaigorta und Ortin, 2007).

NS1

Das NS1-Protein besteht aus 230 Aminosäuren, besitzt eine Masse von 26 kDa und man findet es nur in infizierten Zellen, nicht im Virion selber. Es unterdrückt zelluläres prä-mRNA Spleißen, Polyadenylierung und die angeborene Immunantwort der Zellen, letzteres in dem es die Induktion der Interferon-Gene verhindert (Ludwig et al., 2002).

NS2

Das kleinste reguläre Protein der Influenza A Viren besteht aus 121 Aminosäuren und besitzt nach der Aminosäuresequenz ein theoretisches Molekulargewicht von 14,38 kDa, das mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie bestätigt wurde (Lommer und Luo, 2002). Es wurde im Vergleich zu anderen Proteinen des Influenza A Virus erst relativ spät entdeckt (Lamb et al., 1978). Das NS2 Protein besitzt eine überdurchschnittliche Flexibilität und besteht aus einer hochflexiblen N-terminalen Domäne sowie einer rigiden und Protease-resistenten C-terminalen Domäne (Lommer und Luo, 2002).

In der N-terminalen Region des NS2 Proteins wurde ein hochkonserviertes Kernexportsignal (NES, *Nuclear export signal*) bestehend aus mehreren Leucin- bzw. Methioninresten identifiziert (₁₂**I****L****M****R****M****S****K****M****Q****L**₂₁, Leucin- und Methioninreste fett gedruckt (O'Neill et al., 1998)). Der C-terminale Bereich des NS2 Proteins (50-121) bindet dagegen an das Matrixprotein M1, und zwar innerhalb dessen N-Terminus (Ward et al., 1995; Yasuda et al., 1993). Das Matrixprotein wiederum bindet mit hoher Affinität vRNPs (Baudin et al., 2001) und ist essentiell für deren Kernexport (Bui et al., 2000; Martin und Helenius, 1991; Whittaker et al., 1996). Aufgrund dieser Rolle als Adapterprotein während des Exports der vRNPs aus dem Nukleus und der Tatsache, dass es entgegen der ersten Annahmen ein Strukturprotein ist, gibt es den Vorschlag, das NS2 Protein in *nuclear export protein* (NEP) umzubenennen (O'Neill et al., 1998).

Eine Studie wies partielle Phosphorylierung von NS2 in infizierten Zellen nach (Richardson und Akkina, 1991), dies konnte aber in einer weiteren Studie nicht bestätigt werden (Pleschka et al., 2001).

Im Infektionsverlauf ist NS2 durch Immunfluoreszenzmikroskopie nach vier Stunden im Zellkern und später auch im Zytoplasma nachweisbar (Greenspan et al., 1985). Da es gelungen ist, rekombinante Viren mit deletiertem NS1 Leserahmen herzustellen (Garcia-Sastre et al., 1998), es aber ohne NS-vRNA nicht zu einer Generierung von

Viren kommt, ist anzunehmen, dass NS2 für die virale Replikation essentiell ist (Neumann et al., 2000).

1.1.8 Infektionszyklus

Influenzaviren vermehren sich in den Epithelzellen des menschlichen Atmungsapparats, können jedoch im Labor auch in einer Reihe von Zelllinien replizieren. Eine Übersicht der verschiedenen Stadien einer Influenzavirus-Infektion ist in Abbildung 1.8 zu sehen.

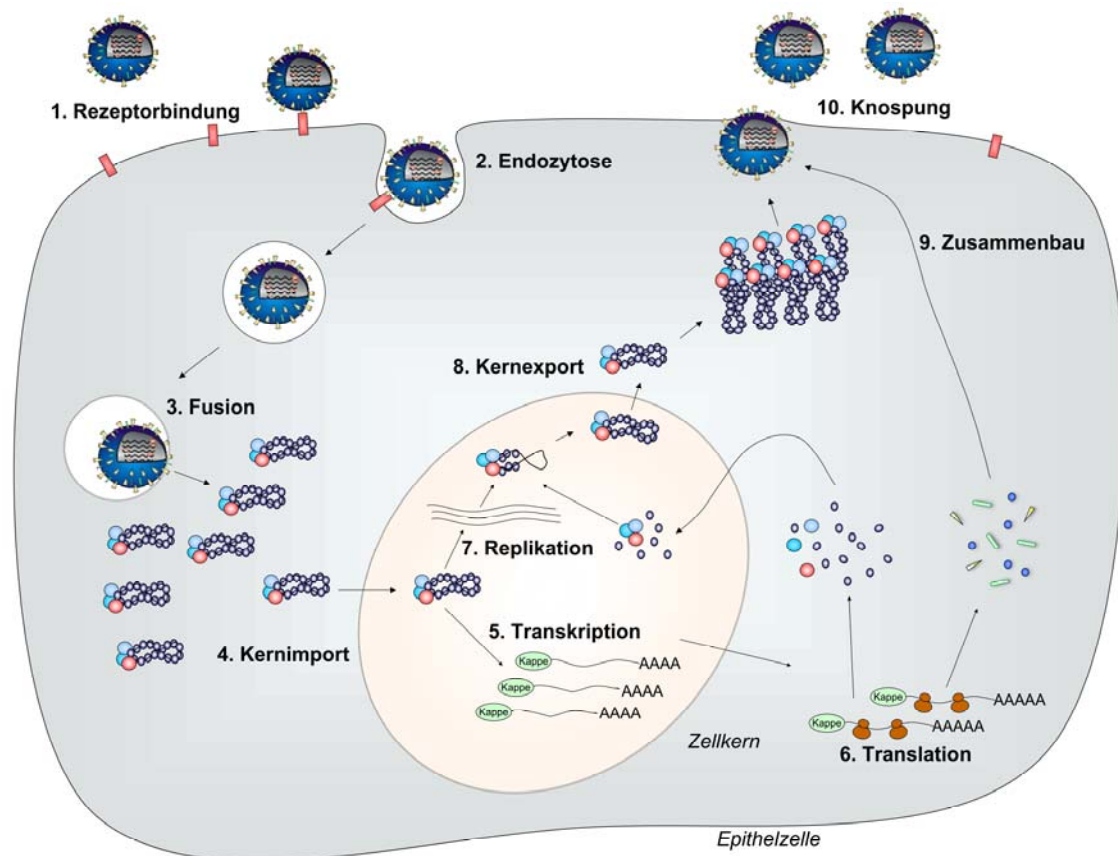


Abbildung 1.8 Replikationszyklus der Influenzaviren

Das Virus bindet mit Hilfe des Hämagglutinins an sialinsäurehaltige Oberflächenglykoproteine der Wirtszelle (1.). Dadurch kommt es zur Rezeptorvermittelten Endozytose (2.). Die Ansäuerung des Endosoms führt zu Konformationsänderungen im HA und damit zur Fusion der Vesikelmembran mit der Virusmembran (3.). Die Ansäuerung wird gleichzeitig durch den H⁺-Ionenkanal M2 in das Innere des Virions weitergeleitet und sorgt dort dafür, dass sich Matrixproteine und vRNPs voneinander trennen. Dies bewirkt, dass die Kernlokalisations-signale der vRNPs von Importinen erkannt werden und diese in den Zellkern importiert werden

(4.). Im Zellkern synthetisiert die virale Polymerase virale mRNA (5.) und repliziert die vRNA über ein cRNA Intermediat (7., siehe auch nachfolgenden Abschnitt).

vRNA und cRNA werden durch neu synthetisierte und ebenfalls importierte Virusproteine enkapsidiert (5. & 6.) und die vRNA Kopien werden als vollständige vRNPs aus dem Kern ausgeschleust (8.). An der Plasmamembran sammeln sich neusynthetisierte Membranproteine und assoziieren mit Matrixproteinen und vRNPs zu Virionen (9.). Der genaue Mechanismus der Genomverpackung ist noch unklar, zurzeit gibt es zwei Modelle: Ursprünglich wurde eine zufällige Verpackung von Segmenten vermutet, was selbst mit 12 Segmenten pro Virion nur bei 10 % der Virionen zu einem kompletten Satz und damit zu einem infektiösen Partikel führen würde. Das zweite Modell favorisiert eine selektive Verpackung der acht RNA-Segmente aufgrund der Entdeckung von Verpackungssignalen innerhalb der kodierenden Sequenzen der Segmente. Die vollständigen Virionen werden dann von der Zelle abgeschnürt (10.).

1.2 Virale RNA-Synthese

Influenzaviren führen im Gegensatz zu den meisten anderen RNA Viren die Transkription und Replikation ihres Genoms im Kern der Wirtszellen durch. Das Virus nutzt im Kern der Wirtszelle zwei wichtige Funktionen: Zum einen „stiehlt“ es naszenten Wirts-RNA-Molekülen die 7-Methylguanodin-Kappe (m⁷GpppXm), in dem es das 5'-Ende der mRNA nach etwa 10-14 Nukleotiden abschneidet und als Primer für die eigene mRNA-Transkription verwendet (*cap snatching*) (Plotch et al., 1981). Zum anderen bedient es sich der nukleären Spleißmaschinerie und erhöht damit die Kodierungskapazität seines Genoms. Abbildung 1.9 zeigt eine schematische Übersicht der RNA Synthese des Influenza A Virus.

Die Polymerase katalysiert zwei unterschiedliche Arten der Transkription: Die mRNA Synthese, die auf zelluläre prä-mRNAs als Primer angewiesen ist und deren Produkt polyadenyliert wird, und die Replikation, die Primerunabhängig ist und zuerst vollständige aber komplementäre Kopien der viralen RNA herstellt, die cRNA Moleküle. Von diesen werden in einem zweiten Schritt wieder vollständige vRNA-Segmente transkribiert.

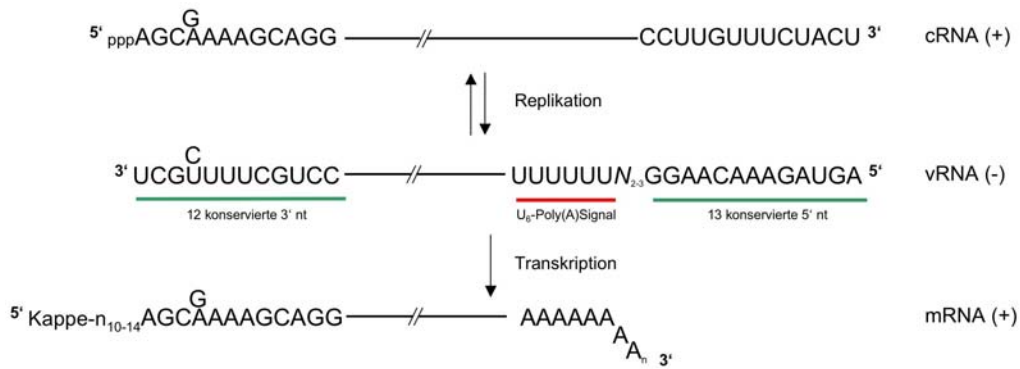


Abbildung 1.9 RNA-Synthese des Influenza A Virus. Die virale Polymerase katalysiert dabei, ausgehend von der vRNA der Virionen in der Mitte, drei verschiedene Polymerisierungsreaktionen (schwarze Pfeile). Mit Hilfe eines zellulären Primers wird virale mRNA synthetisiert. Für die Replikation der vRNA werden zuerst vollständige komplementäre Kopien der vRNA Segmente synthetisiert, die cRNA. Von diesen Vorlagen ausgehend werden dann neue vRNA Moleküle synthetisiert.

Die Regulation der RNA-Synthese innerhalb des Infektionszyklus ist noch unverstanden. Es gibt zurzeit verschiedene Erklärungsmodelle für die Regulation der RNA Synthese, es ist aber immer noch unklar, wodurch der Synthesemodus der viralen Polymerase gesteuert wird, also ob sich die virale Polymerase im Transkriptionsmodus oder im Replikationsmodus befindet.

1.2.1 mRNA-Synthese

Die virale mRNA-Synthese ist im unteren Teil der Abbildung 1.9 und genauer in Abbildung 1.10 dargestellt. Sie erfordert die Aktivität der Polymerase II (Pol II) der Wirtszelle, da sie deren Produkt (mit einer Kappe versehene mRNA) für die Herstellung von Primern benötigt (Palese und Shaw, 2006). Die virale Polymerase interagiert für diesen Zweck direkt mit der C-terminalen Domäne der Pol II, bevorzugt mit der transkriptionell aktiven hyperphosphorylierten Form. Diese Interaktion mit der Polymerase II stellt die unmittelbare Nähe zu den gerade entstehenden 5'-Kappen der zellulären RNA sicher (Engelhardt et al., 2005). Die Kappe wird dann von der PB2-Untereinheit gebunden und die PB1-Untereinheit trennt in der Folge ein Oligonukleotid am 5'-Ende dieser prä-mRNA endonukleolytisch ab. Voraussetzung für diese Einleitung der mRNA-Synthese ist die Bindung des 5'-Endes eines vRNA-Moleküls an die virale Polymerase.

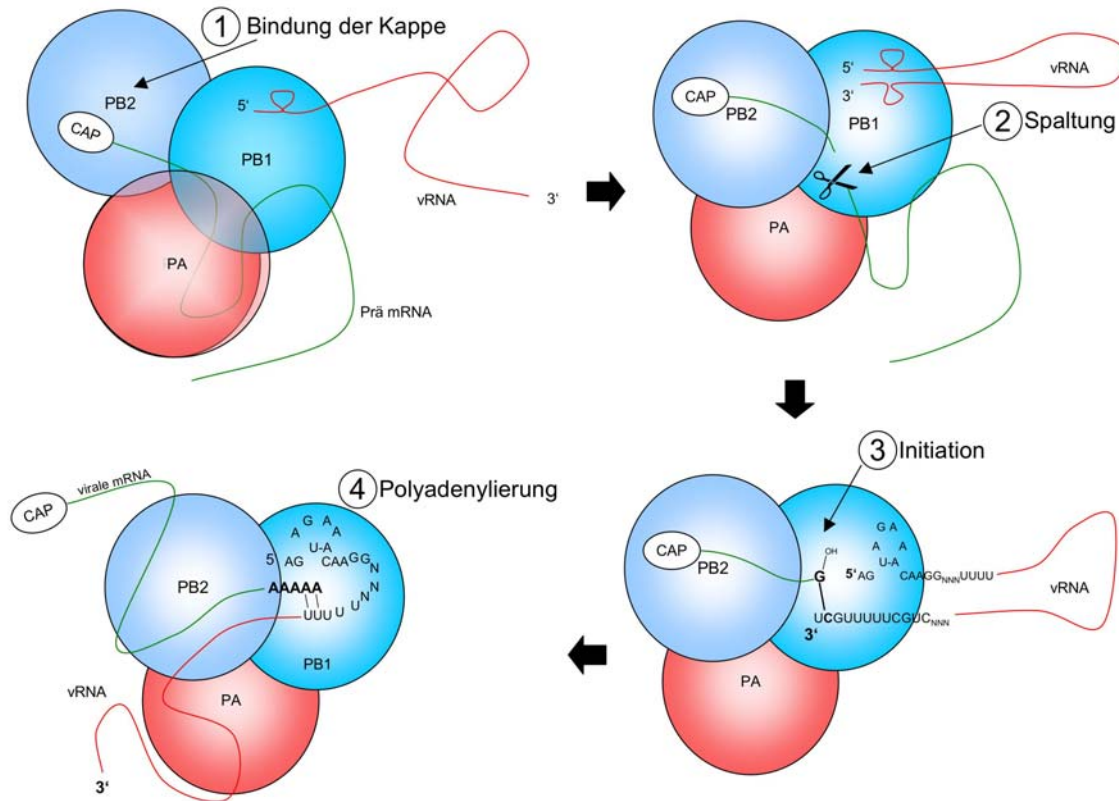


Abbildung 1.10 Modell der mRNA Synthese des Influenza A Virus. Die Bindung der vRNA ermöglicht Bindung der Kappenstruktur der zellulären Prä-mRNA durch PB2. Anschließende Bindung des 5' Endes der vRNA aktiviert die Endonukleasefunktion der PB1 Untereinheit. Ein Guaninrest wird an das 3' Ende des Primers gehängt und durch diese Initiation startet die Transkription und Elongation der mRNA. Die Transkription erfolgt in 3' → 5' Richtung der vRNA, bis die Polymerase durch sterische Hinderung auf dem Polyuridin-Bereich ‚stottert‘ und so den Poly(A)-Schwanz synthetisiert. (Palese und Shaw, 2006).

Die Interaktion mit der vRNA Vorlage führt zu einer allosterischen Konformationsänderung im Polymerasekomplex, die die Erkennung der Kappe durch PB2 ermöglicht (Cianci et al., 1995). Die Bindung des 3'-Endes der vRNA führt dann zur Aktivierung der Endonukleasefunktion der PB1 Untereinheit, die wiederum in der Spaltung der prä-mRNA ungefähr 10-14 Nukleotide nach der 5'-Kappe resultiert (Li et al., 2001). Dieser *Primer* wird anschließend nach der Vorlage des 3' Endes entweder mit einem C oder G (Position 2 oder 3 der vRNA) verlängert. Die Polymerasefunktion der PB1-Untereinheit elongiert dann die mRNA bis zu einem Poly-Uridin-Signal, das sich ungefähr 16 Nukleotide vor dem 5' Ende der vRNA befindet. Dieses 5-7 Uridine lange Signal und der jetzt benachbarte doppelsträngige Promotor sind in jedem der acht Gensegmente konserviert und Voraussetzung für die Polyadenylierung der entstehenden mRNA. Die gängige Hypothese besagt, dass es durch das noch gebundene 5' Ende der RNA zu einer sterischen Blockade der Polymerase auf dem Poly-U-Signal kommt und diese das Signal mehrfach synthetisiert („stottert“). Dadurch entsteht der

für den Export aus dem Zellkern und die Stabilität der mRNA wichtige Poly(A)-Schwanz.

Die beiden kleinsten Genomsegmente des Influenza A Virus, M und NS, enthalten 5'- und 3'-Spleiß-Signale, die den Konsensussequenzen für zelluläre Spleißsignale entsprechen. Es konnte nachgewiesen werden, dass ein Spleißen viraler RNA auch ohne virale Proteine stattfindet (Lamb und Lai, 1984), was bedeutet, dass das Virus zelluläre Spleißmechanismen ausnützt. Die virale mRNA wird anschließend durch zelluläre Mechanismen ins Zytoplasma exportiert und dort werden an Ribosomen des rauen Endoplasmatischen Retikulums die Membranproteine sowie an freien Ribosomen die restlichen viralen Proteine translatiert.

1.2.2 cRNA Synthese

Da die RNA-Moleküle der Influenza Viren negative Polarität besitzen, kodieren sie nicht direkt für Proteine. Die vRNA muss erst durch die virale RNA-Polymerase zur kodierenden mRNA umgeschrieben werden. Die virale mRNA besitzt zwar definitionsgemäß positive Polarität, kann aber aus zwei Gründen nicht als Vorlage für die Replikation der negativsträngigen vRNA dienen. Zum einen besitzen die viralen mRNAs die Kappenstruktur der Wirtszellen, die nicht mitkopiert werden sollte, und zum anderen fehlt hinter der Polyadenylierungsstelle am 3' Ende ein Teil der vRNA. Dadurch würden bei der Replikation von einer mRNA Vorlage die 5'-hochkonservierten Regionen der vRNA verloren gehen. Um also die vRNA replizieren zu können, muss die virale Polymerase eine komplementäre und vollständige Kopie der vRNA synthetisieren, die cRNA.

Die Synthese von cRNA unterscheidet sich durch eine Primer-unabhängige Initiierung und das Überlesen der Polyadenylierungs-Sequenz von der mRNA-Synthese. Das 5' Ende der cRNA ist triphosphoryliert (Hay et al., 1982), kann also nicht durch endonukleolytische Spaltung entstehen, da diese ein Monophosphat-Ende zur Folge hätte (Olsen et al., 1996).

Im Verlauf einer Infektion wird wesentlich weniger cRNA als mRNA produziert, nur 5-10 % der gesamten positivsträngigen viralen RNA in infizierten Zellen sind cRNA Moleküle (Herz et al., 1981). Die cRNA wird, wie vRNA auch, durch das Nukleoprotein enkapsidiert. cRNA wird im Gegensatz zur vRNA nicht aus dem Zellkern exportiert, verbleibt also als Vorlage für die vRNA Replikation im Kern. Für

die Synthese von cRNA *in vitro* wird, zusätzlich zur vRNA Vorlage und der trimeren Polymerase, NP benötigt (Newcomb et al., 2008).

1.2.3 vRNA Synthese

Die vRNA Synthese ist, wie die cRNA Synthese auch, unabhängig von einem RNA-Primer und die Produkte besitzen triphosphorylierte 5'-Enden (Honda et al., 2001). cRNA besitzt kein Polyadenylierungs-Signal, allerdings ist noch unklar, wie die Polymerase die angenommene sterische Hinderung überwindet, um eine vollständige Kopie zu erreichen. Der cRNA Promotor enthält nämlich ebenfalls Doppelstrangelemente und damit entsteht eine ähnliche Situation wie während der mRNA Synthese, wodurch es auch hier zum vorzeitigen Abbruch kommen könnte. Allerdings scheint die Interaktion zwischen PB1 und dem 3'-Ende der cRNA stärker zu sein als die entsprechende Interaktion mit vRNA (Gonzalez und Ortin, 1999). Voraussetzung für die Produktion und die Stabilität des vRNA Produktes ist freies Nukleoprotein (NP, das nicht Teil von vRNPs ist), das zur Enkapsidierung der synthetisierten vRNA verwendet werden kann (Shapiro und Krug, 1988; Vreede et al., 2004).

1.2.4 Regulation des viralen Vermehrungszyklus

Für die Regulation der viralen RNA-Synthese werden zurzeit zwei Modelle diskutiert: Das klassische Modell, in dem angenommen wird, dass ansteigende Mengen von neusynthetisiertem NP die RNA-Synthese von Transkription auf Replikation ‚umschalten‘. Das neuere Modell besagt, dass die Polymerase nicht reguliert ist, sondern auch cRNA von Beginn der Infektion an synthetisiert. Die cRNA soll dabei aber erst durch neu synthetisiertes NP bzw. Polymerase stabilisiert werden, und wird daher zu frühen Zeitpunkten, wenn diese Proteine noch nicht vorliegen, abgebaut.

Diese beiden Modelle werden im Folgenden genauer dargestellt. Anschließend wird kurz auf die zeitliche Regulation der RNA Synthese eingegangen. Zuletzt werden die viralen und zellulären Faktoren, die an der viralen RNA-Synthese und deren Regulation beteiligt sind, in zwei weiteren Abschnitten besprochen.

1.2.4.1 Das Schaltermodell

Im Schaltermodell wird angenommen, dass die virale RNA-Synthese zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion von mRNA-Synthese auf c- beziehungsweise v-RNA-

Transkription umschaltet. Dieses Modell beruht auf der Tatsache, dass *de novo* Proteinsynthese benötigt wird, bevor es zur Synthese von cRNA kommt und diese führt dann im Laufe der Infektion zu einem Umschalten auf die Replikation. Es wird vermutet, dass die ansteigende Menge des Nukleoproteins als ‚Schalter‘ dient. Mechanistisch geschieht dies durch Interaktion des NP entweder direkt mit der Polymerase (Polymerasemodifikation, (Biswas et al., 1998; Mena et al., 1999; Poole et al., 2004)) oder mit dem Promotorelement der vRNA (*template modification*) (Fodor et al., 1994; Hsu et al., 1987; Klumpp et al., 1997). Das Schalter-Modell ist in Abbildung 1.11 dargestellt.

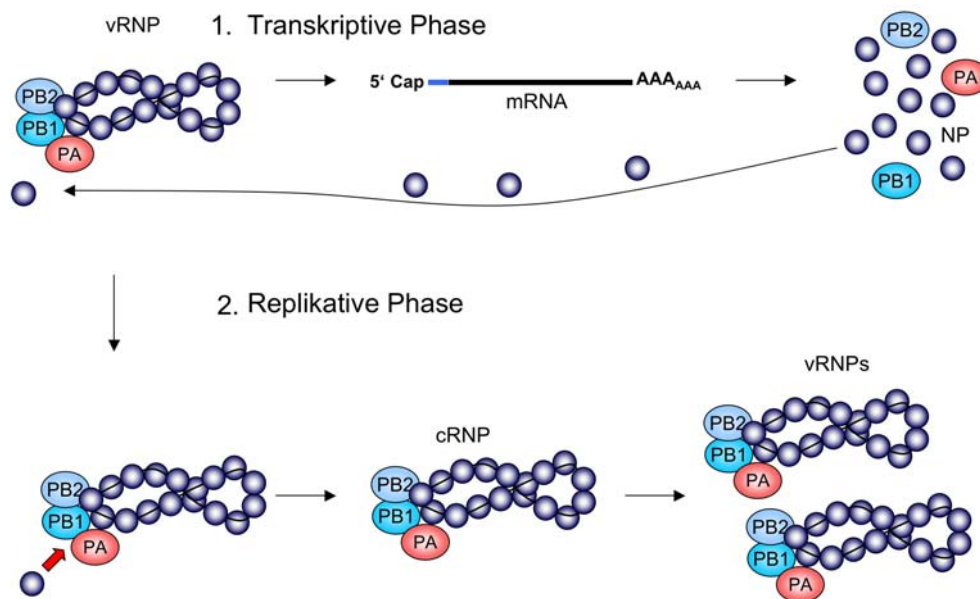


Abbildung 1.11 Schalter-Modell. Änderung der Polymeraseaktivität durch freies NP.

1.2.4.2 Das Stabilisierungsmodell

Dieses Modell besagt, dass es keinen ‚Schalter‘ in der Aktivität der Polymerase von mRNA zu cRNA/vRNA gibt, sondern dass die Polymerase schon zu Beginn des Infektionszyklus, neben mRNA, auch cRNA und vRNA produziert.

Es konnte gezeigt werden, dass in Zellen, in denen die virale Polymerase und NP vorexprimiert wurden, von vRNPs einer anschließenden Infektion direkt cRNA synthetisiert wird (Vreede et al., 2004). Um zu verhindern dass durch die vorexprimierte Polymerase RNA synthetisiert wird, wurde hierbei eine PB1 Untereinheit verwendet, die durch eine Doppelmutation (D445A/D446A) im aktiven Zentrum inaktiviert ist (Biswas und Nayak, 1994).

Laut diesem Modell gibt es keinen Schalter, sondern die früh in der Infektion synthetisierte cRNA wird durch die vorexprimierte Polymerase und das NP Protein vor

zellulären Exonukleasen geschützt, die sie ansonsten abbauen würde (Shapiro und Krug, 1988; Vreede et al., 2004).

Laut dieser Theorie kommt es also nur auf die Menge der RNA-stabilisierenden Proteine an, und die Polymerase synthetisiert unreguliert beide bzw. alle drei RNA Spezies. Virale mRNA ist durch die 5'-Kappenstruktur und den Poly-A-Anhang vor der Degradation durch Wirtszell-Nukleasen geschützt, während die neu synthetisierten cRNA und vRNA Moleküle nicht geschützt sind. Abbildung 1.12 stellt das Stabilisierungsmodell dar.

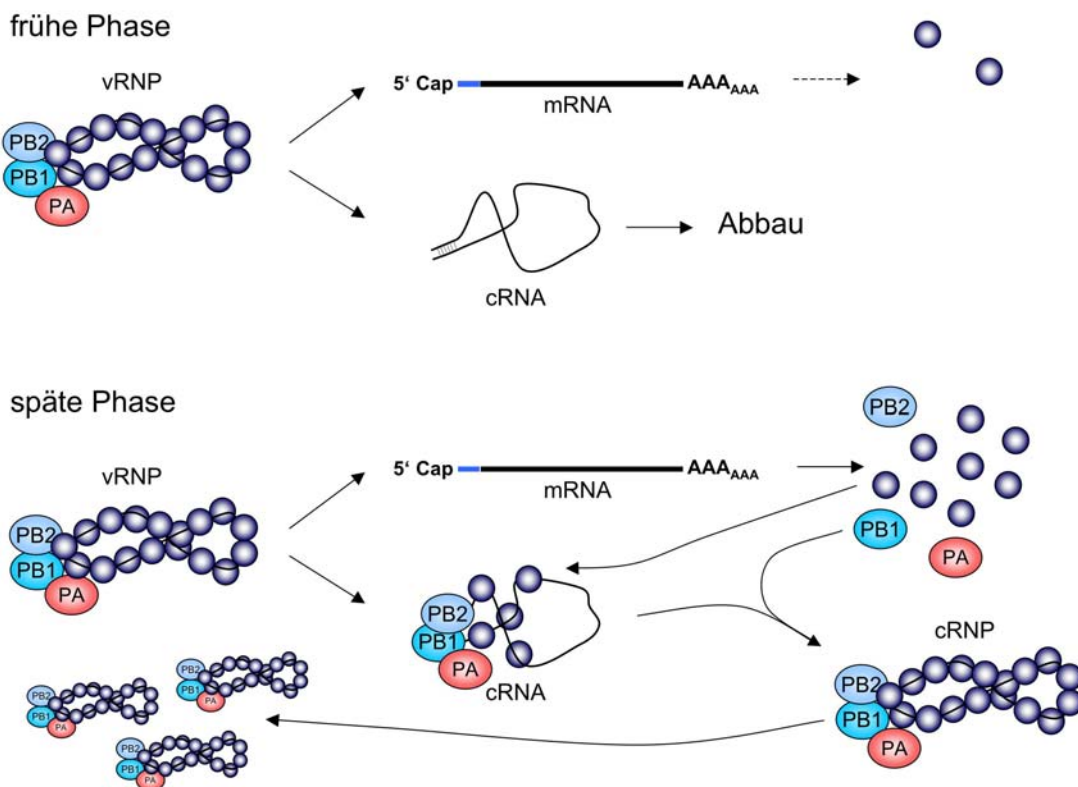


Abbildung 1.12 Stabilisierungs-Modell. Früh synthetisierte c- bzw. vRNA wird abgebaut, da sie noch nicht durch die de novo Synthese von NP bzw. der Polymerase vor dem Abbau durch Wirtszell-Nukleasen geschützt ist.

Bei der Enkapsidierung der vRNA bzw. cRNA gibt es ein bisher noch nicht geklärtes Problem. Da für NP keine sequenzspezifische Interaktion nachgewiesen werden konnte, ist unklar wie die Enkapsidierung c- und vRNA mit NP, aber nicht die von mRNA zustande kommt. Eine Möglichkeit wäre, dass die sequenzspezifische Interaktion der Polymerase mit den 5' Enden der vRNA als Nukleationspunkt dient, an dem dann durch die Interaktion von NP und PB1/PB2 die Enkapsidierung beginnt (Portela und Digard, 2002).

Die Modelle schließen sich nicht gegenseitig aus, betrachten allerdings beide nicht die Einwirkung von *trans*-Faktoren, wie zum Beispiel die für M1 gezeigte Inhibition der mRNA Synthese. Diese würden allein allerdings auch nicht die Steigerung der c- und vRNA Synthese erklären.

Das Stabilisierungsmodell ist einfacher als das Schaltermodell, da es von einer durch den Zufall, bzw. durch den gerade vorhandenen Primer, bestimmten Synthese ausgeht. Dies würde dem geringen Kodierungspotential von Influenza-Viren Rechnung tragen, das eine komplexe Regulierung unwahrscheinlich machen könnte. Das Schalter Modell hat den Vorteil der Regulation, d.h. die virale Polymerase produziert nur cRNA wenn sie auch gebraucht wird.

1.2.4.3 Zeitliche Regulation der RNA-Synthese

Die Expression der viralen Polypeptide scheint primär auf der Ebene der Transkription und nicht der Translation reguliert zu sein, da die Menge an synthetisierten Proteinen proportional zu der Menge der mRNA ist (Hatada et al., 1989).

Die mRNA-Synthese ist schon früh nach der Infektion nachweisbar und erreicht ca. 2,5 h nach Beginn der Infektion die maximale Rate (Shapiro et al., 1987). Die Synthese von vollständigen Kopien der vRNA (cRNA) ist erst nach erfolgter mRNA Synthese, aber sie erreicht z.B. für das NS Segment ihre maximale Syntheserate schon nach 1,5 h möglich (Shapiro et al., 1987).

In der ersten Stunde nach der Infektion werden die mRNAs für NP und NS1 bevorzugt transkribiert (Hatada et al., 1989; Shapiro und Krug, 1988), Das Nukleoprotein NP wird für die Replikation des Genoms und das NS1 Protein als Antagonist der Immunantwort des Wirtes benötigt. In der späten Phase, nachdem die Replikation der vRNA erfolgt ist, werden dann bevorzugt HA, NA und besonders M1 synthetisiert.

Die Polymeraseproteine sind im Vergleich zu den anderen Proteinen im Infektionszyklus unterrepräsentiert, sie werden nur in katalytischen Mengen benötigt. Robertson et al. konnten zeigen, dass eine Position im hochkonservierten 3'-vRNA Promotor der Polymerasesegmente einiger Virusstämme immer ein Cytosin trägt, während die anderen Segmente meist ein Uracil tragen (Robertson, 1979). Änderte man nun im NA Segment das Uracil an Position 4 zu Cytosin, zeigte sich verringerte mRNA Synthese und gleichzeitig stimulierte cRNA und vRNA Synthese in der späten Phase der Infektion (Lee und Seong, 1998). Dies ist ein Hinweis darauf, dass das Virus die Genexpression der einzelnen Segmente letztendlich über Sequenzunterschiede

zwischen den Segmenten reguliert. Auch für die nichtkodierenden Bereiche außerhalb der terminalen hochkonservierten Bereiche wurde dies vermutet (Zheng et al., 1996).

1.2.4.4 Zelluläre Faktoren der RNA-Synthese

Zu den ersten entdeckten zellulären Faktoren, die für die virale Transkription und Replikation wichtig sind, gehörten UAP56 und HSP90. **UAP56** ist für die Assemblierung von NP und viraler RNA zu vRNPs notwendig (Momose et al., 2001), ebenso wie der kürzlich in einem Hefe-Genom-weiten Analyseverfahren identifizierte **Tat-SF1** Faktor (Naito et al., 2007). **HSP90** ist ein für die Polymeraseaktivität notwendiger Faktor und interagiert mit der PB2 Untereinheit der Polymerase (Momose et al., 2002; Naito et al., 2007).

Die **MCM**-Helikase wurde durch das Fraktionieren und einzelne Rekonstituieren eines zellfreien replikativen Systems identifiziert. MCM spielt in der Wirtszelle vermutlich eine Rolle in der DNA-Replikation. In Zellen, in denen diese Helikase ausgeschaltet wurde, konnte die virale Polymerase nur noch kurze RNA Stücke replizieren, bevor die Synthese ganz abbrach (Kawaguchi und Nagata, 2007). Als viraler Interaktionspartner konnte die PA Untereinheit der Polymerase identifiziert werden.

Eine Suche nach Interaktionspartnern des Nukleoproteins und einzelner Polymeraseuntereinheiten mittels TAP (*tandem affinity purification*) identifizierte für NP 41 und für die Polymerase vier zum Teil bisher unbekannte zelluläre Interaktionspartner (Mayer et al., 2007). Als Beispiel ist das **Nukleophosmin** (NPM) genannt, ein Faktor, der die Polymerasefunktion stimulierte, zusammen mit vRNPs in Immunpräzipitationen präzipitierte und in Immunfluoreszenzen eine Lokalisation an Orte der viralen Replikation und Transkription zeigte.

Kürzlich konnten über 100 zelluläre Gene identifiziert werden, die für die Replikation von Influenza A Viren eine Rolle spielen. Dies wurde durch ein genomweites **RNAi-Auswahlverfahren** in *Drosophila* Zellen erreicht. Dafür wurde das Virus modifiziert, um eine Infektion von Drosophilazellen möglich zu machen und um virale Genexpression einfach nachweisen zu können. Die ermittelten Wirtsproteine besitzen Aktivitäten in so unterschiedlichen Funktionen wie Endozytose (ATP6V0D1), mitochondrialer Funktion (COX6A1) und mRNA Export-Maschinerie (NXF1) (Hao et al., 2008).

eIF4GI, eine Untereinheit des eukaryotischen Translationsfaktors eIF4F, wurde als Interaktionspartner des NS1 Proteins identifiziert (Aragon et al., 2000). Durch diese Interaktion sorgt NS1 für die bevorzugte Translation viraler mRNA.

1.2.4.5 Virale Faktoren der RNA-Synthese

Außer für die Polymeraseproteine konnte auch für andere virale Proteine eine Beteiligung an der Regulation der RNA-Synthese nachgewiesen werden. Für das Matrixprotein M1 konnte *in vitro* gezeigt werden, dass es die mRNA-Synthese der viralen Polymerase vermindert (Perez und Donis, 1998; Zvonarjev und Ghendon, 1980). Auch das NS1 Protein scheint eine Rolle bei der temporären Regulation der RNA-Synthese zu spielen. Eine Doppel-AS-Austauschmutante (123/124) innerhalb des NS1 Proteins hat eine veränderte temporale Regulation der RNA-Synthese zur Folge. Durch diese Mutation kommt es zu einer erhöhten vRNA Synthese schon zu frühen Zeitpunkten in der Infektion (Min et al., 2007).

In dieser Arbeit soll der Einfluss des NS2 Proteins auf die RNA Synthese untersucht werden, denn es gab Hinweise auf eine Rolle des NS2 bei der Replikation und Transkription des viralen Genoms. Diese werden in der Fragestellung am Ende dieser Einleitung behandelt.

1.3 Transport über die Kernmembran

Das NS2 Protein des Influenza A Virus, das in dieser Arbeit untersucht wurde, spielt eine wichtige Rolle bei der Interaktion des Kernexportsystems der Zelle mit den zu exportierenden vRNP Molekülen, und daher wird hier kurz darauf eingegangen.

Der Transport von Makromolekülen über die Kernmembran eukaryotischer Zellen ist ein bidirektionaler, aktiver Vorgang, der eine Interaktion der zu transportierenden Makromoleküle mit dem Import-Export-System des Zellkerns voraussetzt. Da die vRNP-Moleküle der Influenzaviren sehr große Makromoleküle sind (5 MDa) und innerhalb des Kerns zusammengesetzt werden, müssen sie durch die Kernporen (*Nuclear pore complexes*, NPCs) ein- und ausgeschleust werden. Die Kernmembran stellt so für das Virus eine Barriere dar, die kontrolliert in beide Richtungen überwunden werden muss. Die vRNPs müssen zu Beginn der Infektion in den Kern transportiert werden, weiterhin müssen die später im Zytoplasma synthetisierten Proteine ebenfalls in den Kern importiert werden, und zum dritten müssen die zusammengesetzten vRNPs wieder aus dem Kern ausgeschleust werden. Zusätzlich

müssen die Transportvorgänge auch noch sorgfältig reguliert werden, da z.B. die vRNA einerseits als Vorlage für die Transkription im Kern dient, andererseits aber im Zytoplasma als Bestandteil der neuen Viruspartikel gebraucht wird. Das zurzeit gängige Modell des Kernexports von Influenza Viren wird im Folgenden erläutert.

Zuerst sorgt eine Interaktion des M1-Proteins mit den vRNP-Molekülen dafür dass sich die vRNPs von der Kernmatrix lösen können (Garcia-Robles et al., 2005). Erste Ergebnisse wiesen darauf hin, dass M1 für den Kernexport von vRNPs benötigt wird (Bui et al., 2000). Allerdings konnte bisher noch keine Interaktion von M1 oder den Bestandteilen der vRNPs mit der zellulären Exportmaschinerie nachgewiesen werden. Eine solche Funktion wurde jedoch für NS2 beobachtet, das sowohl mit dem Exportrezeptor CRM1 (Neumann et al., 2000) als auch mit verschiedenen Bestandteilen der NPCs (O'Neill et al., 1998) interagiert. Zugleich interagiert der C-Terminus von NS2 mit M1 (Akarsu et al., 2003), so dass angenommen wird, dass NS2 als Adapter zwischen den vRNPs und der Exportmaschinerie dient. Ein Schema dieser Adapterfunktion innerhalb der Kette von viraler RNA, viralen Proteinen und den Export-Faktoren ist in Abbildung 1.13 zu sehen.

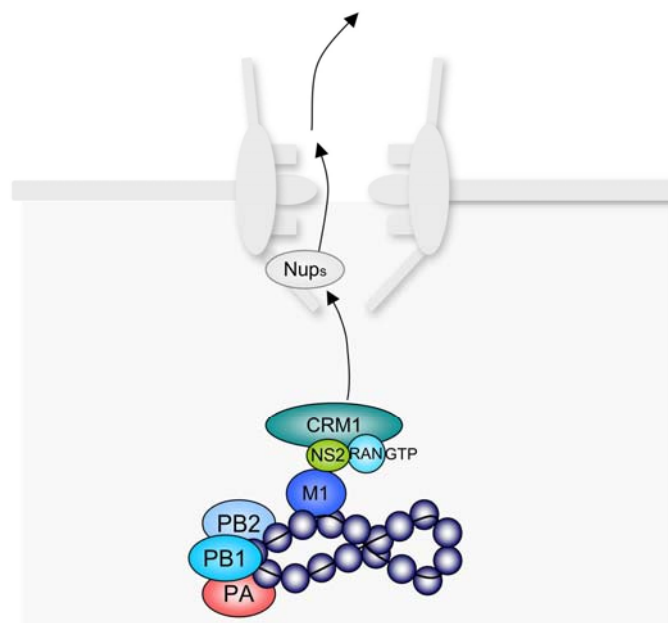


Abbildung 1.13 Schema der Verkettung von vRNPs mit M1, NS2 und Exportfaktoren.

NS2 besitzt ein NES im Bereich der Aminosäuren 11-23. Dieses weicht von den bekannten Leucin-reichen NES ab, in dem es anstatt der Leucine mehrere Methionine enthält, wobei die Hydrophobizität des Signals derjenigen von Leucin-reichen NES gleicht. Das NES des NS2 Proteins kann das NES des HIV-Rev funktional ersetzen. (O'Neill et al., 1998). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass NS2 mit CRM1

und bestimmten Nukleoporinen interagiert (Elton et al., 2001; Paragas et al., 2001). Ein gleichzeitiger Austausch von drei hydrophoben Aminosäuren verhindert erstaunlicherweise nicht die Bindung an CRM1. Ein revers genetisch hergestelltes Virus mit denselben mutierten Aminosäuren im NS2 Protein ist dagegen nicht fähig sich zu vermehren (Neumann et al., 2000).

1.4 Fragestellung

Die Replikation des viralen Erbguts ist der Mittelpunkt der Virusvermehrung und die grundlegenden Mechanismen der RNA-Synthese der Influenzaviren sind bekannt. Allerdings ist die Regulation dieser Synthese noch umstritten.

Zu Beginn dieser Arbeit gab es in der Literatur Hinweise, dass das NS2 Protein, neben seiner Rolle im Kernexport der vRNPs, für die vollständige Replikation der viralen Gensegmente wichtig ist. Ein Virus mit mutiertem NS2 Gen zeigte eine anormale Replikation der für die Polymerase kodierenden Segmente (Odagiri und Tashiro, 1997; Odagiri und Tobita, 1990; Odagiri et al., 1994). Außerdem ist bekannt, dass das NS2 Protein *in vitro* die Expression durch eine virale Polymerase inhibiert (Bullido et al., 2001). Über den Mechanismus und die Funktion dieser Inhibition wurde bislang nur spekuliert. Ziel dieser Arbeit war daher die Charakterisierung des regulatorischen Einflusses des NS2 Proteins auf die RNA-Synthese des Influenza A Virus.

Dabei sollten insbesondere folgende Fragestellungen untersucht werden: Besitzt das NS2 Protein eine regulatorische Wirkung in der viralen Infektion? Wie funktioniert diese Regulation mechanistisch, gibt es z.B. Interaktionen zwischen dem Polymerase Komplex und dem NS2 Protein? Wie passt die Regulation durch NS2 in die bisherigen Modelle der Regulation der RNA-Synthese? Welche Bereiche des NS2 Proteins sind für eine Regulation der RNA-Synthese wichtig? Diese Fragen sollten durch proteinchemische und virologische Experimente wie z.B. Reporter-gen-Studien, revers-genetischen Ansätzen und Interaktionsstudien geklärt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Virusstämme

Influenza A/Puerto-Rico/8/34(H1N1) Virus	erhalten von P.Palese, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY
Influenza A/WSN/33(H1N1) Virus	erhalten von P.Palese, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY
Influenza A/WSN/33-NS2-Virusmutanten	erhalten von S. Taube, Robert Koch-Institut, Berlin
Influenza B/Lee/40 Virus	erhalten von P.Palese, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY

2.1.2 Zelllinien

MDCKII Zellen	„Madin-Darby Canine Kidney“, Epithelzelllinie aus der Niere eines Hundes
HEK-293T Zellen	„Human Embryonic Kidney“, Humane Epithelzelllinie, Niere
A549 Zellen	Humane Epithelzelllinie, Lungenkarzinom

2.1.3 Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i> , Stamm XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F ⁺ pro AB lacI ^q ZΔM15 Tn10 (Tet ^r)]
--	---

2.1.4 Zellkulturmedien, Zusätze und Material

MEM (Minimal Essential Medium)	Gibco [®] /Invitrogen [™] , Karlsruhe
D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco [®] /Invitrogen [™] , Karlsruhe
OptiMEM	Gibco [®] /Invitrogen [™] , Karlsruhe
FBS (Fötales Kälberserum)	Biochrom, Cambridge/U.K.
BSA (Bovines Serum Albumin, 30%)	PAA Laboratories, Linz
L-Glutamin	MP Biomedicals, Eschwege
Ciprofloxacin	MP Biomedicals, Eschwege

Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin (TPCK-behandelt)	Sigma, Steinheim
Zellkulturflaschen	TPP, Schweiz Nunc, Dänemark
Zellkulturschalen	Greiner, Solingen

2.1.5 Medien für Bakterien

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

LB-Medium	10 g/l 5 g/l 10 g/l pH 7,2	Trypton Hefeextrakt NaCl
2 x YT-Medium	16 g/l 10 g/l 10 g/l pH 7,2	Trypton Hefeextrakt NaCl
SOC- Medium	20 g/l 5 g/l 10 mM 2,5 mM nach dem Autoklavieren Zugabe von 20 mM	Trypton Hefeextrakt NaCl KCl Mg ²⁺ -Stock
MgCl₂-Stock	1 M 1 M 0,4 % (w/v)	MgCl ₂ x 6 H ₂ O MgSO ₄ x 7 H ₂ O Glukose
LB-Agar mit Ampicillin	LB-Medium 1,5 % (w/v) Autoklavieren und Abkühlen auf unter 50 °C, Zugabe von Ampicillin 100 µg/µl. Gießen des Mediums in Petrischalen	Bacto-Agar

2.1.6 Plasmide

pcDNA3	Expressionsvektor zur Klonierung. Mit CMV und T7 Promotor, Invitrogen, Karlsruhe.
pCAGGS	Eukaryotischer Expressionsvektor mit Chicken B-Aktin-Promotor. Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Prof. J.-I. Miyazaki, Osaka University Medical School, Japan (Niwa et al., 1991).

pRL-TK-Luc (<i>Renilla</i>) pPoll	Promega pUC19-Derivat, das durch den humanen Polymerase I Promotor und ein Hepatitis Delta Virus Ribozym für die korrekte Transkription einer Influenzavirus vRNA in der Zelle sorgt. (Pleschka et al., 1996)
pRSV-Luc	Positivkontrolle für <i>Northern Blot</i>
pEGFP-C1	<i>enhanced green fluorescent protein</i> , Kontrolle von Transfektionseffizienzen.

2.1.7 Oligonukleotide

Klonierprimer 5' → 3'

UNI9	AGCAGAAGC	Universeller Primer der an die konservierten 3'-Enden aller vRNA Segmente bindet
------	-----------	--

Sonden für die Primer Extension:

<u>Quelle</u>	<u>Segment</u>	<u>(+ / -)</u>	<u>Sequenz</u>	<u>Länge (bp)</u>	<u>Produkt (b)</u>
A/WSN/33	NA	-	tccagtatggttttgatttccg	20	von vRNA (129)
A/WSN/33	NA	+	tggacttagtgggagcatcat	22	von cRNA(160), mRNA(169-177)
Luziferase		-	gaaccagggcgtatctcttc	20	von ,v'RNA (130)
Luziferase		+	cgacgcaaaaatcagagag	19	von cRNA(153), mRNA(162-170)
5S rRNA		+	ucccagggcggucucccaucc	20	(100)

2.1.8 Enzyme

Pfu Turbo DNA-Polymerase	Roche, Mannheim
M-MLV Reverse Transkriptase	Fermentas, St. Leon-Rot
RNasin (40 u/μl)	Promega, Mannheim
T4 DNA-Ligase (1u/μl)	Roche, Mannheim
T4 Polynukleotid Kinase (PNK, 10 u/μl)	Roche, Mannheim

2.1.9 Restriktionsendonukleasen

<i>AarI</i> , <i>BseMI</i> , <i>BsmBI</i> (<i>Esp3I</i>), <i>HindIII</i> , <i>NheI</i> , <i>PstI</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Sall</i> , <i>XhoI</i> , <i>BspMI</i> , <i>SapI</i>	NEB, Frankfurt

2.1.10 Kits

BigDye [®] Terminator 3.1 Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega, Mannheim
Expand High Fidelity PCR System	Roche, Mannheim
Protein Assay Stammlösung	BioRad, München
QIAprep [®] Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAEXII Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
OneStep RT-PCR Kit	QIAGEN, Hilden
QIAamp [®] MinElute [™] Virus Spin Kit	QIAGEN, Hilden
RNeasy [®]	QIAGEN, Hilden

2.1.11 Primäre Antikörper

<u>Antigen</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Spezies</u>	<u>IB</u>	<u>IF</u>
NS2*	Biotez*	Kaninchen	1:500	1:500
NP	Serotec	Maus	1:750	1:500
Tubulin	Sigma	Maus	1:10.000	
PB1	Santa Cruz	Ziege	1:400	1:50
PA	Ortin et al.	Maus	1:100	
PB2	Ortin et al.	Maus	1:100	
PARP	Cell Signaling	Kaninchen	1:3000	
Aktin	Novus	Kaninchen	1:5000	
GFP	Santa Cruz	Maus	1:1000	

IB = Immunoblot; IF = Immunfluoreszenz

* Immunisierung von Kaninchen mit aufgereinigtem GST-NS2 Protein aus Bakterien.

2.1.12 Sekundäre Antikörper

<u>Zielspezies</u>	<u>Modifikation</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Spezies</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Anwendung</u>
Maus	Alexafluor 594 (Rot)	Molecular Probes	Ziege	1:1000	IF
Kaninchen	Alexafluor 488 (Grün)	Molecular Probes	Maus	1:1000	IF
Maus	Meerrettich-Peroxidase (HRP)	DAKO	Kaninchen	1:20.000	IB
Kaninchen	Meerrettich-Peroxidase (HRP)	DAKO	Schwein	1:20.000	IB

2.1.13 Puffer und Lösungen

PBS	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	80,9 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄

Material und Methoden

PBS⁺⁺/0,2% BSA	PBS	
	0,2 %	BSA
	0,1 g/l	MgCl ₂
	0,13 g/l	CaCl ₂
30% Sucrose in NTE	100 mM	NaCl
	10 mM	Tris-HCl pH 7,5
	1 mM	EDTA
	30%	Sucrose
10 x TBE Puffer	0,89 M	Tris
	0,89 M	Borsäure
6 x DNA-Probenpuffer	0,1 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,1 % (w/v)	Xylencyanol
	30 %	Glycerol
	10 mM	EDTA
	pH 8,0	
2 x SDS-Probenpuffer	1,2 ml	H ₂ O
	8,3 ml	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
	6 ml	10 % SDS (w/v)
	1,5 ml	Glycerin
	9 mg/ml	Bromphenolblau
	5 %	β-Mercaptoethanol
10 x SDS-Elektrophoresepuffer	250 mM	Tris
	1,92 M	Glycin
	10 g/l	SDS
Semidry Blotting Puffer	48 mM	Tris
	39 mM	Glycin
	1.3 mM	SDS
	20%	Methanol
TBST	100 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1,5 M	NaCl
	0,5%	Tween 20
Ko-IP Lysis Puffer	20 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	1 %	Nonidet P-40
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	10 mM	Na-β-Glycerophosphat frisch zugeben:
	1 mM	Na ₃ VO ₄
	1 mM	Pefablock

Material und Methoden

Triton Lysis Puffer	20 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	137 mM	NaCl
	10%	Glycerol
	1%	Triton X-100
	2 mM	EDTA
	50 mM	Na-β-Glycerophosphat
	20 mM	Na-Pyrophosphat
		frisch zugeben:
	1 mM	Na ₃ VO ₄
	1 mM	Pefablock
Mowiol	2,4 g	Mowiol 4-88
	6 ml	Glycerol
	6 ml	dH ₂ O
		über Nacht bei Raumtemperatur (RT) quellen lassen
	12 ml	Tris (0,2 M), pH 8,5
		unter Rühren bei 50 °C lösen
		15 min bei 5000 g zentrifugieren und den Überstand mit
		10% (w/v) DABCO versetzen
		Aufbewahrt in 1 ml Aliquots in Eppendorfgefäßen bei –
		20 °C
	Einmal geöffnet bis zu 1 Monat bei 4 °C haltbar	
Formamid-Ladepuffer	98 %	Formamid
	10 mM	EDTA (200 µl einer 0,5 M fl.Stocks)
	0,025 %	Bromphenolblau
	0,25 %	Xylene Cyanol

2.1.14 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Acrylamidlösung 30%	Roth, Karlsruhe
Agarose NEE0 Ultra Qualität	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad, München
Ampicillin	Roche, Mannheim
Bacto-Agar	Becton-Dickinson, Heidelberg
Borsäure	Roth, Karlsruhe
β-Glycerophosphat	Sigma, Steinheim
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
BioMax MR Film	Kodak
Bovines Albumin (BA)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Steinheim
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
DABCO (1,4-Diazabicyklo-[2,2,2]-oktan)	Sigma, Steinheim
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, Steinheim
DNA-Längenstandard MassRuler™	Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-6 x loading buffer	Fermentas, St. Leon-Rot
EDTA (Ethylendinitrilotetraessigsäure)	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe

Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd 10% (Methanol frei)	Worthington, PA
Glukose	Roth, Karlsruhe
Glutamin	MP Biomedicals, Eschwege
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Becton-Dickinson, Heidelberg
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Mowiol 4-88	Calbiochem, Bad Soden
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdesoxycholat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumvanadat	Sigma, Steinheim
Nitrocellulose Transfer-Membran, Protran NP-40	Schleicher & Schuell, Dassel
Nylon Transfer-Membran, Nytran N	Fluka, Heidelberg
Pefabloc	Schleicher & Schuell, Dassel
Ponal-Klebstoff	Roth, Karlsruhe
Protein G-Agarose	Henkel
Protein-Molekulargewichtsstandard	Roche, Mannheim
Redivue L γ -[³² P]-ATP	Fermentas, St. Leon-Rot
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Hartmann Scientific, Braunschweig
SuperSignal West Extended Duration Substrate	Serva, Heidelberg
TEMED	Pierce, Rockford, IL
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Serva, Heidelberg
Triton-X100	Roth, Karlsruhe
Trypton	Serva, Heidelberg
Tween-20	Difco, Heidelberg
	Roth, Karlsruhe

2.1.15 Geräte

ABI Prism 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Brutschränke	Nuaire/Zapf, Sarstedt
Elektrophorese-Zubehör	BioRad, München
Bioimager FLA-2000 G	Fujifilm, Düsseldorf
ImagePlate Eraser	Raytest, Straubenhardt
Luminometer LB96V EG+G	Berthold, Bad Wildbad
Personal Cycler	Biometra [®] , Göttingen
Sterilarbeitsbank Hera Safe	Thermo Fischer, Schwerte

Zentrifugen:

Zentrifuge J2-21 (Rotoren JA-14 und JA-20)	Beckman [®]
Zentrifuge RC5C (Rotoren SS-34 und GSA)	Sorvall [®] Instruments
Ultrazentrifuge L8-70M (Rotor SW 28)	Beckman [®]

Ultrazentrifuge TL-100 (Rotor TLA 45)	Beckman®
Biofuge pico	Heraeus
Labofuge 400R	Heraeus
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf

Mikroskope:

Immunfluoreszenz-Mikroskop Diaphot 300	Nikon, Düsseldorf
SPOT RT Digitalkamera	Diagnostic Instruments
Leica DM IL (Zellkultur)	Leica Microsystems, Wetzlar

2.1.16 Software

Mac OS X 10	Betriebssystem
Windows NT, XP, Vista	Betriebssystem
Lasergene 6	Sequenzauswertung
ClustalW2	Sequenzvergleich
SPOT 3.5.5 für Windows	Kamerasteuerung
Adobe Photoshop CS3 extended	Bildbearbeitung
Microsoft Office 2003	Textverarbeitung
Microsoft Powerpoint 2003	Grafikgestaltung
Microsoft Excel 2003	Tabellenkalkulation
Adobe Acrobat	Dateierstellung/Betrachtung

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Eukaryotische Zellen wurden unter sterilen Bedingungen gehandhabt. MDCKII Zellen wurden in MEM kultiviert, HEK-293T, A549 und HeLa Zellen wurden in D-MEM kultiviert. Den Medien wurden 10% FBS, 2 mM L-Glutamin und 100 µg/ml Pen/Strep zugefügt. Vor der Zugabe der Medien oder dem PBS-Puffer wurden diese in einem Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt. Kultivierung der Zellen erfolgte in 75 cm² Zellkulturflaschen bei 37 °C, 5% CO₂ und H₂O-gesättigter Atmosphäre. In der Regel wurden die Zellen zweimal pro Woche passagiert.

2.2.1.1 Passage von Zellen

Um die Zellen in einem Zustand gleich bleibenden Wachstums zu halten, wurden diese bei Konfluität des Zellrasens in einer geringeren Zelldichte in neue Flaschen

umgesetzt. Dazu wurde das Medium abgegossen, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml Trypsin/EDTA im Brutschrank inkubiert, bis sich die Zellen vom Flaschenboden lösten. Die Trypsinreaktion wurde dann mit frischem Medium abgestoppt, die Zellen in diesem suspendiert und in neue Kultur-Flaschen oder – Schalen mit vorgelegtem Medium überführt. Folgende Kulturgefäße, Zellzahlen und Medienvolumen wurden verwendet:

T75 Flasche	1×10^7 Zellen	10 ml Medium
10 cm Schale	1×10^7 Zellen	10 ml Medium
60 mm Schale	$2,5 \times 10^6$ Zellen	3 ml Medium
35 mm Schale	1×10^6 Zellen	1,5 ml Medium
12 Kalotten-Platte	5×10^5 Zellen	1 ml Medium
24 Kalotten-Platte	$2,5 \times 10^5$ Zellen	0,5 ml Medium
48 Kalotten-Platte	1×10^5 Zellen	0,3 ml Medium

2.2.1.2 Einfrieren von Zellen

Um Zellen dauerhaft zu lagern, wurden diese in Kryoröhrchen bei -70 °C oder in flüssigem Stickstoff (-196 °C) gelagert. Dazu wurden nahezu konfluent mit Zellen bewachsene Flaschen wie bei der Passage von Zellen trypsiniert, die Reaktion mit Medium abgestoppt, die Zellen suspendiert und 3 min bei 800 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 2 ml Medium mit 10 % DMSO und 20 % FBS aufgenommen und je 1 ml in ein Kryoröhrchen pipettiert. Diese wurden dann langsam innerhalb eines mit Isopropanol gefüllten Isoliergefäßes (Nalgene) eingefroren.

2.2.1.3 Infektion von Zellen

Für eine Infektion mit Inflenzaviren wurden die Zellkulturen am Vortag umgesetzt, so dass sie am Infektionstag subkonfluent (ca. 80 %) waren. Die Zellen wurden dann mit PBS gewaschen und mit der gewünschten Anzahl an Viren pro Zelle (Multiplizität der Infektion, MOI) verdünnt in PBS/BA für 45 min bei RT inkubiert, dabei ab und zu geschwenkt, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Das Volumen wurde dabei entsprechend der Größe der zu infizierenden Fläche gewählt und möglichst gering gehalten, um die Konzentration der Viren nicht zu vermindern. Nach der Inkubation wurde das Inokulum abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit Infektionsmedium (0,2 % BSA statt FBS) überschichtet und dann für die gewünschte Zeit bei 37 °C in einem separaten Inkubator gelagert.

Für multicyclische Replikation der Viren wurde dem Medium 2 µg TPCK-behandeltes Trypsin zugegeben. Dieses spaltet das HA-Protein der neugebildeten Viren und ermöglicht es diesen, einen neuen Infektionszyklus in weiteren Zellen zu beginnen.

2.2.1.4 Transfektion von Zellen

Um Fremd-DNA in eukaryotische Zellen einzubringen, wurde die auf Kationischen-Lipidkomplexen beruhende Transfektion mittels Lipofektamin 2000 verwendet. Für die Transfektion wurden die Zellen vortags 1:2 umgesetzt, damit sie sich am Transfektionstag in der Wachstumsphase befanden und ungefähr 90 % konfluent waren.

Für 1×10^6 Zellen (35 mm Schale / 6-Well) wurden folgende Mengen verwendet, die bei anderen Größen entsprechend angepasst wurden. Pro µg zu transfizierender DNA wurden 1,5 µl Lipofektamin 2000 in 200 µl Optimem aufgenommen und 5 min bei RT inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde während dieser Zeit ebenfalls in 200 µl Optimem aufgenommen, nach der Inkubation mit dem Lipofektamin vereinigt und diese Mischung wurde für 20 min ebenfalls bei RT inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurden die Zellen trypsiniert, die Reaktion mit Medium abgestoppt und die Zellen durch Zentrifugation in 15 ml Röhrchen bei 800 rpm pelletiert. Die Zellen wurden dann in der gewünschten Menge Transfektions-Medium (möglichst wenig, für 35 mm Schalen 1 ml Medium) aufgenommen und auf die gewünschten Kulturgefäße verteilt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Lipofektamin-DNA-Komplexe in Optimem tropfenweise auf die Zellen gegeben und durch Schwenken gut verteilt. 4-6 h später wurde das Medium mit den nicht aufgenommenen Komplexen durch frisches Infektionsmedium ausgetauscht.

2.2.2 Virologische Methoden

2.2.2.1 Virusanzucht im embryonierten Hühnerei

Influenzaviren werden klassischerweise in embryonierten Hühnereiern angezüchtet. Dazu werden embryonierte Hühnereier 11 Tage lang im Brutschrank bei 37% und ständiger Bewegung inkubiert. Zur Inokulation mit Influenzaviren werden die Eier mit einer starken Lampe durchleuchtet, um sicher zu gehen, dass die Eier eine normale Embryonalentwicklung durchgemacht haben. Die Eier wurden mit der Spitzen Seite nach unten in Eierkartons gestellt und das Stumpfe Ende mit einer alkoholischen

Desinfektionslösung abgespritzt. Für die Infektion wurden Virusverdünnungen in PBS⁺⁺ so hergestellt, das in 100 µl Inokulat jeweils 1000 PFU vorlagen. Dann wurde in die Schale im Bereich der Luftblase ein kleines Loch gebohrt, und 100 µl Inokulat mittels einer 1 ml Spritze (Braun, Omnifix-F) und einer passenden Kanüle (Braun Injekt Gr. 18, 0,45x25mm), die senkrecht und bis zum Anschlag in das Loch eingeführt wurde, in die Allantoishöhle injiziert. Anschließend wurde das Loch in der Eierschale mit Ponal-Klebstoff (Henkel) verschlossen. Die Eier wurden dann für 48 h bei 37 °C und 80 % Luftfeuchtigkeit rotierend im Brutschrank inkubiert. Um bei der Entnahme das Risiko eines Einblutens aus den Gefäßen des Embryos in die Allantoisflüssigkeit zu verringern, wurden die Eier ÜN (mindestens 6 h) bei 4 °C im Kühlraum abgekühlt.

Für die Ernte der Allantoisflüssigkeit wurde die Schale im Bereich der Luftblase entfernt und die Eierhaut mit einer sterilen Kanüle geöffnet. Der Dottersack wurde mit einem stumpfen Spatel vor Verletzung geschützt, während die Allantoisflüssigkeit mittels Glaspipette abgenommen und in 15 ml Röhrchen auf Eis gegeben wurde. Diese wurden mit 3500 rpm zentrifugiert, der Überstand mittels HA-Test auf den Gehalt an Virus getestet und die positiven Proben anschließend aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Allantois-ÜS aus Eiern, die mit demselben Virus infiziert wurden und gleiche HA Werte hatten, wurden gesammelt und dann aliquotiert.

2.2.2.2 Plaquetest mittels Flüssigoverlay und Infrarotdetektion

Zum Bestimmen der Viruskonzentration wurden CKII-Zellen in 48-Kalotten Platten mit Avicel-RC-581-Overlaymedium verwendet. Dazu wurden MDCKII Zellen am Vortag trypsiniert und in einer T75 Flasche in 37,5 ml Medium aufgenommen. Mit einer Multipette (Eppendorf) wurden je 300 µl der Zellsuspension in die Kalotten gegeben und ÜN im Brutschrank inkubiert, so dass sie bis zum nächsten Morgen einen dichten Zellrasen (80-90 % konfluent) bildeten.

Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt, der Zellrasen 2 x mit PBS gewaschen und dann mit 100 µl verschiedener 1:10-Verdünnungen der zu messenden Virus-Lösungen infiziert. Pro Verdünnung wurden mindestens drei Kalotten infiziert. Nach 45 min Infektion bei RT und gelegentlichem Schwenken wurden die Zellen mit dem Avicel-Overlay-Medium überschichtet, das die Diffusion der Viren in der Lösung verhindert. 24 h nach Infektion wurde das Avicel-Medium abgesaugt und die Zellen 2x mit PBS gewaschen bis das Medium komplett entfernt war. Dann wurden die Zellen fixiert (200 µl 2,5 % Formaldehyd in PBS für 15 min), permeabilisiert (200 µl 0,2 %

Triton X-100 in PBS für 10 min), 3 x mit PBS gewaschen und schließlich für mindestens 1 h mit einer anti-NP Antikörper-Lösung (Serotec Maus anti Influenza A Virus NP, 1:2000 in 100 µl 3 % BA-PBS) inkubiert. Nach erneutem Waschen (3 x PBS) wurden die Zellen für 90 min mit einem Infrarot-Marker-gekoppelten Sekundärantikörper auf einem Kippschüttler inkubiert (Licor α Maus IR-Dye700, 1:3000 in 100 µl 3 % BA-PBS). Da die Sekundärantikörper lichtempfindlich sind, wurden die Mikrotiterplatten durch Aluminiumfolie vor Licht geschützt. Nach der Inkubation wurden die Platten 2 x mit PBS und einmal mit H₂O gewaschen und die Restflüssigkeit komplett abgesaugt. Die Platten konnten dann mittels eines Odyssey *Infrared Imaging Systems* (Licor Biosciences, Lincoln, NE, USA) auf NP Expression der Zellen untersucht werden oder wurden bei 4 °C unter Lichtabschluss gelagert.

2.2.2.3 Hämagglutinations-Test

Der Hämagglutinations-Test (HA-Test) diente der schnellen Abschätzung von Viruskonzentrationen. Der Test basiert auf der Eigenschaft des HAs, Neuraminsäuren von Erythrozyten zu binden. Wenn man verschiedene Konzentrationen von Influenzaviren mit Erythrozyten mischt, kommt es ab einer gewissen Konzentration zu einer Quervernetzung der Erythrozyten. Diese lässt sich in V-förmigen Kalottenplatten nachweisen, da sich die Erythrozyten nicht mehr am tiefsten Punkt sammeln können, sondern in einem Netz am gesamten Boden der Kalotte haften. Über eine genaue Verdünnungsreihe lässt sich so abschätzen, wie viele Influenzaviren sich in einer Lösung befinden.

In einer 96-Kalotten-Platte (Greiner) wurden 100 µl Viruslösung in die Vertiefungen der ersten Spalte gegeben und alle weiteren Vertiefungen mit 50 µl kaltem PBS aufgefüllt. Von der ersten Spalte wurden dann jeweils 50 µl auf die nächste übertragen und die resultierenden durch Auf- und Abpipettieren vermischt. 50 µl der letzten Spalte wurden verworfen. Als Kontrolle wurde statt Virus einmal 100 µl PBS vorgelegt. Auf die resultierende 50 µl 1:2 Verdünnungsreihe wurden dann 50 µl einer 1 %-igen Hühnererythrozyten/0,9 %-igen NaCl-Lösung auf alle Vertiefungen pipettiert und durch leichtes Rütteln der Platten vermischt. Die Platten wurden dann 30 min auf Eis inkubiert, um die Aktivität der Neuraminidase zu unterbinden. Der reziproke Wert der Verdünnungsstufe, bei der als letztes gerade noch eine Hämagglutination beobachtet wurde, wird als HA-Titer bezeichnet.

2.2.2.4 Aufreinigen und Ankonzentrieren von Influenzaviren

Da einige der Viren mit mutiertem NS2 Protein stark attenuiert waren, wurden diese über ein 30%iges Sucrosekissen aufgereinigt und ankonzentriert. Dazu wurde zunächst die Allantoisflüssigkeit 5 min bei 4° C und 3000 rpm zentrifugiert, um Gewebestückchen und Erythrozyten zu entfernen. Anschließend wurden 10 ml einer 30%igen Sucrose-NTE-Lösung in SW28 Polyalomer-Zentrifugenröhrchen (Beckmann) vorgelegt und mit der Allantoisflüssigkeit überschichtet und mit PBS genau austariert. Durch Ultrazentrifugation für 90 min bei 25.000 rpm und 4° C in einem SW32 Ti Rotor (Beckmann) wurde das Virus durch das Sucrosekissen pelletiert. Nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes wurde das Viruspellet in 400 µl PBS / 0,2 % BSA aufgenommen und zum Lösen über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag konnten die Viruslösungen, die auf verschiedene Zentrifugenröhrchen aufgeteilt worden waren, wieder vereinigt werden, wurden dann gut gemischt, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.2.5 Analyse viraler RNA

Um die Identität der Virusmutanten zu überprüfen, wurde virale RNA aus Stammlösungen isoliert. Dazu wurde das *MinElute Virus Spin Kit* von Qiagen verwendet. 100 µl einer Allantois-Virusstammlösung wurden mit 100 µl PBS verdünnt. Nach Gewinnung der RNA nach dem Protokoll des Herstellers wurde die gewonnene RNA mittels geeigneter Primer und dem QIAgen One-Step RT-PCR Kit in cDNA umgeschrieben und anschließend amplifiziert. Das Amplifikat wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft, daraufhin in einer präparativen Gelelektrophorese aufgetrennt und aus der Agarose mittels des QIAex-Kits isoliert. Die gereinigte RNA wurde mit spezifischen Primern versetzt, durch eine PCR amplifiziert und das Produkt auf einem ABI *Prism 3100 Genetic Analyser* sequenziert.

2.2.3 Zellbiologische und Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Präparation von Plasmid-DNA und PCR Produkten

Folgende Reagenziensätze wurden zur Herstellung und Aufreinigung von Plasmiden nach Herstellerprotokoll benutzt:

Für geringe Mengen DNA (3 bis 9 µg) wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) verwendet, für größere Mengen (100 bis 600 µg) wurde das QIAGEN Maxi-Kit (Qiagen, Hilden) verwendet.

Für die Reinigung von Plasmiden und PCR Produkten wurde das QIAquick PCR Purification Kit verwendet (Qiagen, Hilden).

2.2.3.2 Reverse Genetik

Seit einigen Jahren sind Virologen in der Lage, Influenzaviren mittels revers-genetischer Systeme zu verändern. Dies stellte sich für Influenzaviren als vergleichsweise schwierig heraus, denn durch die negative Orientierung der viralen RNA ist diese für eine Wirtszelle nicht lesbar und kann deswegen nicht direkt in Proteine translatiert werden. Somit ist die vRNA alleine nicht in der Lage, einen Infektionszyklus zu initiieren, wie dies z.B. bei einigen Positivstrang-Viren der Fall ist. Für eine Transkription zu mRNA ist die virale Polymerase notwendig, die bei einer Infektion vom Virion mit in die Zelle eingeschleust wird. Damit die vRNA tatsächlich in mRNA und cRNA umgeschrieben werden kann, muss zudem noch genügend Nukleoprotein in den Zellen vorliegen, da die RNA ohne gebundenes NP nicht transkribiert oder repliziert werden kann. Um ein komplettes Influenzavirus revers-genetisch herzustellen, werden also die acht verschiedenen RNA-Segmente und vier verschiedene Proteine benötigt. Die minimale Konstellation einer replikativen Einheit besteht dabei aus einer der vRNAs und den vier Proteinen PB1, PB2, PA und NP. Abbildung 2.1 zeigt ein solches so genanntes Minigenom, das in der Lage ist, die enthaltene vRNA in einer Wirtszelle zu replizieren und zu exprimieren.

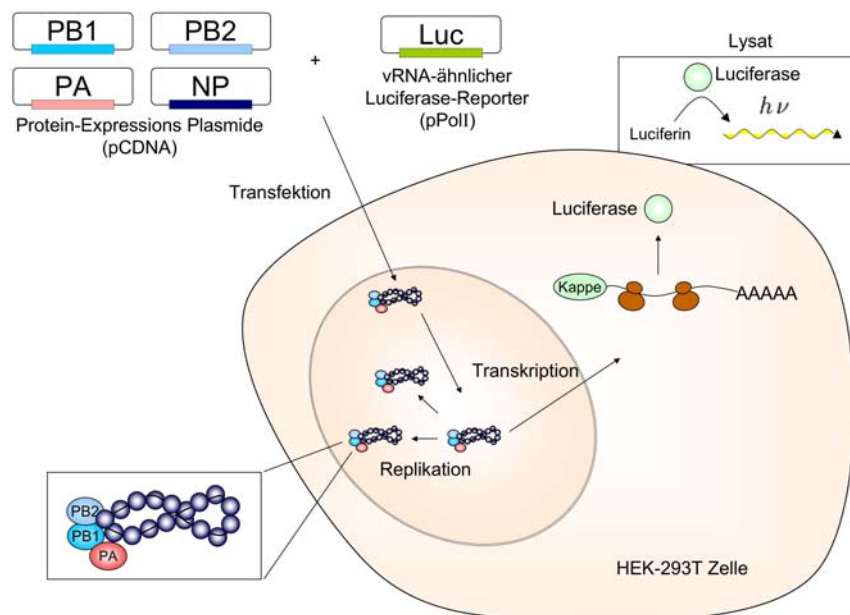


Abbildung 2.1. A. Schema des verwendeten Luciferase-Reporter-Minigenoms, bestehend aus vier Expressions-Vektoren für die drei Polymeraseproteine und NP sowie einem pPoll-Konstrukt.

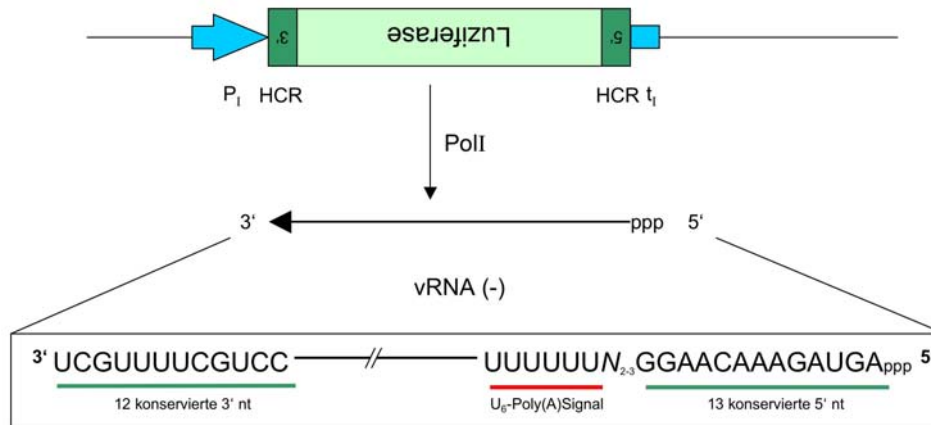


Abbildung 2.2 Schematische Darstellung des pPolI-NS-Luc Vektors. Nach Transfektion wird durch die RNA-Polymerase I der Wirtszelle die Luciferasekassette samt hochkonservierter 3'- und 5'-Enden transkribiert. Diese dient dann der kotransfizierten viralen Polymerase als vRNA-Vorlage. Replikation und Transkription dieser vRNA führt zur Expression einer Luciferase, deren Aktivität photometrisch quantifiziert werden kann. Abkürzungen: PI: humaner RNA-Pol I-Promotor; HCR: Hochkonservierte Region; PolI: RNA-Polymerase I; tI: Hepatitis Delta Ribozym.

2.2.3.3 Luziferase-Reportergen-Studien

Um die Expression des Influenzavirus Minigenom zu messen, wurden Luziferase-Reportergen-Studien durchgeführt. In dem hier verwendeten pPol-NS-Luc Konstrukt befindet sich anstelle der beiden viralen NS-Gene das Luziferase-Gen unter Kontrolle der viralen Promotoren. Die virale Polymerase schreibt das vRNA-ähnliche Konstrukt in mRNA um, was zur Expression der Luziferase durch die Wirtszelle führt. Diese setzt im Lysat dann in einer enzymatischen Reaktion das Substrat Luziferin um. Die dabei auftretende Lumineszenz wurde über ein Luminometer der Marke EG+G Berthold detektiert und ist ein Maß für die Expression des Minigenoms. Für ein Minigenomassay wurden 4×10^5 293T Zellen transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen und in 100µl *Passive Lysis* Puffer lysiert. Die Aktivitäten der Leuchtkäfer-Luziferase und der Renilla-Luziferase wurden mit dem *Dual-Luciferase Reporter Assay System* bestimmt. Über die Aktivität des konstitutiv aktiven TK Promotors wurden die Reportergenaktivität normalisiert. Die Aktivität des Reportergens wurde in Doppelsätzen ermittelt und im Vergleich zur Aktivität in kontroll-behandelten Zellen angegeben.

2.2.3.4 Northern Blot

Für den Nachweis viraler RNA wurde gereinigte RNA durch Elektrophorese in Agarosegelen aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran übertragen. Auf der Membran

wurde sie dann mit einer Digoxigenin (DIG) markierten DNA oder RNA-Sonde und entsprechenden Antikörpern nachgewiesen.

Sondenherstellung

Zuerst wurde eine **Sonde** für das NS-Segment des Influenzavirus hergestellt. Dazu wurde 1 µg linearisiertes pPolI-NS-Luc Plasmid mit

2 µl ATP (10 mM)
2 µl GTP (10 mM)
2 µl CTP (10 mM)
1,3 µl UTP (10mM) (bzw. 2 µl für Ansätze ohne DIG)
0,7 µl DIG-UTP
2 µl 10x Puffer
1 µl RNase-Inhibitor (RNasin)
40 U T7-RNA-Polymerase
aufgefüllt auf 20 µl H₂O reinst

für 2 h bei 37 °C inkubiert und die Reaktion mit 2 µl EDTA (0,2 M) gestoppt. Als Kontrolle diente die Ziel-RNA, die ebenfalls *in vitro* transkribiert wurde, aber ohne DIG-UTP.

Die **Markierungseffizienz** wurde über eine Verdünnungsreihe, die zusammen mit einem markierten Standard auf eine Nylonmembran getropft wurde, und anschließender Detektion überprüft. Die Detektion erfolgte durch Chemolumineszenz und Exposition auf Röntgenfilm.

Agarose Formaldehyd Gelelektrophorese

Für 100 ml Gelvolumen wurde 1 g Agarose in 84,7 ml DEPC-behandeltem H₂O aufgeköcht. Nach Abkühlen auf 60 °C wurden dann 10 ml 10x MEN Puffer und 5,3 ml Formaldehyd hinzugegeben. Die Gelelektrophorese erfolgte in einer mit *RNase away* gereinigten Kammer, gefüllt mit 1x MEN Laufpuffer. Das Gel wurde vor dem Beladen mit Proben 10 min mit umgekehrter Polung elektrophoriert. Die Proben wurden mit dem 1,8-fachen Volumen an Probenpuffer versetzt, 10 min bei 65 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt und in die ausgespülten Taschen des Gels geladen. Die Proben wurden 15 min mit 50 V einlaufen gelassen, bevor die eigentliche Elektrophorese mit 5 V pro cm Gellänge für 2-3 h erfolgte. Dabei wurde das Gel alle 30 min gewendet und die Polung umgedreht. Anschließend wurde das Gel fotografiert, 2 x 15' mit DEPC-H₂O und 1 x 15' mit 20 x SSC gewaschen.

Blotten auf Nylonmembran mit Vacugene XL

Die Membran wurde erst in H₂O, dann in 20x SSC äquilibriert, auf die Trägermembran gelegt und eine Maske darübergezogen. Auf diese wurde das Gel gelegt und mit 20x

SSC beschichtet. Dann wurde ein Vakuum von 40-55 mBar angelegt und die RNA für mindestens 30 min auf die Nylonmembran transferiert. Anschließend wurde die Membran kurz in H₂O gewaschen, 3' min UV bestrahlt, um die RNA an die Membran zu binden, und die Membran ebenfalls fotografiert.

Hybridisierung

Vor der eigentlichen Hybridisierung wurde die Membran 2 h mit auf 68 °C temperiertem Churchpuffer (10' bei 68 °C im H₂O Bad) bei 40 °C inkubiert. Hybridisierung erfolgte dann in ebenfalls vortemperiertem Churchpuffer mit der Sonde über Nacht bei 42 °C. Anschließend wurde die Membran

1x5' bei RT in reichlich 1x SSC mit 0,5% SDS (w/v)

2x30' bei 60 °C in reichlich 1x SSC mit 0,5% SDS (w/v)-vorgewärmt

1x30' bei 60 °C in reichlich 0,1x SSC mit 0,5% SDS (w/v) –vorgewärmt

gewaschen und für die

Detektion

1 x 5' bei RT in 1x Maleinsäurepuffer ohne Tween äquilibriert und 30' bei RT in Blockierungslösung (10x in 1x Maleinsäurepuffer verdünnt) blockiert. Dann wurde die Membran 30' mit Anti-DIG-Antikörper (Enzymgekoppelt: Alkalische Phosphatase, 1:10.000 verdünnt in 1x Blockierungslösung) bei RT inkubiert. Anschließend wurde 2 x 15' mit 1x Maleinsäure ohne Tween gewaschen und die Membran 2-5' in Detektionspuffer äquilibriert.

Für die Detektion wurde die Membran auf Frischhaltefolie gelegt, mit CPD-Star Substrat (1:100 verdünnt in Detektionspuffer) bedeckt und für 5' bei RT inkubiert. Der Nachweis erfolgte mittels Autoradiographie. Als Ladekontrolle für die RNA diente die 18 S rRNA der Wirtszellen.

2.2.3.5 Primer Extension Analyse

Die *Primer-Extension* Analyse diente in dieser Arbeit der Quantifizierung der verschiedenen RNA-Spezies, die während einer Influenzavirus Infektion entstehen. Dazu wurden der jeweils zu detektierenden RNA komplementäre Oligo-Desoxyribonukleinsäuren als Sonden hergestellt (Synthetisiert durch Biotex, Berlin), jeweils eine für den entsprechenden (+) und (-) RNA-Strang. Die komplementären Bereiche der Ziel-RNA sollten optimalerweise im Bereich von 50-200 Basen Länge vor dem 5'-Ende liegen (siehe Abb. 3.4). Die Oligos wurden dann durch eine Kinasereaktion mit $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (Hartmann Scientific, Braunschweig) markiert und im

Überschuss zu isolierter Gesamt-RNA (5 µg) von infizierten oder transfizierten Zellen gegeben. Die RNA samt Oligonukleotiden wurde anschließend auf 70 °C erhitzt, so dass sich die Doppelstrangbereiche voneinander trennten und der Primer sich an die Zielsequenz anlagern konnte. Nach Abkühlen auf Eis wurden Nukleotide, Puffer, RNAsin hinzu gegeben, das Reaktionsgefäß auf 37 °C gebracht, die Reverse Transkriptase (RT) dazu gegeben und der Reaktionsansatz dann für 1 h bei 42 °C inkubiert. Die RT verlängerte den radioaktiv markierten Primer bis zum Ende der Ziel-RNA. Nach Abschluss der Reaktion wurde die Lösung durch einen formaldehydhaltigen Ladepuffer und Erhitzen auf 95 °C denaturiert und anschließend in denaturierenden 7M-Harnstoff-Polyacrylamid-Gelen (14,5 cm x 18 cm x 0,5 mm) elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurden verschiedene Acrylamidkonzentrationen verwendet, jeweils 7M mit Urea versetzt. Tabelle 2.1 zeigt die Zusammensetzung der entsprechenden Gellösungen. Mischen führt zum Abkühlen der Lösungen (Chaotrop). Deswegen wurde zum vollständigen Lösen vorsichtig erhitzt. Die Lösungen wurden durch Faltenfilter in lichtdichte Flaschen abgefüllt und bei RT gelagert.

Tabelle 2-1 Acrylamid-Urea-Stocklösungen:

	500 ml: 15 %	500 ml 12 %	500 ml: 10%	500 ml 8 %	500 ml 6 %	
Acryl Amid	76 g	60 g	50 g	40,53 g	30 g	19 AA
Bis AA	4 g	3,16	2,63 g	2,13 g	1,58 g	1 BAA (w/w)
Urea	210 g	210 g	210 g	210 g	210 g	
TBE 10x	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml	
H ₂ O	to 500	to 500	to 500	to 500	to 500	DEPC-behandelt
APS 10%	2,5 ml	2,5 ml		2,5 ml	2,5 ml	
Temed	250 µl	250 µl		250 µl	250 µl	

Zur Visualisierung der Auftrennung während der Elektrophorese dienten Bromphenolblau und Xylencyanol im Ladepuffer. Nach Abschluss der Elektrophorese (Konstant 600 V, 1-2 h) wurde das Gel auf Whatman-Papier gekippt und mit Folie abgedeckt. Die radioaktiv markierten RNA Moleküle spezifischer Größe konnten dann über Röntgenfilm oder *Phosphorimaging* detektiert und quantifiziert werden. Exposition erfolgte auf Röntgenfilm (Kodak Biomax) bei -80 °C in einer Filmkammer mit *Intensifying Screen* oder auf einer *Image Plate* (IP) bei RT. Das *Phosphorimaging* hatte gegenüber Röntgenfilm den Vorteil der wesentlich genaueren Quantifizierung der Strahlungsmenge. Exponiert wurde 2-3 Tage.

2.2.3.6 DNA-Sequenzierung

Alle DNA-Sequenzierungen wurden mit dem ABI BigDye Terminator 3.1 System durchgeführt. Dieses System funktioniert nach der Kettenabbruch-Methode nach Sanger (Sanger et al., 1977). In einer Polymerasekettenreaktion werden dabei neben den vier Desoxyribonukleotiden (ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP) auch fluoreszenzmarkierte Didesoxyribonukleotide (ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP) eingesetzt. Wird bei der Kettenverlängerung durch die Polymerase dann zufälligerweise ein Didesoxyribonukleotid eingebaut, kommt es zum Abbruch der Kette, da den ddNTPs die 3'-Hydroxylgruppe fehlt. Dies führt nach entsprechender Zyklenzahl zu Fragmenten aller möglichen Längen, die je nach dem eingebauten ddNTP mit einer unterschiedlichen Fluorophor markiert sind. Diese Fragmente werden mittels Kapillarelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und mittels einer speziellen Software wird das entstehende Fluoreszenzmuster zu einer Nukleotidsequenz verarbeitet.

Die in der Sequenzier-PCR eingesetzte DNA-Menge richtet sich nach der Länge des zu untersuchenden DNA-Fragments:

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

Sequenzieransatz

DNA-Probe + 0,5 µl Primer (20 µM) + 1 µl BigDye 3.1 ad 10 µl ddH₂O

PCR-Zyklus:

Schritt	Temperatur	Dauer	
1	Denaturierung 95 °C	1 min	
2	Denaturierung 95 °C	10 s	25 Zyklen (Schritt 2-4)
3	Annealing 55 °C	5 s 25	
4	Elongation 60 °C	4 min	
5	Pause 4 °C	∞	

Die durch die PCR amplifizierten Fragmente wurden im hausinternen Sequenzierlabor des Robert Koch-Instituts sequenziert. Anschließend wurden die Sequenzen mit der Lasergene Seqman Software analysiert.

2.2.4 Proteinanalytische Methoden

2.2.4.1 Bestimmung des Proteingehaltes von Lösungen

Für die Messung des Proteingehalts einer Lösung mittels Photometrie wurde der Bradford-Test verwendet. Dieser beruht auf dem Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250. Die Bindung des Farbstoffs an Proteine verschiebt das Absorptionsspektrum von 465 nm zu 595 nm (Bradford, 1976).

Für die Bestimmung wurde eine Lösung von 800 µl H₂O und 200 µl Bradfordlösung (BioRAD) pro Ansatz gemischt. Zu 1 ml dieser Lösung wurden jeweils 2 µl Probe gegeben. Als Referenzwert diente der verwendete Protein-Lyse-Puffer. Die Lösungen wurden kurz gevortext und dann 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm mit einem Photometer bestimmt.

2.2.4.2 Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)

Proteine können durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrem unterschiedlichen Molekulargewicht aufgetrennt werden. Dazu werden die Proteine durch das Versetzen mit β-Mercaptoethanol und SDS Behandlung denaturiert. Der Überschuss an negativer Ladung durch die gebundenen anionischen SDS-Moleküle überdeckt die Eigenladung der Proteine und sorgt für eine negative Ladung, die proportional zur Länge der Peptidkette ist. Die Auftrennung der Proteine erfolgt dann durch den Siebeffekt bei der Elektrophorese durch das SDS-Polyacrylamid-Gel, d.h. größere Proteine wandern langsamer durch das elektrische Feld.

Tabelle 2-2 Zusammensetzung der Lösungen für die verwendeten SDS-PAA Gele

	Trenngel				Sammelgel
	7,5 %	10 %	12,5 %	15 %	5%
H ₂ O	4,8 ml	4 ml	3,2 ml	2,8 ml	2,8 ml
30 % AA *	2,5 ml	3,3 ml	4,1 ml	5,0 ml	0,83 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml				-
0,5 M Tris pH 6,8	-				1,25 ml
10 % SDS	100 µl				50 µl
10 % APS	100 µl				50 µl
TEMED	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl
<i>Total</i>	<i>10 ml</i>	<i>10 ml</i>	<i>10 ml</i>	<i>10 ml</i>	<i>5 ml</i>

* (30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid 37,5:1)

Proben wurden 1:1 mit 2x SDS-PP versetzt und 3' bei 95 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt und 30 sec bei 13k rpm zentrifugiert. Entsprechende Gele wurden mit dem BioRAD Mini-Protean-3 System gegossen. Die Glasplatten wurden vor dem Gießen

mit 80 %igem EtOH gereinigt. Die Zusammensetzung der Gele ist Tabelle 2.2 zu entnehmen.

Für die Detektion des NS2-Proteins wurden immer 15 % PAA Gele verwendet. Für die Größenbestimmung wurde ein markierter Proteinstandard verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 140 V und je nach der Dicke der Gele und den zu untersuchenden Proteinen zwischen 40 min und 2 h.

2.2.4.3 Immunoblot

Für den spezifischen Nachweis von Proteinen wurden in Polyacrylamidgelen aufgetrennte Proteinlysate mittels *Semi-Dry-Blotting* in einer BioRad Kammer auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Dazu wurden 6 Whatman Papiere und die Nitrocellulosemembran 30 min vor dem Transfer in Puffer äquilibriert. Die Apparatur wurde dann wie folgt aufgebaut. Auf die Anode des Geräts wurden 3 übereinander gelegte Whatman Papiere gelegt, auf diese die Membran, dann das Gel, 3x Whatman auf das Gel und das Ganze dann mit der Kathode im Deckel abgeschlossen. Um Luftblasen zwischen den Lagen zu entfernen, wurde der Stapel vor dem Schließen des Deckels mit einem Glasstab unter Druck abgerollt. Dann wurde die Elektrophorese je nach Dicke des Gels und Größe der nachzuweisenden Proteine bei 75 mA pro Gel für 45-120 min durchgeführt. Im Anschluss an den Transfer wurden die Proteine auf der Membran mit Ponceau gefärbt, und das resultierende Bandenmuster gescannt. Dann wurde der Blot mit einem Skalpell in einzelne Banden geschnitten, um diese separat mit verschiedenen Antikörpern inkubieren zu können. Der Ponceau Farbstoff wurde anschließend mit 0,5 % Tween20 in Tris-gepufferter Saline (TBS-T) entfernt, bevor die Membran für 20 min mit 3%igen Milchpulver (MP) in TBS-T bei ständigem Schwenken blockiert wurde. Anschließend wurde die Blockierungslösung entfernt und 3 x kurz mit TBS-T gewaschen, bevor die Blotstreifen mit den primären Antikörpern in 0,3% MP in TBS-T für 1h bei RT oder ÜN bei 4 °C inkubiert wurden. Überschüssiger Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen in TBST für jeweils 5' entfernt und die Membranstreifen dann für 1 h mit Sekundäantikörpern inkubiert. Danach wurde 6x für 3 min mit TBS-T gewaschen, um überschüssigen Sekundäantikörper zu entfernen. Die Detektion der nachzuweisenden Proteine erfolgte dann durch Inkubation der Membran mit Supersignal WestDura Extended Duration Substrat (Pierce) für 5 min. Die Peroxidase der Sekundäantikörper setzt dabei lokal das Substrat unter

Chemolumineszenzbildung um und diese konnte dann durch Autoradiografie nachgewiesen werden.

2.2.4.4 Immunfluoreszenzmikroskopie

Virale und Zelluläre Proteine wurden über indirekte Immunfluoreszenz detektiert. Dazu wurden die zu untersuchenden Zellen auf runden Deckgläsern (12 mm Durchmesser, 0,16 mm Stärke) ausgesät, zum gewünschten Zeitpunkt nach Transfektion oder Infektion zweimal mit PBS gewaschen und dann mit 2,5 % Formaldehyd in PBS (Methanolfrei) fixiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen durch 0,2%ige Triton-X100 Lösung in PBS permeabilisiert und im Anschluss dreimal mit PBS gewaschen. Die Antikörper wurden in PBS mit 3% BSA gelöst und für 3 min bei 18k g zentrifugiert, um eventuelle Präzipitate zu entfernen. Dann wurden 20 µl Antikörperlösung auf Parafilm gegeben und jeweils ein Deckglas mit den Zellen zum Tropfen darauf abgelegt. Die Deckgläser wurden dann für 1 h bei RT inkubiert oder ÜN bei 4 °C im Kühlraum. Nach der Inkubation mit den primären Antikörpern wurden die Deckgläser mit den Zellen nach oben in eine 24 Lochplatte mit PBS gegeben und noch 2x mit PBS gewaschen. Die Sekundärantikörper wurden ebenfalls in 20 µl Tropfen auf Parafilm aliquotiert und die Zellen damit für 1 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Ende der zweiten Inkubation wurden die Zellen 2 x in PBS und 1 x mit H₂O gewaschen, letzteres diente dem Entfernen von Salzen die evtl. bei der IF stören könnten. Beschriftete Objektträger (Superfrost, geschnitten, 76x26mm, Roth, Karlsruhe) wurden mit 5 µl Tropfen Mowiol pro Deckglas vorbereitet und die Deckgläser mit einer Pinzette langsam ohne Luftblasen auf dem Tropfen abgelegt. Die Präparate wurden ÜN bei 4 °C an der Luft durchgetrocknet.

2.2.4.5 Immunpräzipitation

Durch Koimmunpräzipitation können Interaktionen von Proteinen nachgewiesen werden. Dazu wurden hier Zellen mit Immunpräzipitationspuffern (IP-Puffer) lysiert und die Zielproteine mittels eines Überschusses an spezifischem Antikörper (1 µg) in 1 ml Puffervolumen bei 4 °C und leichter Rotation ÜN gebunden. Zu dem Lysat mit den Protein-Antikörper-Komplexen wurde 50 µl Protein G-Agarose gegeben, die spezifisch an den Fc-Teil von IgG Antikörpern bindet, und das Lysat erneut für 3 h bei 4 °C rotiert. Nicht komplexierte Proteine wurden durch dreimaliges Waschen und Zentrifugieren bei 10.000 rpm und 4 °C für 10 sec entfernt. Das Protein G-Agarose

Pellet wurde anschließend in 20 μ l 2x SDS Probenpuffer aufgenommen, 5 min bei 95 °C und mittels SDS-PAA Gelelektrophorese und Immunoblotting analysiert (Siehe 2.2.4.2 und 2.2.4.3).

3 Ergebnisse

Eine seit längerem bekannte Hypothese besagt, dass die intrazelluläre Konzentration des NP Proteins eine wichtige Rolle bei der Regulation der viralen Replikation spielt (Arnheiter et al., 1985; Hay et al., 1977). Eine niedrige NP Konzentration zu Beginn der Infektion fördert die mRNA Synthese, aber wenn die Translation dieser mRNA fortschreitet und die NP Konzentration ansteigt, ändert sich der Schwerpunkt der RNA Synthese von Transkription hin zur Replikation der vRNA. Neuere Ergebnisse bestätigen zwar die Notwendigkeit des NP Proteins für die Replikation der vRNA, allerdings haben ansteigende NP Konzentrationen entweder keinen positiven Effekt auf vRNA Replikation (Vreede und Brownlee, 2007), oder aber sogar einen negativen Effekt (Mullin et al., 2004).

Ein neuer Kandidat für ein regulatorisch wirksames Protein war das virale NS2 Protein (siehe Abschnitt 1.4). Das Ziel dieser Arbeit war daher die Charakterisierung des regulatorischen Einflusses des NS2 Proteins auf die RNA-Synthese des Influenza A Virus.

Dazu sollte zuerst die berichtete negative Regulierung (Bullido et al., 2001) der Reporterexpression eines Minigenoms durch das NS2 Protein verifiziert werden.

3.1 Das NS2 Protein verringert die Expression vRNA-ähnlicher Reportergenkonstrukte

Im Zuge der Entwicklung von revers-genetischen Systemen wurden die minimal notwendigen Komponenten bestimmt, die zur Replikation einer viralen RNA benötigt werden (Huang et al., 1990). Demnach sind die drei Polymeraseproteine und das Nukleoprotein ausreichend für die Expression und Replikation eines vRNA-ähnlichen Reportergenkonstruktes. Enami et al. überprüften, welche viralen Komponenten einen Einfluss auf die Polymerasefunktion haben. Dabei wurde kein Effekt des NS2 Proteins auf die Expression des Reportergens beobachtet (Enami et al., 1994). 2001 konnten Bullido und Kollegen dagegen mit einem *cat*-Reporter in CHO-Zellen zeigen, dass NS2 die Expression dieses Minigenoms dosisabhängig negativ reguliert (Bullido et al., 2001). Dabei wurden in allen drei Studien für die Protein-Expression Vaccinia Virus Vektoren verwendet. Ob NS2 nun also eine Rolle in der Regulation der RNA-Synthese spielte oder nicht, wurde bis dato kontrovers diskutiert.

Ergebnisse

Um zu klären, ob der Einfluss des NS2 Proteins auf die virale RNA-Synthese auch ohne Helfer-Viren und mittels anderer Nachweissysteme (Luziferase-Assay) bestätigt werden kann, wurden HEK-293T Zellen mit pcDNA3-Expressionskonstrukten für PB1, PB2, PA und NP transfiziert. Als Reportergen-Konstrukt diente pPolI-NS-Luc, das über einen PolI-Promotor für die Transkription einer vRNA-ähnlichen RNA sorgt.

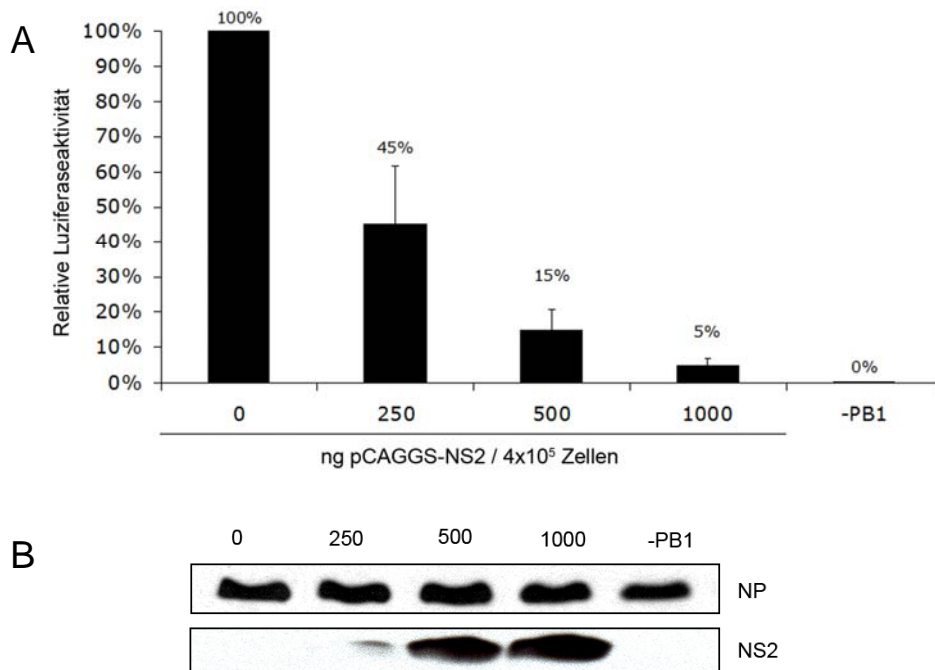


Abbildung 3.1: NS2 reguliert die Expression eines Influenzavirus Minigenoms. (A) 4×10^5 HEK-293T-Zellen wurden mit pcDNA-Expressionsplasmiden für die vRNP Proteine PA, PB1, PB2 (jeweils 125 ng) und NP (250 ng) transfiziert, während als vRNA ähnliches Konstrukt bzw. Reporter pPolI-NS-Luc (250 ng) transfiziert wurde. Zusätzlich zu diesem Minigenom wurden die angegebenen ansteigenden Mengen von pCAGGS-NS2 kotransfiziert. 20 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der Luziferase gemessen. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne die PB1-Untereinheit der Polymerase. Das Diagramm zeigt die gemittelten auf die Ansätze ohne NS2 bezogenen Aktivitäten dreier Experimente, die jeweils in Doppelansätzen durchgeführt wurden, inklusive der Standardabweichung. (B) Immunoblot-Analyse der Lysate aus A. Nachweis der Proteine mit monoklonalem Maus- \square NP Antikörper und NS2-spezifischem Kaninchen Antiserum und entsprechenden speziesspezifischen HRP gekoppelten Sekundärantikörpern.

Diese RNA enthält an den 3' und 5' Enden die hochkonservierten- sowie die segmentspezifischen nichtkodierenden-Regionen und damit alle notwendigen cis-Signale die für die Erkennung und Prozessierung durch die virale Polymerase notwendig sind. Dadurch wird diese vRNA von der viralen Polymerase in eine für die Wirtszellen lesbare mRNA transkribiert und die Zellen translatieren von dieser mRNA das Reporter-Enzym Luziferase (siehe auch Abbildung 2.1 S. 43).

Abbildung 3.1 stellt eine Zusammenfassung der Ergebnisse mehrerer solcher Reporter-Experimente dar. Als Bezugswert diente dabei die Luziferase-Aktivität von Zellen, die nur mit dem Expressionsvektor pCAGGS transfiziert wurden.

In den Ansätzen mit pCAGGS-NS2 kam es mit steigender NS2-Dosis zu einer drastischen und dosisabhängigen Verringerung der Expression von Luziferase. Dies bestätigte die Ergebnisse von Bullido und Kollegen: NS2 Expression führte zu einer deutlich negativen Regulierung der Reporteraktivität auch in einem Minigenom-System ohne Helfer-Virus-Infektion.

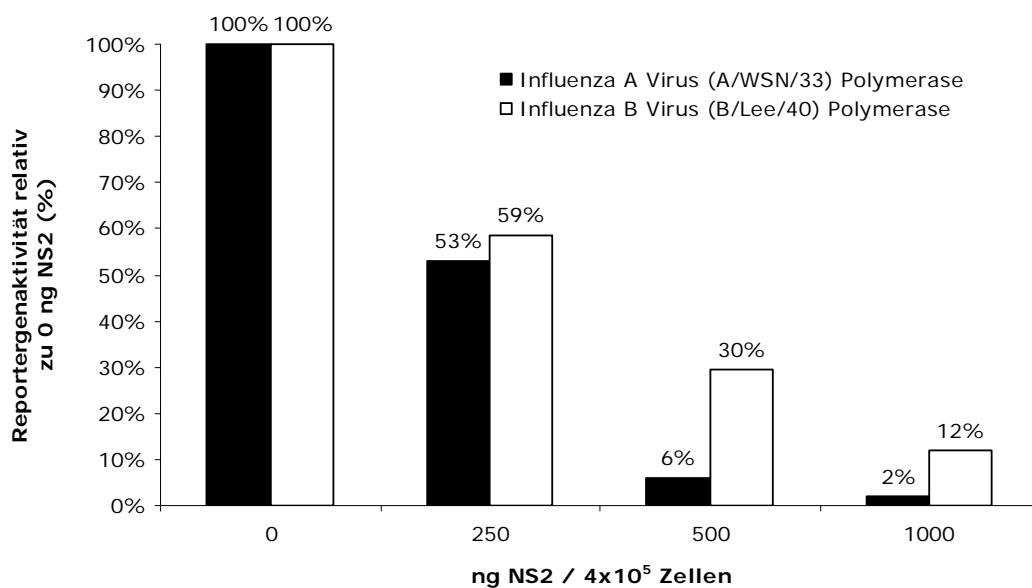


Abbildung 3.2: Das Influenza A Virus NS2-Protein reguliert auch die Expressionsaktivität einer Influenza B Virus Polymerase. HEK-293T-Zellen wurden wie in Abb.3.1 mit pcDNA-Expressionsplasmiden für die vRNP Proteine PA, PB1, PB2 und NP jeweils vom A oder B Virus-Typ transfiziert und als vRNA ähnliches Konstrukt bzw. Reporter wurde entweder pPolI-A-NS-Luc oder B-NS-Luc (basierend auf NS Segmenten von A/WSN33 oder B/Lee/40 respektive) transfiziert. Zusätzlich wurden ansteigende Mengen von pCAGGS-NS2 kotransfiziert (ng pro 4x10⁵ Zellen). 20 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der Luziferase gemessen. Das Diagramm zeigt die gemittelten Werte von Doppelansätzen bezogen auf die Ansätze ohne NS2.

Um zu überprüfen, ob NS2 spezifisch nur auf die RNA-Polymerase des Influenza A Virus wirkt, wurde als nächstes der Einfluss auf die Reporteraktivität einer Influenza B Virus Polymerase gemessen. Dazu wurden die drei Polymerase-Untereinheiten, NP und entweder eines Influenza A oder eines Influenza B Virus zusammen mit einem Virustyp spezifischen vRNA ähnlichen Luziferase-Reporterkonstrukt mit steigenden Mengen von Influenza A-Virus-NS2 kotransfiziert. Abbildung 3.2 zeigt die nach 20 h gemessene Reporteraktivität bezogen auf die Kontroll-transfizierten Zellen.

Die Messungen ergaben, dass das NS2 Protein des Influenza A Virus auch die Expression durch eine Influenza B Virus Polymerase reduziert. Die Expression durch die B-Virus Polymerase war allerdings bei Kotransfektion von 500 und 1000 ng NS2-Plasmid noch fünf- bzw. sechsfach höher als die der Typ A Virus Polymerase.

3.2 Expression des NS2 Proteins führt zur Steigerung der vRNA-Replikation

Die oben gezeigte Verringerung der Reporteraktivität durch Expression des NS2 Proteins könnte auf unterschiedlichen Ebenen der Genexpression erfolgen, unter anderem durch Beeinflussung der RNA-Synthese, des RNA-Transports oder der Translation des Luziferase-Proteins. Bei der Genexpression des Influenzavirus muss zusätzlich die Replikationsfähigkeit der RNA berücksichtigt werden, denn die entstehenden vRNA Moleküle dienen als Vorlagen für die Synthese viraler mRNA. Durch Replikation der vRNA könnte durch die gestiegene Menge von vRNA-Vorlagen mehr mRNA gleichzeitig hergestellt werden. Um zu klären, ob die Regulation der Luziferase-Expression auf der Ebene der RNA-Synthese stattfindet, wurden Zellen mit den gleichen Ansätzen wie in Abb. 3.1 transfiziert und nach 24 h wurde Gesamt-RNA isoliert. Anschließend wurde diese RNA durch Northernblotanalysen untersucht (siehe Abschnitt 2.2.3.4). Mittels zweier DIG-markierter Sonden, die Plus-Strang-RNA (cRNA und mRNA) bzw. Minus-Strang-RNA (vRNA) detektieren können, wurde analysiert, in welchem Maße sich die NS2 Expression auf die Konzentration der RNA der beiden unterschiedlichen Polaritäten auswirkt.

Die Northernblotanalysen zeigten, dass es mit steigender NS2-Expression zu einer dosisabhängigen Reduktion der Plus-Strang-RNA kam (Abbildung 3.3). Dieser Befund konnte das Resultat der zuvor gezeigten Luziferase-Reporter-Gen-Assays erklären, da virale mRNA mit ca. 95 % den Großteil der viralen Plus-Strang-RNA ausmacht (Hatada et al., 1989; Hay et al., 1977; Herz et al., 1981).

Interessanterweise bewirkte NS2 dagegen eine Steigerung der NS-Luc(-)RNA-Menge (rechte Hälfte der Abbildung 3.3). Schon 0,5 µg pCAGGS-NS2 erhöhten die Menge an nachweisbarer vRNA um das fünffache, während bei derselben Menge an NS2 die Menge an (+)Strang-RNA um mehr als die Hälfte abnahm (linke Hälfte der Abbildung 3.3). Eine weitere Dosissteigerung von NS2 bewirkte keine weitere Zunahme an vRNA. Die Menge an vRNA nahm stattdessen wieder dosisabhängig ab, blieb aber

auch bei 2 μg transfiziertem NS2-Plasmid gegenüber der Probe ohne NS2 deutlich erhöht.

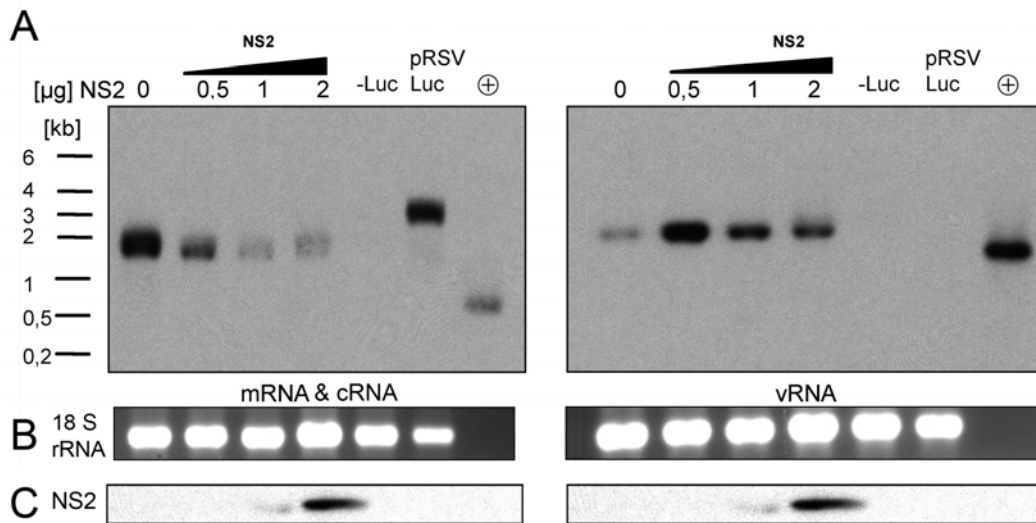


Abbildung 3.3: Das NS2 Protein inhibiert (+)-RNA-Synthese und stimuliert vRNA-Replikation. (A) HEK-293T Zellen wurden mit pcDNA-Expressionsplasmiden für die vRNP Proteine PA, PB1, PB2 und NP transfiziert, als vRNA-ähnliches Konstrukt diente pPoll-NS-Luc. Zusätzlich wurden ansteigende Mengen von pCAGGS-NS2 kotransfiziert (μg pro 2×10^6 Zellen). Um auszuschließen, dass es sich um einen Effekt durch das Vektorplasmid handelt, wurden die Ansätze mit pCAGGS-Leervektor aufgefüllt. 20 h nach Transfektion wurde die Gesamt-RNA der Zellen isoliert, jeweils 5 μg in 1% Agarosegelen aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die RNA-Spezies wurden durch zwei verschiedene DIG-markierte Sonden nachgewiesen. -Luc bedeutet Transfektion ohne pPoll-Luc. Als Kontrolle für die Orientierung der Sonde wurden 2 μg eines pRSV-Luc Konstruktes als +Strang Ziel transfiziert. Außerdem dienten unmarkierte Sonden als Positivkontrollen (\oplus). Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis eines von fünf unabhängigen Experimenten. (B) 18 S rRNA-Ladekontrolle. In den Positivkontrollansätzen \oplus befand sich keine zelluläre RNA, so dass hier keine zelluläre 18 S RNA nachgewiesen wurde. (C) SDS-PAGE und Immunoblot-Nachweis der NS2-Menge in den für den Northern Blot verwendeten Lysaten.

Die Tatsache, dass Transfektion des NS2 Plasmids die vRNA Synthese erhöht, spricht dagegen dass die Inhibition der mRNA Synthese durch einen indirekten Effekt durch die Verringerung der Polymerase-Konzentration hervorgerufen wurde. Durch die obigen Northern Blot Analysen konnten Plus- und Minusstrang-RNA-Mengen analysiert werden. Allerdings entstehen während einer Influenzavirus Infektion zwei verschiedene positiv-strängige RNA Spezies, nämlich zum einen die mit einer Kapfenstruktur versehene, polyadenylierte mRNA und zum anderen die cRNA, die als Vorlage für die Replikation der vRNA dient. Diese zwei RNA Spezies lassen sich durch Northern Blot Analyse nicht voneinander unterscheiden. Um das Ausmaß des Effektes auf diese beiden unterschiedlichen (+)Strang-RNAs bestimmen zu können, wurden diese mittels Primer-Extension Analysen in nachfolgenden Analysen bestimmt.

3.3 Primer-Extension: Analyse der Expression aller drei viralen RNA-Spezies

Der quantitative Nachweis der drei verschiedenen RNA-Spezies des Influenzavirus erfolgte durch *Primer-Extension*-Reaktionen (Fodor et al., 1998). Dazu wurden spezifische Sonden ausgesucht und synthetisiert (Biogenes, Berlin), die jeweils revers-komplementär zur nachzuweisenden RNA sind und die Ziel-RNA innerhalb eines Abstandes von 50-200 Nukleotiden vor dem Ende binden. Der Abstand ist wichtig, um die Produktlänge der Reaktion zu bestimmen um über diese die verschiedenen Spezies identifizieren zu können. Ein Schema der Lage der Sonden innerhalb der verschiedenen RNA Spezies ist in Abbildung 3.4 zu sehen.

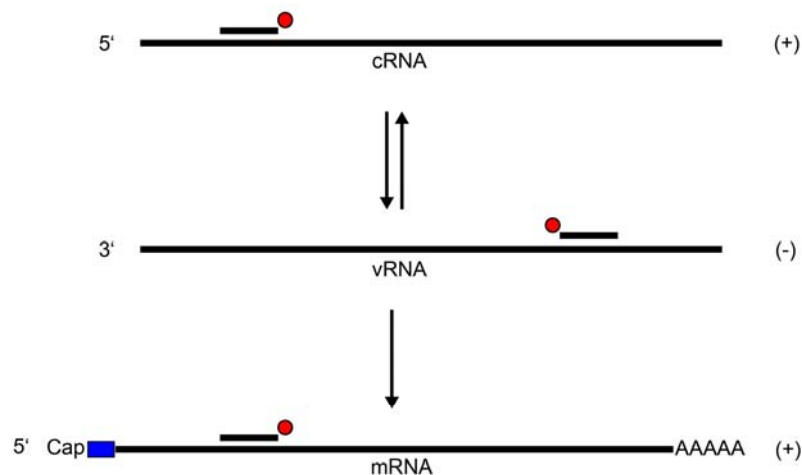


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Positionen der beiden radioaktiv markierten Sonden auf den verschiedenen RNA-Spezies. Virale mRNA lässt sich aufgrund ihrer Größe durch die zusätzliche 5'-Kappe und der 9-17 Nukleotide des Wirtszell-Primers (Blau) von der viralen cRNA unterscheiden. Rote Kreise stellen die Position der ^{32}P -Markierung am 5'-Ende des jeweiligen Primers dar.

Die Sonden wurden am 5' Ende mit $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ markiert und als Primer für eine reverse Transkription nach Hybridisierung an die Ziel-RNA eingesetzt. Die unterschiedlichen Längen der erwarteten markierten Produkte sind in Tabelle 3.1 angegeben. Als Ladekontrolle für die Menge der Gesamt-RNA diente eine Sonde für die ribosomale-5S-RNA der Wirtszellen. Zur Herstellung der Sonden wurden die in der folgenden Tabelle 3.1 angegebenen cDNAs verwendet.

Ergebnisse

Tabelle 3-1 Übersicht der verwendeten Oligonukleotide für die Primer-Extension Sonden. +/- gibt die Ziel-RNA an, also welche virale RNA-Spezies-Orientierung mit der Sonde nachgewiesen wird. Die Spalte Produkt gibt die nachgewiesene Spezies zusammen mit der entstehenden Produktlänge an.

Quelle	Segment	Polarität (+/-)	Sequenz	Name	Produkt [nt]
A/WSN/33	NA	-	tccagtatggttttgatttccg	WSN-NA(-)	vRNA (129)
A/WSN/33	NA	+	tggacttagtgggagcatcat	WSN-NA(+)	cRNA (160) mRNA(169-177)
Luziferase		-	gaaccagggcgtatctcttc	Luc(-)	vRNA (130)
Luziferase		+	cgacgcataaatcagagag	Luc(+)	cRNA (153) mRNA (162-170)
Ribosomale 5S RNA		+	ucccagggcgucucccaucc	5S	100

Um einen Überblick über die RNA-Synthese des Virus in einem normalen Infektionsverlauf zu bekommen, wurde zunächst eine Kinetik der verschiedenen RNA-Spezies des NA-Segments während einer Infektion mit einem Influenza A/WSN/33 Wildtyp (WT) Virus erstellt. Dazu wurden MDCKII-Zellen mit dem Wildtypvirus infiziert (MOI 1), die Zellen zu der entsprechenden Zeit nach Infektion lysiert und RNA und Protein aus den Lysaten gewonnen.

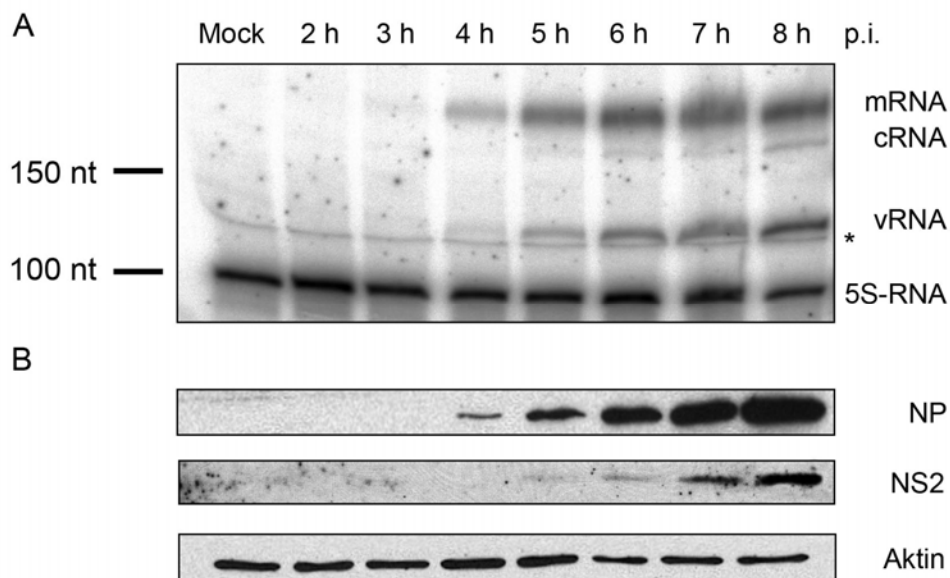


Abbildung 3.5 RNA-Kinetik des RNA Synthese eines NA-Segments des A/WSN/1933 Virus in MDCKII Zellen. (A) MDCKII Zellen wurden mit einer MOI von 1 mit Influenza A/WSN/33 Virus infiziert und nach den angegebenen Zeitpunkten wurde Gesamt-RNA isoliert. 5 µg dieser RNA wurden mit einem Überschuss an ³²P-markierten Sonden für (+) und (-)RNA des NA-Segments hybridisiert und anschließend mit Reverser-Transkriptase inkubiert. Die entstandenen Produkte wurden in einem denaturierenden 8%-Polyacrylamid-7M-Harnstoff-Gel aufgetrennt und durch Phosphorimaging nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente ein Primer für die 5S-rRNA der Wirtszellen. Die mit einem * markierte Bande war ein unbekanntes unspezifisches Produkt das sich auch in Mock-behandelten Zellen findet. (B). Immunoblot-Nachweis der viralen NP und NS2 Proteine zu sowie zellulärem Aktin zu den entsprechenden Zeiten.

Für den Nachweis der viralen RNA wurden Sonden verwendet, die spezifisch an das NA-Segment des Virus binden (siehe Tabelle 3-1). Die mRNA des NA Segmentes war drei Stunden nach Infektion detektierbar, während die vRNA erst 4 h nach Infektion nachweisbar war. Die Konzentrationen von m- und vRNA nahm im weiteren Verlauf der Infektion deutlich zu. cRNA war erst 5 h nach der Infektion nachweisbar und die Menge nahm ebenfalls kontinuierlich zu, mit einer deutlichen Steigerung von der siebten zur achten Stunde nach Infektion, blieb aber im Verlauf insgesamt deutlich unter den Konzentrationen von mRNA oder vRNA.. In der Literatur konnten die einzelnen Spezies allerdings schon zu früheren Zeitpunkten detektiert werden (Hatada et al., 1989; Shapiro et al., 1987; Shapiro und Krug, 1988). Dies liegt vermutlich an den Unterschieden in den verwendeten Multiplizitäten. In der vorliegenden Arbeit wurde mit der Multiplizität von einer PFU pro Zelle infiziert, also einer MOI von 1, während in den früheren Arbeiten mit deutlich mehr Viruspartikeln infiziert wurde. Dort betrug die MOI 10-20 PFU (Shapiro et al., 1987), teilweise auch bis zu 100 PFU pro Zelle (Hatada et al., 1989). Die viralen Proteine NP und NS2 konnten in den Lysaten nach 4 h (NP) bzw. schwach nach 5 h (NS2) detektiert werden.

3.4 Auswirkung von NS2 auf die drei viralen RNA-Spezies eines Influenza A Virus Minigenoms

Als nächstes wurde mittels *Primer-Extension* genau quantifiziert, wie sich die NS2 Expression auf die Level der drei viralen RNA-Spezies auswirkt. Abbildung 3.6 zeigt den Einfluss von verschiedenen Mengen von NS2 auf alle drei RNA-Spezies in einem Minigenom Ansatz.

0,25 µg pCAGGS-NS2 reduzierten die mRNA Menge um 37 % und führten dabei gleichzeitig zu einem deutlichen Anstieg der cRNA- und vRNA-Mengen. Die Menge an vRNA nahm mit steigender NS2-Dosis (1 µg) auf das Dreifache zu, eine Dosiserhöhung von über 1 µg führte aber zu keiner weiteren Steigerung, sondern einem leichten Abfall auf das Zweieinhalbfache der Probe ohne NS2. Die cRNA Menge stieg anfangs auf 150 % des Ausgangswertes und fiel dann mit weiterer Dosissteigerung auf unter 100 % ab.

Ergebnisse

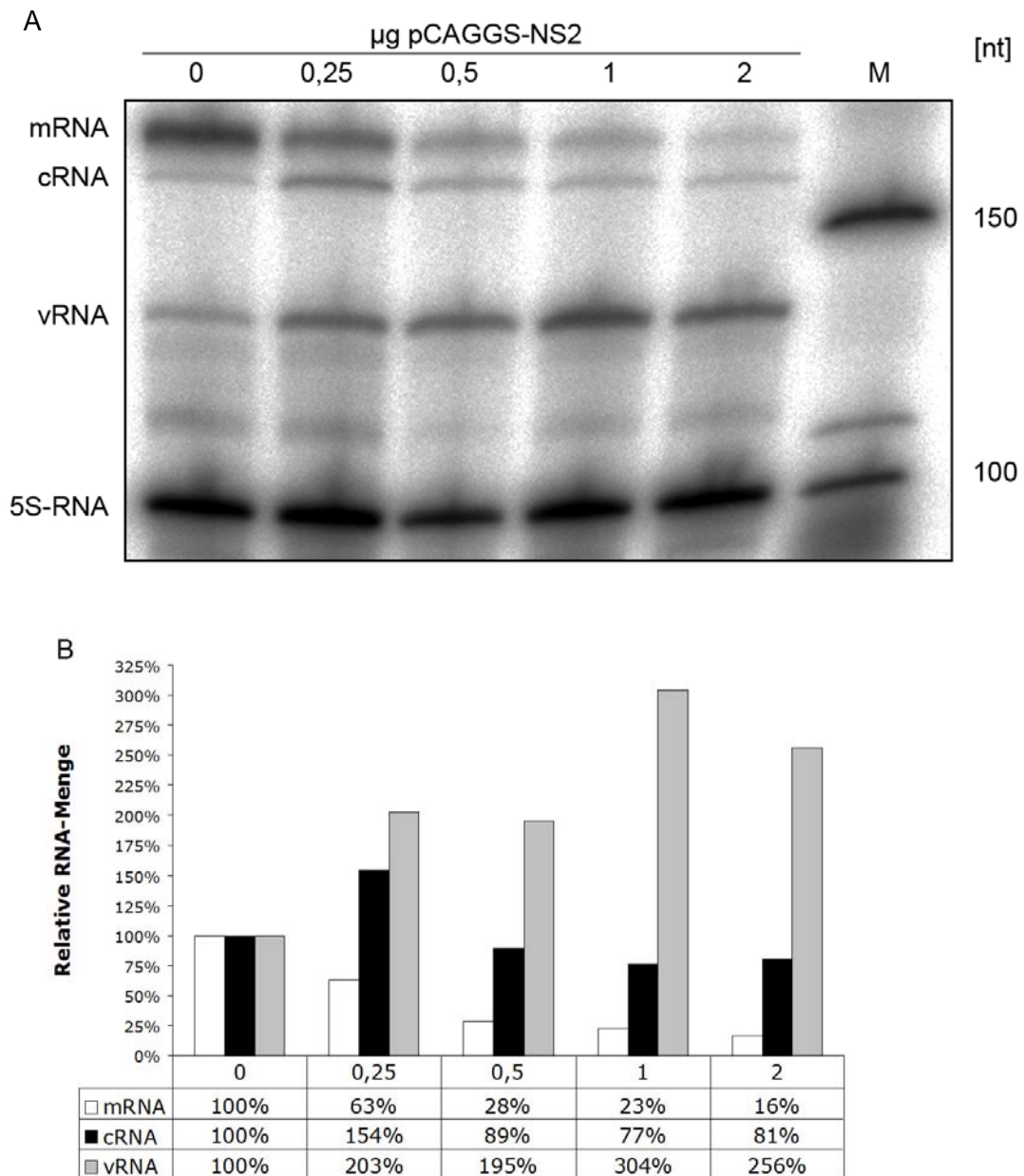


Abbildung 3.6 NS2 reduziert dosisabhängig die Menge der mRNA und steigert gleichzeitig die Konzentration der vRNA. (A) HEK-293T Zellen wurden mit pcDNA-Expressionsplasmiden für die Polymeraseproteine PA, PB1 und PB2 sowie NP transfiziert, als vRNA-ähnliches Konstrukt diente pPolI-NA. Zusätzlich wurden ansteigende Mengen von pCAGGS-NS2 kotransfiziert (μg pro 2×10^6 Zellen). 20 h nach Transfektion wurde die Gesamt-RNA der Zellen isoliert. Um auszuschließen, dass es sich um einen Effekt durch das Vektorplasmid handelt, wurden die Ansätze mit pCAGGS Leervektor aufgefüllt. 5 μg Gesamt-RNA wurden mit ^{32}P -markierten Sonden für (+) und (-)-RNA sowie Reverser-Transkriptase inkubiert. Die entstandenen Produkte wurden in einem denaturierenden 8%-Polyacrylamid-7M-Harnstoff Gel aufgetrennt und per Phosphorimaging nachgewiesen. (B) Quantitative Auswertung. Die Signale der Phosphorimagerplatte wurden mit der AIDA-Software quantitativ bestimmt.

Die mRNA Menge nahm linear mit steigender NS2-Dosis ab, entsprechend der Reporterexpression im Luziferase-Assay und der (+)-RNA Menge im Northern Blot. Dies zeigt, dass die Expression des NS2 Proteins die Transkription (vRNA \rightarrow mRNA) inhibierte, gleichzeitig aber die Replikation (vRNA \rightarrow vRNA) steigerte.

3.5 NS2 interagiert mit der viralen Polymerase

Die bisherigen Ergebnisse ermöglichen keinen Rückschluss auf einen molekularen Mechanismus, der für die regulatorische Wirkung des NS2-Proteins verantwortlich ist. Denkbar wäre eine Interaktion mit der Polymerase selbst oder aber eine bisher unbekannte Interaktion mit einem zellulären Faktor.

Im nächsten Schritt sollte mittels Interaktionsstudien die Hypothese untersucht werden, dass eine Interaktion zwischen viraler Polymerase und NS2 für die Regulation der RNA-Synthese verantwortlich ist. Deswegen wurde untersucht, ob NS2 und die verschiedenen Polymerase-Untereinheiten koimmunpräzipitieren.

Für diese Analysen wurden monoklonale Antikörper gegen PA und PB2 (dankenswerter Weise erhalten von J. Ortín, Madrid), ein kommerzielles Antiserum gegen PB1 (Santa Cruz Biotech) sowie ein Kaninchen-Antiserum gegen NS2 (Biogenes, Berlin) verwendet. Als Spezifitäts-Kontrolle für die NS2-Präzipitation wurde synchron mit Präimmunerum desselben Kaninchens präzipitiert.

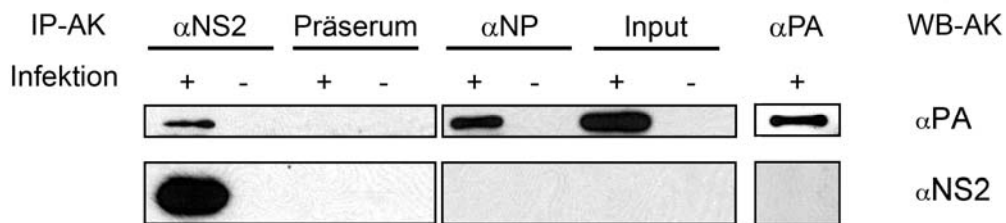


Abbildung 3.7 Koimmunpräzipitation von PA mit NS2. MDCKII Zellen wurden kontroll-behandelt oder mit A/WSN/33 Virus mit einer MOI von 10 infiziert. 7 h p.i. wurden Zelllysate hergestellt und mit Kaninchen-Antiserum gegen NS2 oder Präserum sowie NP- und PA-spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und in Immuno-Blot-Analysen mit Antikörpern gegen die PA-Untereinheit der Polymerase und NS2 detektiert.

In Immunpräzipitaten mit NS2-Antiseren konnte die PA-Untereinheit der Polymerase nachgewiesen werden (Abbildung 3.7). Umgekehrt konnte in PA-Immunpräzipitaten allerdings keine Kopräzipitation von NS2 beobachtet werden. Wurde NP präzipitiert, konnte in den Immunpräzipitaten die PA-Untereinheit nachgewiesen werden, es fand sich aber kein NS2-Protein darin.

Es ist derzeit unklar, ob diese Ergebnis auf die Abwesenheit des NS2 Proteins in den Präzipitaten oder geringer Sensivität des NS2 Nachweises zurückzuführen ist.

3.6 Mutationsanalyse konservierter Aminosäuren im NS2

Protein

Um herauszufinden, welche Regionen des NS2 Proteins an der Regulation der RNA-Synthese beteiligt sind, wurden Aminosäuren, die in vielen Influenza A Virusstämmen konserviert sind, gegen Alanin ausgetauscht (in zwei Fällen auch gegen Serin und einmal gegen Threonin). Diese Veränderungen wurden gezielt mittels gerichteter Mutagenese in NS2 Expressionskonstrukte eingebracht, d.h. in den pCAGGS-Vektor kloniert. Später wurden die mutierten Sequenzen durch reverse Genetik in das Influenza A/WSN/33 WT Virus eingebracht.

Insgesamt wurden acht verschiedene NS2-Mutanten hergestellt, in denen jeweils zwei beieinander liegende Aminosäuren gleichzeitig ausgetauscht wurden (siehe Abbildung 3.8). Da die mutierten NS2 Sequenzen später auch in rekombinante Viren eingebracht wurden, und sich die beiden Leserahmen von NS1 und NS2 im Bereich der ersten 70 Basen des NS2 überschneiden, wurde bei der Mutagenese der NS2 Sequenz darauf geachtet, dass es nur zur Veränderung von Aminosäuren im NS2, aber nicht im NS1 Protein kam.

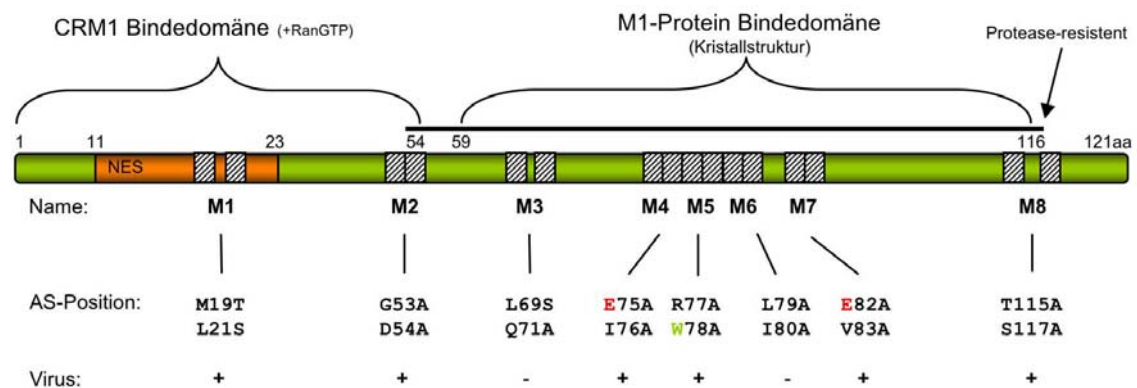


Abbildung 3.8 Schema des NS2 Proteins. Der Obere Teil stellt das WT Protein mit den CRM1 und M1 bindenden Domänen dar, im unteren Teil sind die Positionen der Doppel-Aminosäure-Austausche innerhalb des Proteins gezeigt. Das für die Interaktion mit dem Matrixprotein M1 wichtige Tryptophan ist grün, die umliegenden Glutamatreste rot markiert. Darunter ist angegeben, ob zu der entsprechenden Mutante ein korrespondierendes rekombinantes Virus hergestellt werden konnte.

Die in den Mutanten M1 und M2 veränderten Aminosäurepositionen (M19T/L21S und G53A/D54A) liegen in der N-terminalen Domäne, während M3-M8 in der rigideren C-terminalen Domäne liegen. Die Mutationen der M1 Mutante (M19T/L21S) betreffen ein Methionin und ein Leucin, die beide Bestandteil des Nucleären Export Signals (NES) sind. Die Mutationen in M2 (G53A/D54A) liegen kurz vor der Protease-resistenten C-terminalen Domäne. In M3 (L69S/Q71A) sind zwei hochkonservierte

Aminosäuren im N-terminalen Bereich des rigiden C-Terminus verändert. Eine Mutation in M5 (R77A/W78A) betrifft ein Tryptophan, das vermutlich für die Interaktion mit dem Matrixprotein M1 Protein wichtig ist (Akarsu et al., 2003). In den Mutanten M4 (E75A/I76A) und M7 (E82A/V83A) ist jeweils ein Glutamat-Rest gegen Alanin ausgetauscht (E75 und E82). Die Glutamate gehören zu einer Anhäufung von sauren Aminosäuren die vermutlich mit dem basischen Kernlokalisierungssignal des Matrixproteins interagieren (Akarsu et al., 2003).

3.7 Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der mutierten NS2 Proteine

Zuerst wurde die Expression und Lokalisation der mutierten Proteine untersucht. Hierfür wurden A549 Zellen mit dem pCAGGS-NS2-Wildtyp bzw. den verschiedenen pCAGGS-NS2-Mutanten transfiziert, nach 24 h fixiert, permeabilisiert und mittels eines NS2-Antiserums mit indirekter Immunfluoreszenz-Mikroskopie analysiert. Die Abbildung 3.9 und Abbildung 3.10 zeigen einen Vergleich mit den NS2-Wildtyp bzw. Plasmidmutanten transfizierten Zellen in geringer und starker Vergrößerung.

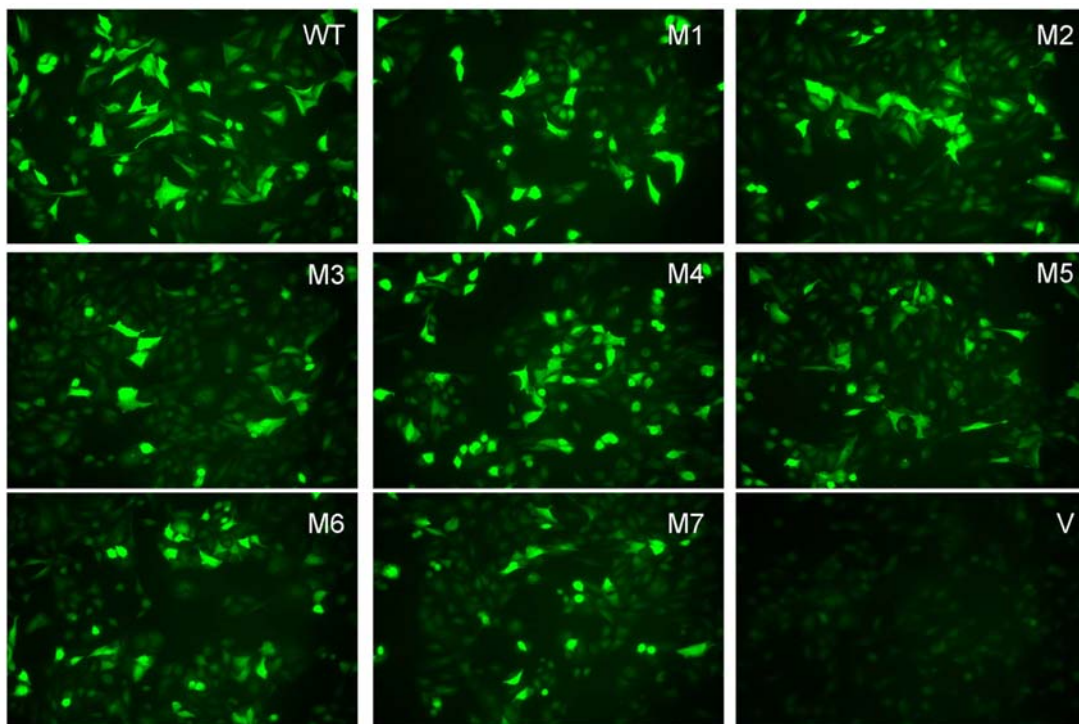


Abbildung 3.9 Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Expression der verschiedenen NS2-Mutanten. $2,5 \times 10^5$ A549-Zellen wurden im 24 Well auf Deckgläsern mit je $1 \mu\text{g}$ des entsprechenden pCAGGS-NS2 Konstrukts in Suspension transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert, gegen NS2 gefärbt und immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht. WT war das NS2 Protein des A/WSN/33 Virus, M1-7 waren die entsprechenden mutierten Plasmide (s. Abb. 3.8). V war der leere Vektor pCAGGS. Ca. 100x Vergrößerung.

Im immunfluoreszenzmikroskopischen Bild in Abbildung 3.9 gab es nur geringe Unterschiede in der Expression der verschiedenen NS2 Mutanten, da ähnliche Signalstärken beobachtet wurden. Der WT schien stärker exprimiert, eher schwächer exprimiert wirkten dagegen M3 und M5.

Um Änderungen in der zellulären Lokalisation der mutierten Proteine zu untersuchen wurden mikroskopische Aufnahmen mit höheren Vergrößerungen (600x) angefertigt. Abbildung 3.10 zeigt die zelluläre Lokalisation des WT NS2-Proteins und aller mutierten NS2-Proteine.

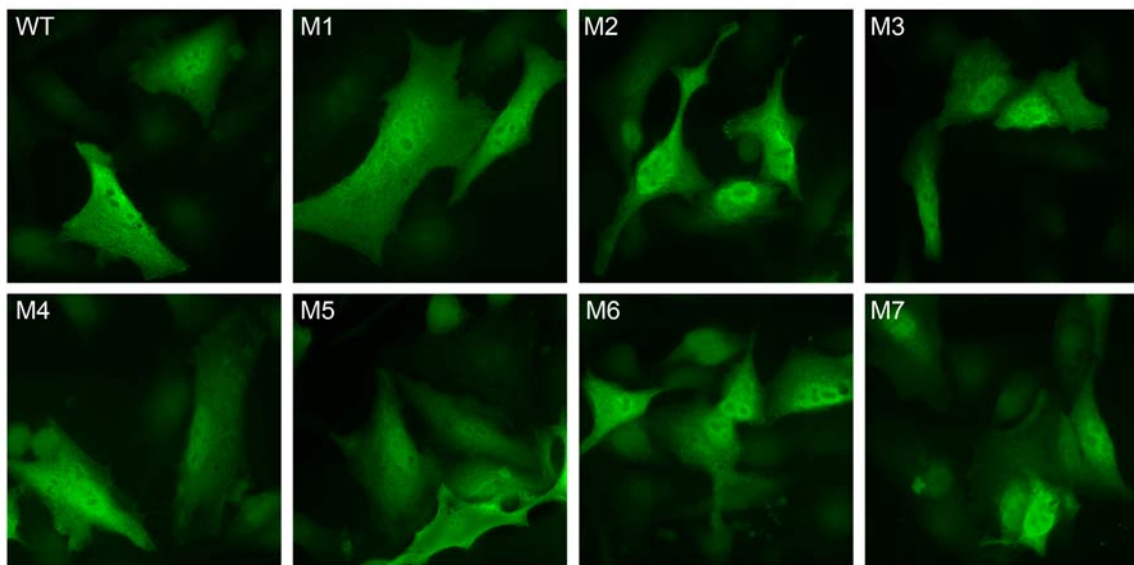


Abbildung 3.10 Zelluläre Lokalisation der mutierten NS2-Proteine. $2,5 \times 10^5$ A549-Zellen wurden im 24 Well auf Deckgläsern mit je $1 \mu\text{g}$ des entsprechenden pCAGGS-NS2 Konstrukts transfiziert, nach 24 h fixiert, permeabilisiert, gegen NS2 gefärbt und immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht. WT war das NS2 Protein des Influenza A/WSN/33 Virus, M1-7 die entsprechenden Mutante (**Abbildung 3.9**). Ca. 600x Vergrößerung

NS2 liegt mit 14 kDa Molekulargewicht unterhalb der Diffusionsgrenze der Kernporen, so dass es sich theoretisch trotz seines Kernexportsignals durch Diffusion auch wieder im Zellkern befinden kann. Wie erwartet findet sich das Wildtyp NS2 Protein fast homogen in den A549-Zellen verteilt, mit einer leicht verstärkten Konzentration im Zellkern und Aussparung der Nukleoli. Die Lokalisation keines der mutierten NS2 Proteine unterschied sich signifikant von der des Wildtyps.

3.8 Einfluss mutierter NS2 Proteine auf die RNA-Synthese eines NA-Minigenoms

Um die Auswirkungen der Mutationen im NS2 Protein auf die virale Genexpression zu untersuchen, wurde deren Einfluss in einer Reportergenstudie gemäß

Abbildung 3.1 analysiert. Zu einem pPoll-Luziferase-Reporterplasmid und den Expressionsplasmiden für die virale Polymerase wurden entweder der Leervektor pCAGGS, pCAGGS-NS2-WT oder die entsprechende NS2-Plasmid-Mutante transfiziert (jeweils 500 ng pro 5×10^5 Zellen). Abbildung 3.11 zeigt Auswirkungen der verschiedenen NS2-Proteine auf die Luziferase-Expression der viralen Polymerase.

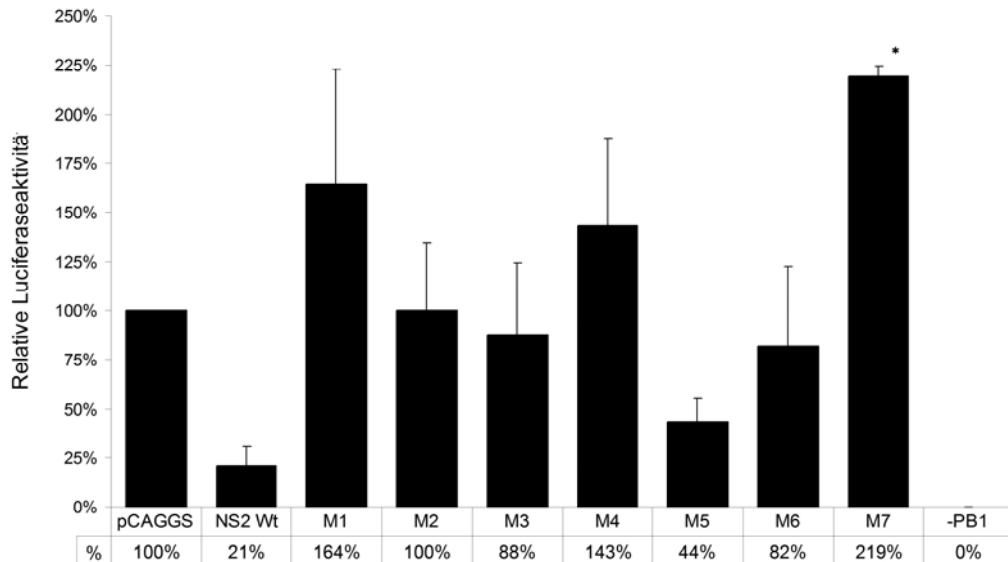


Abbildung 3.11 Regulation der Expression eines Luziferase-Minigenom durch die verschiedenen NS2-Mutanten. 4×10^5 HEK-293T-Zellen wurden, wie in Abb.3.1 mit pcDNA-Expressionsplasmiden für die vRNP Proteine PA, PB1, PB2 und NP transfiziert und als vRNA ähnliches Konstrukt bzw. Reporter wurde pPoll-NS-Luc transfiziert. Zusätzlich wurden jeweils 500 ng der verschiedenen pCAGGS-NS2 Konstrukte kotransfiziert. 20 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der Luziferase gemessen. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne die PB1-Untereinheit der Polymerase. Das Diagramm zeigt die gemittelten Werte von vier Experimenten in Doppelansätzen, bezogen auf die Ansätze ohne NS2. *Mit M7 wurde nur ein Experiment durchgeführt, deswegen stellt der Fehlerbalken nur die Abweichung eines Doppelansatzes dar.

Bei der quantitativen Auswertung des Experimentes fiel die verringerte Inhibition der Reporteraktivität aller mutierten NS2-Proteine gegenüber dem Wildtypprotein auf.

Die Mutationen M1(19/21), M4(75/76) und M7(82/83) zeigten den deutlichsten Funktionsverlust, sie inhibiert nicht wie das WT Protein die Reportergenaktivität, sondern steigerten diese im sogar Vergleich zur Leervektorkontrolle (8-, 7- respektive 10-fache Reportergenaktivität gegenüber dem WT). Die Mutante M2 zeigte eine 5-fache, die Mutanten M3 und M6 eine 4-fache Steigerung der Luciferaseaktivität gegenüber dem WT Protein, zeigten also ebenfalls einen Funktionsverlust, wenn man die Aktivität mit der Leervektorkontrolle vergleicht. Einzig die Transfektion der Mutante M5 zeigte eine Reduktion der Luciferaseaktivität im Vergleich zur Leervektorkontrolle, im Vergleich zum WT war diese aber immer noch um mehr das doppelte erhöht.

Ergebnisse

In einem weiteren Experiment wurde die Wirkung der Aminosäureaustausche im NS2 Protein auf die RNA-Synthese eines NA-Segment-Minigenoms überprüft. Dazu wurden HEK-293T-Zellen mit einem pPolI-NA-Plasmid, den nötigen Polymerasekonstrukten und ebenfalls mit den verschiedenen pCAGGS-NS2-Mutanten kotransfiziert. Nach 20 h wurde Gesamt-RNA isoliert und die viralen RNA-Mengen durch Primer-Extension-Analysen bestimmt. Abbildung 3.12 zeigt das Ergebnis eines *Primer Extension* Experimentes und dessen Quantifizierung.

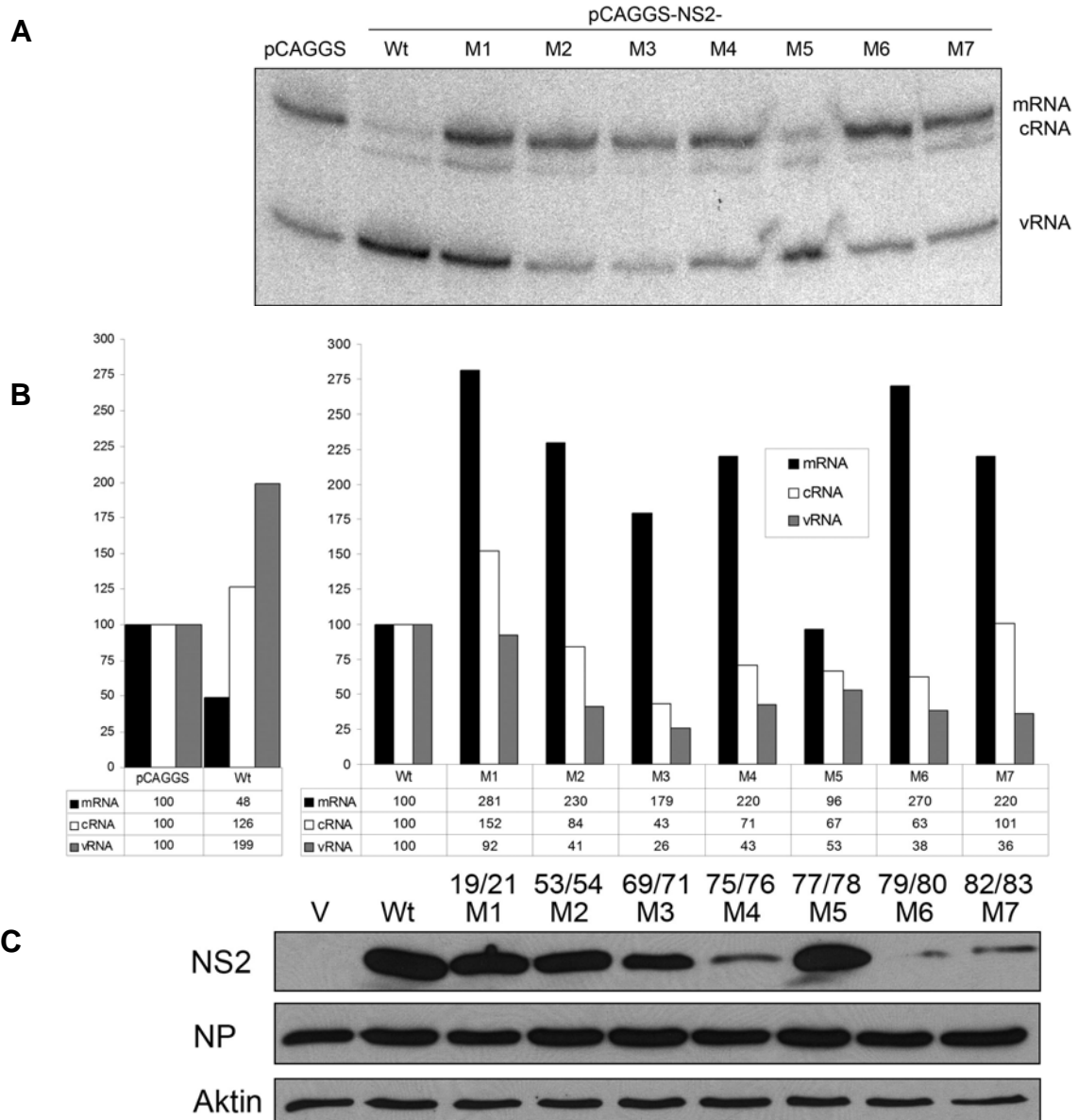


Abbildung 3.12 Auswirkung der Expression verschiedener NS2-Mutanten auf die RNA-Synthese eines Minigenoms. (A) 10^6 HEK-293T Zellen wurden, wie in Abb. 3.6 mit einem pPolI-NA-Plasmid, Expressionsplasmiden für die Polymeraseproteine und NP transfiziert. Mit diesem Minigenom wurden jeweils entweder 500 ng Leervektor, WT-NS2 oder die verschiedenen NS2-Mutanten kotransfiziert. Die Ernte der RNA erfolgte 20 h nach Infektion und die Analyse erfolgte, wie in Abbildung 3.6 beschrieben. (B) Quantifizierung der Phosphorimager Signale aus Abb. A mittels Aida Software. (C) Immunoblotnachweis der Expression der NS2-Mutanten und des Nukleoproteins. Als Ladekontrolle diente zelluläres Aktin.

Das Wildtyp-NS2 Protein zeigte hier in Übereinstimmung mit der Reporter-gen-Studie eine deutliche Reduktion der mRNA Konzentration, eine Steigerung der cRNA Konzentration und eine sehr deutliche Steigerung der vRNA Konzentration.

Alle untersuchten Veränderungen im NS2 Protein führten, wie im Luziferase-Assay beobachtet, zu einer schwächeren Reduktion der mRNA Synthese im Vergleich zum Wildtyp-NS2-Protein. Die Mutante, die am ehesten dieser Wildtypfunktion nahe kam, war Mutante 5 (R77A/W78A). Sowohl das Wildtyp Protein als auch alle Mutanten mit Ausnahme von M3 (L69S/Q71A) erhöhten die cRNA-Menge im Vergleich zur Vektorkontrolle zum Teil deutlich. Wildtyp-NS2 verursachte den deutlichsten Anstieg des vRNA Signals, während die vRNA-Mengen in den Ansätzen mit den verschiedenen Mutanten zwischen Wildtyp und Vektorkontrolle variierten. Die M19T/L21S Mutante war in Bezug auf die Steigerung der vRNA Synthese gegenüber dem WT Protein kaum eingeschränkt (91 %). Allerdings war diese Mutante in der Inhibition der mRNA Synthese am stärksten eingeschränkt, diese lag gemessen am WT bei fast 300 Prozent. Die NS2 Mutante M3 (L69S/Q71A) zeigte die geringste Auswirkung auf alle drei RNA-Spezies. Die mRNA-Konzentrationen deckten sich in der Tendenz mit den Aktivitäten aus dem Reporter-gen-assay (Abbildung 3.11).

Eine Immunoblotanalyse (Abbildung 3.12 C) der durch die pCAGGS-Konstrukte exprimierten NS2 Proteine zeigte insbesondere für die NS2 Mutanten M4, M6 und M7 geringe Signalstärken. Die geringe Signalstärke kann zwei mögliche Ursachen haben, die sich derzeit nicht unterscheiden lassen: Einerseits könnten die in die Mutanten eingeführten Aminosäureaustausche zu einer schlechteren Erkennung durch das Antiserum führen. Andererseits könnte eine Instabilität der veränderten Proteine zu einem vorzeitigen Abbau in den Zellen führen. Allerdings erhöhten auch die Proteine, die in Immunoblots nur schwach nachweisbar waren, die Menge an cRNA deutlich gegenüber der Vektorkontrolle. Bemerkenswert war hier Mutante M6, welche die geringste Signalstärke im Immunoblot zeigte, aber die mRNA Menge deutlich gegenüber der Vektorkontrolle erhöhte, was für die erste These sprechen würde.

3.9 Plaquetest mit Avicel-Overlay im 48-Well Format

Für die Arbeit mit infektiösen Viren ist es unerlässlich, bestimmen zu können, welche Menge eines Virus sich in einem bestimmten Volumen befindet. Üblicherweise werden zur Bestimmung von Influenzavirus-Titern Plaqueteste auf adherenten Kulturzellen mit Agar-Overlay Medien durchgeführt. Das hat den Grund, dass Influenzaviren in der

Lage sind, sich von der Wirtszelle abzulösen und sich dann durch die Konvektion im Medium auf dem Zellrasen verteilen. Um eine lokale Plaquebildung zu gewährleisten, wurden Agar-Medien entwickelt, die sicherstellen, dass die Viruspartikel sich nur von Zelle zu Zelle weiterverbreiten und so jedes Virion nur einen einzigen Plaque bildet (Cooper, 1961).

Die auf Agar basierenden Overlaymedien haben allerdings einige Nachteile. Sie können aufgrund der hohen Viskosität nicht in 48- oder 96 Kalottenplatten verwendet werden, sind schlecht dispensierbar und müssen erhitzt werden, um sie zu verteilen. Um höhere Durchsatzraten erreichen zu können, wurde für die Titerbestimmung unbekannter Viruskonzentrationen ein auf Flüssigoverlay basierender Plaquetest in Kombination mit einer Nahinfrarotdetektion durch indirekte Immunfluoreszenzmarkierung etabliert.

Das flüssige Overlay basiert auf mikrokristalliner Zellulose (Avicel RC-581, FMC Biopolymer, Philadelphia, USA). Diese wurde in einer Arbeit von Matrosovich et al. als geeigneter Zusatz für ein Flüssig-Overlay identifiziert (Matrosovich et al., 2006). Das Flüssig-Overlay kann einfach dispensiert und wieder abgesaugt werden und das Inokulum muss nicht, wie bei einem normalen Overlay, entfernt werden. Das Medium muss zudem nicht erhitzt werden und schont dadurch die Virionen und Zellen. Matrosovich et al verwenden monoklonale Antikörper gegen das NP Protein, in Kombination mit Peroxidasegekoppelten anti-Maus-Antikörpern. Der Nachweis der Viren erfolgt dann über eine Inkubation mit einem Substrat das zu einer Farbreaktion führt. Diese wird dann über einen Flachbettscanner eingelesen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde einfach ein sekundärer Fluorophor-gekoppelter Antikörper verwendet, dessen Emissionsspektrum im Nahinfrarotbereich liegt. Dies erlaubte auch eine Detektion von infizierten Zellen auch innerhalb der normalen Zellkulturplatten, da diese im verwendeten Wellenlängenbereich eine geringe Autofluoreszenz ausweisen. In Verbindung mit einer lasergestützten Detektion und elektronischer Bildverarbeitung kann so die Zahl der PFUs durch Nachweis des NP Proteins in infizierten Zellen ermittelt werden. Es wird kein zusätzliches Substrat benötigt, was auch die zusätzliche Inkubationszeit unnötig macht. Abbildung 3.13 zeigt einen mit dieser Technik durchgeführten Plaquetest (siehe auch Material und Methoden, Kapitel 2.2.2.2). Das Auszählen kann mittels einer geeigneten Software automatisiert werden.

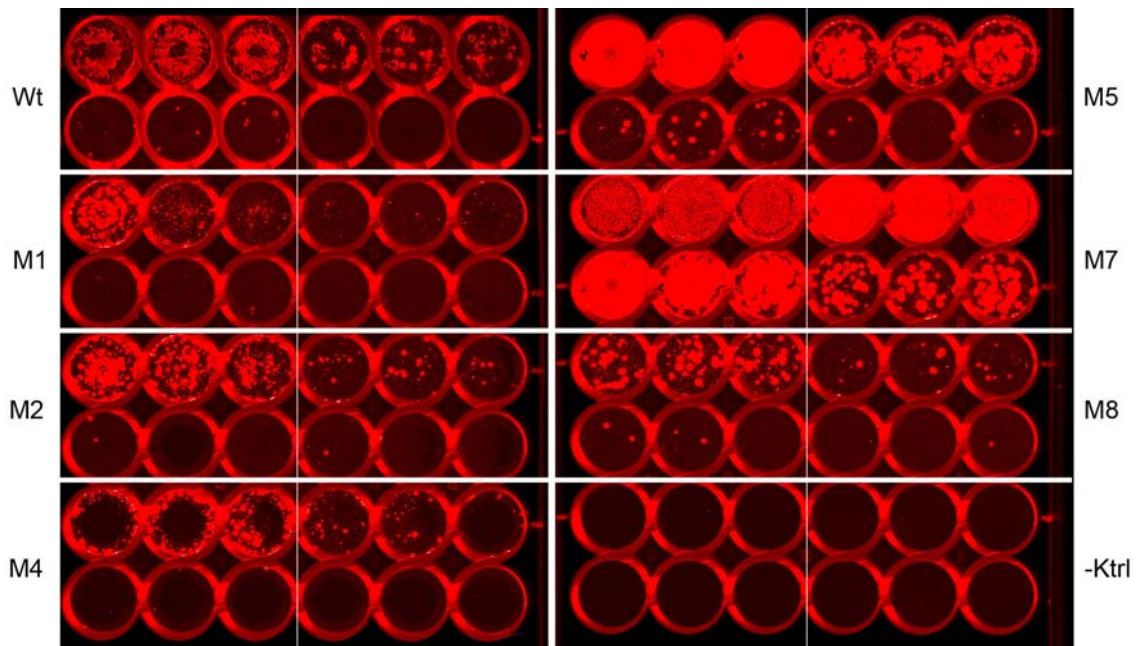


Abbildung 3.13 Titerbestimmung rekombinanter Viren mit Doppelaminosäureaustauschen im NS2 Protein. Avicel-Plaquetiterbestimmung auf MDCKII Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung des Nukleoproteins und anschließendem Nachweis durch IR-Sekundärantikörper in einem Odyssey Infrarot-Scanner. Für jede Viruslösung wurden vier 1:10 Verdünnungen angesetzt, und mit jeder Verdünnung wurden drei mit Zellen gefüllte Kavitäten infiziert.

3.10 Generierung von rekombinanten Influenzaviren, die mutierte NS2 Proteine exprimieren

Um die Auswirkungen der Mutationen *in vivo* im Infektionszyklus untersuchen zu können, wurde versucht, die beschriebenen Mutationen mittels revers genetischer Methodik in Influenza A/WSN/33 Viren einzuführen. Dies ermöglichte, die Wirkung der Mutationen auf die komplexen Vorgänge einer Influenzavirusinfektion zu untersuchen. Die durch gerichtete Mutagenese veränderten NS-Plasmide wurden mit gleichen Mengen an pPolI-Plasmiden in 293T Zellen transfiziert und die nach 72 h in den Überstand freigesetzten Viren wurden in 11 Tage alten embryonierten Hühnereiern oder Vero- bzw. MDCKII-Zellen passagiert. Der Virustiter der Allantoisflüssigkeit oder des Zellkulturüberstandes wurde durch Plaqueteste bestimmt.

Abbildung 3.14 A zeigt die im Mittel mehrerer Anzuchtversuche (n=2-5) in embryonierten Hühnereiern erreichten Plaquetiter der Virusmutanten.

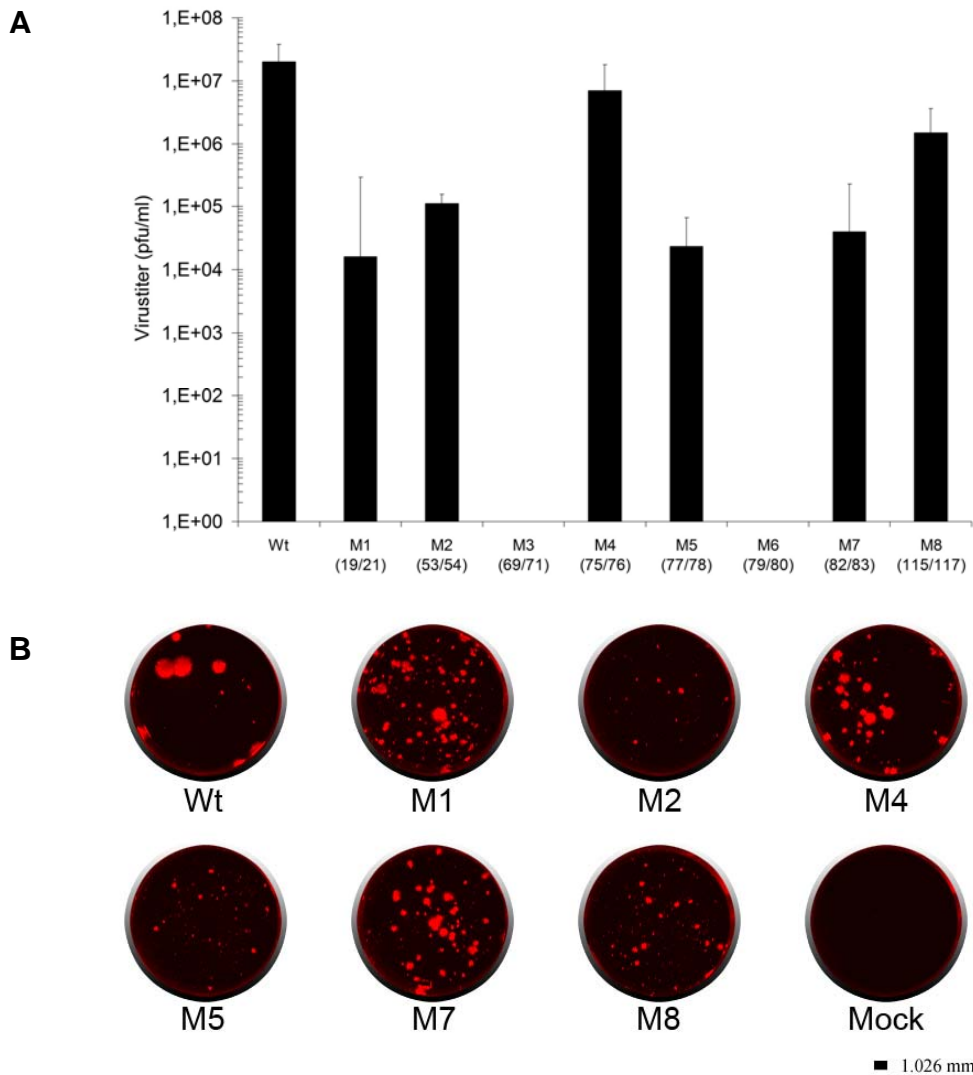


Abbildung 3.14 Titer und Plaquemorphologie rekombinanter Influenza A/WSN/33 Viren mit Doppelaminosäureaustauschen im NS2 Protein. (A) Median der gemessenen Plaquetiter der in embryonierten Hühnereiern angezogenen Virusmutanten. Der Fehlerbalken stellt die Standardabweichung dar. Viren mit Mutation der Positionen M3 (L69S/Q71A) und M6 (L79A/I80A) ließen sich nicht herstellen. (B) MDCKII Zellen wurden mit dem WT Virus, den rekombinanten Virusmutanten oder zum Schein infiziert und mit Avicel-Overlay bedeckt. 24 h später wurde das Overlay entfernt, die Zellen fixiert und das virale NP Protein mittels Immunfluoreszenz detektiert.

Die Mutanten M3 (69/71) und M6 (79/80) ergaben in fünf bzw. zwei unabhängigen Versuchen kein replikationsfähiges Virus. Die Veränderung der konservierten Aminosäuren führt also zu NS2 Proteinen, die keine produktive Replikation zuließen.

Das Influenza A/WSN/33 WT Virus wuchs in embryonierten Hühnereiern im Schnitt zu einem Titer von 2×10^7 PFU pro ml Allantoisflüssigkeit. Die Virusmutante M1 (M19T/L21S) besaß den niedrigsten Titer ($1,6 \times 10^4$). M5 (R77A/W78A) und M7 (E82A/V83A) waren ebenfalls stark attenuiert, mit $2,3$ und $4,0 \times 10^4$ PFU pro ml. M8 (T115A/S117A) wuchs zu $1,6 \times 10^6$ PFU und M4 (E75A/I76A) zum höchsten Titer mit 7×10^6 PFU pro ml.

Um weitere Indizien für die Auswirkung der Mutationen auf die Virusreplikation zu erhalten, wurde die Vermehrung der rekombinanten Viren auf MDCKII Zellen durch Analyse der Plaquegrößen untersucht. Abbildung 3.14 B zeigt die Morphologie der durch den WSN WT und die rekombinanten Viren gebildeten Plaques. Das WT Virus bildete innerhalb von 24 h deutlich größere Plaques (1,13 mm Ø) als alle Virusmutanten. Die Virusmutanten M2, M5 und M8 wiesen die geringste Plaquegröße auf (0,39 mm Ø), dann folgte M1 (0,47 mm Ø), während die Mutanten M4 und M7 die vergleichsweise größten Plaques bildeten (0,56 mm Ø).

Die Attenuierung der Viren könnte unterschiedliche Ursachen haben, bei Mutante M1 würde eine Fehlfunktion des Exports durch die Mutation des NES naheliegen. Da bei M5 ein Tryptophan betroffen ist, das für die Interaktion mit dem Matrixprotein M1 wichtig ist, könnte bei M5 ebenfalls der Export der vRNPs betroffen sein. Diese beiden Mutanten, für deren betroffene Aminosäuren eine Funktion innerhalb des NS2 bekannt ist, sind auch am stärksten attenuiert. Da in diesen beiden Viren durch die Mutationen eventuell der Export der vRNPs verändert ist, wurde als deren nächstes deren Lokalisation in der Zelle mittels Immunfluoreszenz untersucht.

3.11 Lokalisation der mutierten NS2 Proteine und der Nukleoproteine in der Infektion

Um Aufschluss über die Auswirkung der Aminosäureaustausche auf die Expression und die intrazelluläre Lokalisation der NS2 Proteine bei einer Infektion mit den rekombinanten Viren zu erhalten, wurden immunfluoreszenzmikroskopische Analysen durchgeführt. Dazu wurden MDCKII Zellen mit WT Virus sowie den verschiedenen Virusmutanten infiziert, 6 h später fixiert und die Proteine mit entsprechenden Antisera nachgewiesen.

Die mikroskopische Analyse der Virusmutanten-Infektion (Abbildung 3.15) ergab keine eindeutigen Hinweise auf eine veränderte Expression oder Lokalisation der mutierten NS2 Proteine der rekombinanten Viren, ähnlich wie dies nach Expression der Protein-Mutanten durch pCAGGS-Konstrukte beobachtet worden war (Abbildung 3.9 und Abbildung 3.10).

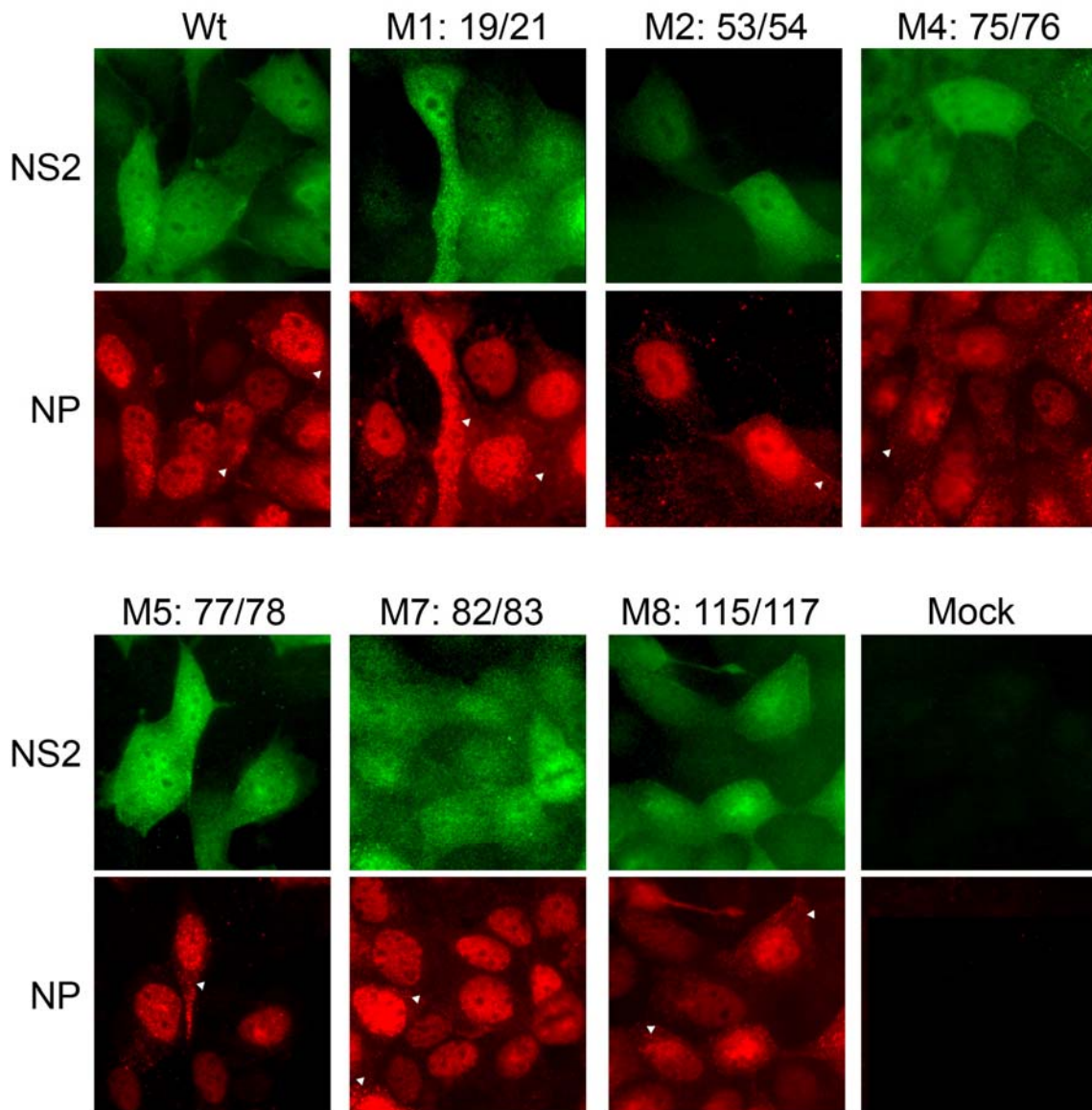


Abbildung 3.15: Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der Lokalisation und Expression der mutierten NS2 Proteine und des Nukleoproteins der Virusmutanten. MDCKII-Zellen wurden mit den angegebenen Viren mit der maximal möglichen MOI, maximal aber mit einer Multiplizität von 1 infiziert und 6 h nach Infektion fixiert, permeabilisiert und die Lokalisation von NS2 und NP bestimmt. NS2 wurde mit einem Kaninchen Antiserum gegen GST-NS2 und NP mit einem monoklonalen Antikörper detektiert. Der Nachweis erfolgte indirekt über fluorophorgekoppelte Sekundärantikörper gegen die Quellspezies der Primärantikörper. Exportiertes NP ist mit weißen Dreiecken markiert.

In den mit WT Virus infizierten Zellen war das NS2 Protein, wie bei der Plasmidexpression, homogen in der Zelle verteilt, mit Aussparung der Nukleoli. NS2 liegt mit 14 kDa Molekulargewicht unterhalb der Diffusionsgrenze der Kernporen und kann so frei zwischen Kern und Zytoplasma diffundieren. Das Nukleoprotein fand sich hauptsächlich noch im Zellkern, war aber bei allen Viren teilweise auch im Zytoplasma zu detektieren. Selbst das NS2 Protein der Virusmutante M1 (M19T/L21S) war außerhalb des Zellkerns zu detektieren. Auch das Nukleoprotein dieser Virusmutante

wurde zum Teil im Zytoplasma detektiert, obwohl beide ausgetauschten Aminosäuren des NS2 Proteins wichtige Bestandteile des Nukleären Export Signals sind. Dies ist unerwartet, da bei ähnlichen Experimenten mit *virus like particles* (VLPs), die ein mutiertes NES im NS2 besaßen, ein Export des Nukleoproteins nicht beobachtet wurde (Neumann et al., 2000).

3.12 Untersuchung der RNA Synthese der rekombinanten Virusmutanten

Zuerst wurde die Expression der veränderten NS2 Proteine der Virusmutanten untersucht. Dazu wurden MDCKII Zellen mit den genetisch modifizierten Viren infiziert. Das WT Virus wurde zum Vergleich mit einer MOI von 1 eingesetzt. Um ausreichend starke Signale für alle drei RNA Spezies zu bekommen, wurden aufgrund des geringen Titers der Virusmutanten einige der Virusstammlösungen unverdünnt auf die Zellen gegeben, deswegen liegen die MOIs der Viren M1, M5 und M7 unter 1. Das dies trotzdem vergleichbare Bedingungen waren, zeigte die NP Expression der verschiedenen Viren:

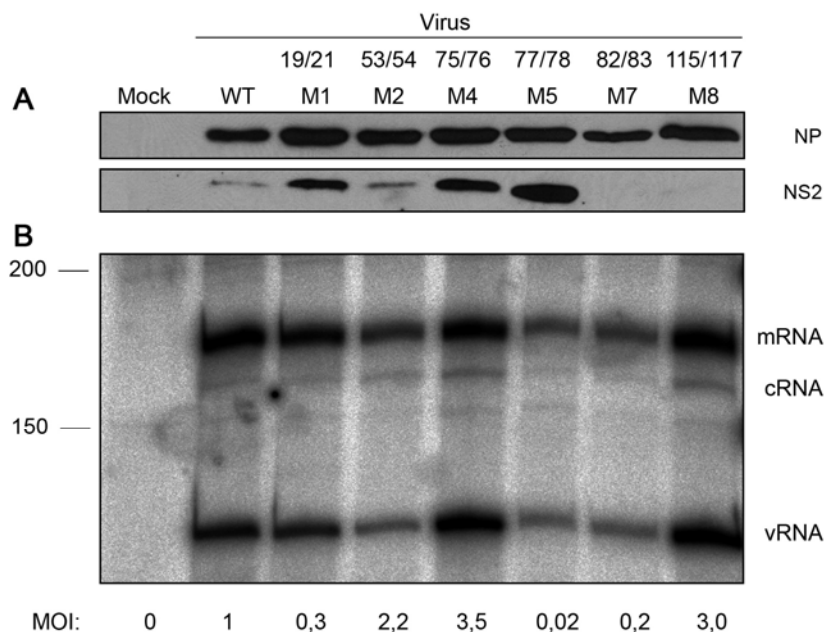


Abbildung 3.16: (A) Nachweis der NP und NS2 Proteine der Virusmutanten mittels Immunoblot. MDCKII Zellen wurden entweder mit einer MOI von 1 (WT) oder mit der maximal möglichen MOI der Virusmutanten infiziert. Die Lysate wurden per SDS-PAGE und anschließendem Immunoblot analysiert. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen NP, einem Kaninchen Antiserum gegen NS2 sowie HRP gekoppelten Sekundärantikörpern. **(B) RNA-Synthese der verschiedenen im NS2-Gen mutierten Viren.** MDCKII Zellen wurden mit den rekombinanten Viren zeitgleich und unter denselben Bedingungen wie in A infiziert und nach 8h wurde Gesamt-RNA isoliert. 5 µg dieser RNA wurden mit einem Überschuss an ³²P-markierten Sonden für virale (+) und (-) RNA revers transkribiert. Die entstandenen Produkte wurden in einem denaturierenden 8%-Polyacrylamid-7M-Harnstoff-Gel aufgetrennt und per Phosphorimaging nachgewiesen.

Ergebnisse

Abbildung 3.16 A zeigt den Nachweis der viralen NP und NS2 Proteine in den mit den verschiedenen Viren infizierten Zellen. In den Lysaten der mit den Mutanten M7 und M8 infizierten Zellen war kein NS2 Protein zu detektieren. Mutante M7 war bereits in der Expression durch das pCAGGS-Konstrukt durch das Antiserum nur schwach nachzuweisen (siehe Abbildung 3.12).

Als nächstes wurde der Einfluss der Mutationen im NS2-Protein auf die RNA-Synthese der Viren untersucht. Aus den MDCKII Zellen wurde synchron Gesamt-RNA isoliert und mittels *Primer-Extension* die Mengen der viralen RNA-Spezies bestimmt.

Abbildung 3.16 B zeigt die Konzentrationen der verschiedenen RNA Spezies acht Stunden nach Infektion mit den Virusmutanten. Die RNA-Mengen der WT infizierten Zellen sind vom Verhältnis der RNA Spezies untereinander mit dem 8 h-Wert der WT-Kinetik vergleichbar (siehe Abbildung 3.5). Der Vergleich der RNA Synthese der Virusmutanten zeigte dass die Mengen der synthetisierten RNA zwar zwischen den Viren stark schwankten, aber das Verhältnis der RNA-Spezies innerhalb der jeweiligen Infektion änderte sich kaum. Die Mutationen im NS2 Protein zeigten in diesem Assay keinen eindeutigen Phänotyp.

Bei einem Vergleich der RNA-Verhältnisse von Minigenomassay (MGA, Abbildung 3.11) und Virusinfektion bei WT Protein bzw. WT Virus (Abbildung 3.16 B) fiel auf, dass in der Virusinfektion wesentlich mehr mRNA synthetisiert wurde als im MGA. Die Eigenschaften der mutierten NS2 Proteine und Viren sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 3-2 Eigenschaften der mutierten NS2 Proteine und der rekombinanten Viren.

WT/Mutante	WT	M1 M19T L21S	M2 G53A D54A	M3 L69S Q71A	M4 E75A I76A	M5 R77A W78A	M6 L79A I80A	M7 E82A V83A	M8* T115A S117A
Inhibition der Luziferaseexpression ¹	++	--	0	0	-	+	0	--	*
Inhibition der mRNA Synthese ²	++	--	0	-	0	+	-	0	*
Steigerung der cRNA Synthese ²	++	+++	+	0	+	+	+	++	*
Steigerung der vRNA Synthese ²	++	++	0	-	0	++	0	0	*
Protein Nachweis/Stabilität ³	++	++	++	+	0	++	0	0	*
Virusreplikation im Hühnerei ⁴	++	-	-	keine	+	-	keine	-	+

1) Luziferaseassay: ++ wie Wildtyp, 0 Funktionsverlust, -- Steigerung der Luziferaseaktivität.

2) *Primer Extension*: ++ wie Wildtyp, 0 Funktionsverlust, -- Steigerung der entspr. RNA-Konzentration.

3) Nachweis im Immunoblot, ++ wie WT, bis hin zu 0 = gerade noch nachweisbar.

4) Virustiter (PFU/ml): ++: $>10^7$ +: 10^6 - 10^7 -: $<10^5$. * kein pCAGGS-Konstrukt

3.13 Einfluss einer Plasmid-gestützten NS2 Überexpression auf eine Infektion mit Influenzaviren

Ein weiterer Ansatz, die Regulation der RNA Synthese durch das NS2 Protein zu untersuchen, war, das NS2 Protein in Zellen überzuexprimieren und anschließend zu infizieren. Den bisherigen Ergebnissen zufolge sollte dieser Überschuss an NS2 die virale Polymerase überwiegend in den Replikationsmodus schalten. Um zu überprüfen, wie eine solche Infektion von NS2-transfizierten Zellen im Vergleich zu kontroll-transfizierten Zellen verläuft, wurden MDCKII Zellen zuerst mit dem pCAGGS-NS2-WT Konstrukt transfiziert und 24 h später mit dem Influenza A/WSN/33 Virus infiziert. Nach 8 h wurde fixiert und die Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Hierbei fiel auf, dass die Zellen mit starker NS2 Expression kein NP Signal aufwiesen. Erstaunlich war dabei der 100-prozentige Ausschluss von NP-Signal in Zellen, die stark NS2 exprimierten (Abbildung 3.17, linke Spalte). Um auszuschließen, dass schon durch die Transfektion an sich eine produktive Infektion verhindert wird oder dass der Effekt durch Überexpression eines beliebigen Proteins hervorgerufen wird, wurden Zellen zur Kontrolle gleichzeitig entweder mit pEGFP-C1 oder pCAGGS-NS2 transfiziert.

Zellen, die ein starkes GFP-Signal aufwiesen, zeigten im Gegensatz zu NS2 transfizierten Zellen NP Signale, die einem normalen Infektionsverlauf entsprechen (Abbildung 3.17, rechte Spalte).

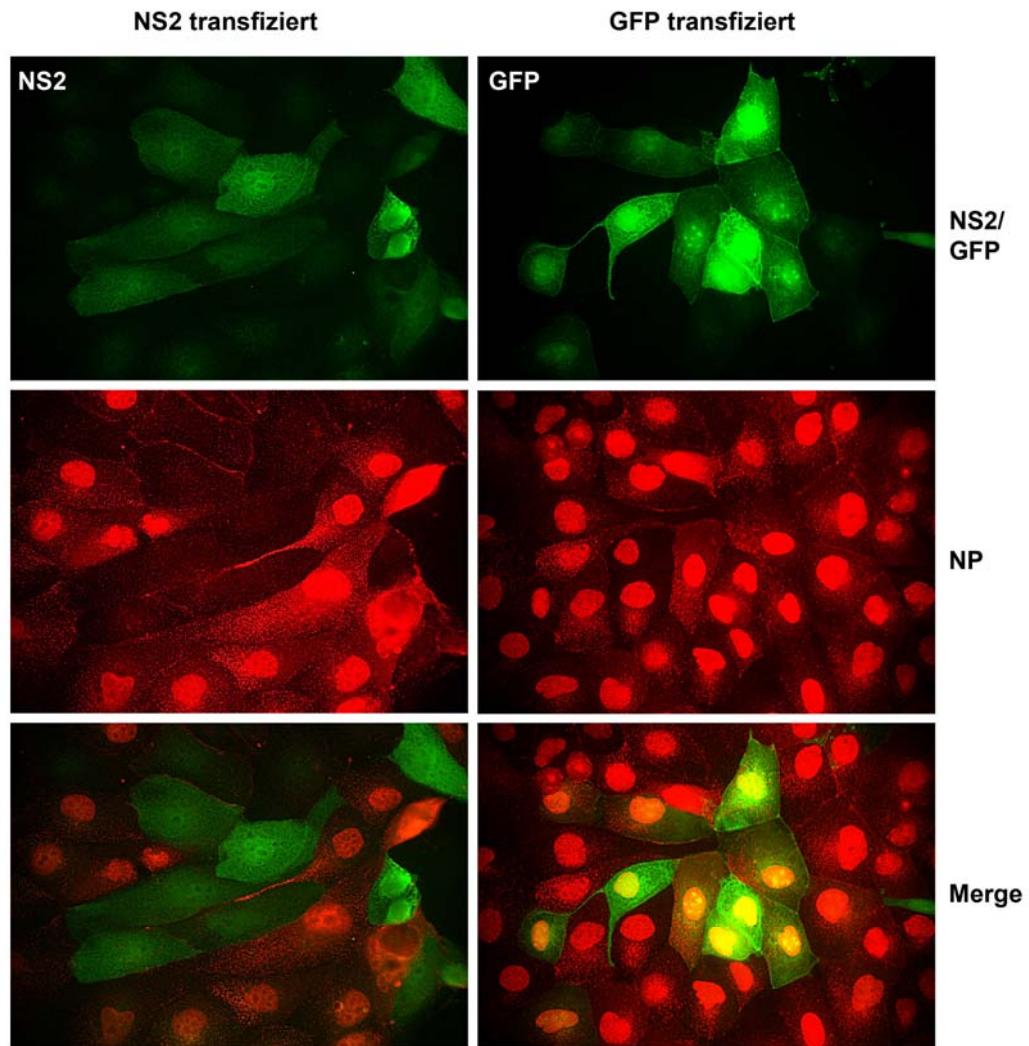


Abbildung 3.17 Transfektion von NS2 inhibiert eine Infektion von MDCKII Zellen mit Influenzaviren. 10^6 MDCKII Zellen wurden mit jeweils $2 \mu\text{g}$ pCAGGS-NS2 oder GFP transfiziert und 24 h später mit WT Influenza A/WSN/33 Virus und einer MOI von 10 infiziert. 8 h p.i. wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert, NP und NS2 mit Antikörpern markiert und die verschiedenen Proteine durch Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen.

Um den Einfluss von transfiziertem NS2 auf die virale RNA-Synthese während der Infektion zu untersuchen, wurden Zellen erneut, wie im vorigen Experiment, transfiziert und 24 h später infiziert. Anschließend wurde nach 8 h die Gesamt-RNA isoliert und per *Primer-Extension* analysiert. Abbildung 3.18 zeigt das Ergebnis der *Phosphorimaging*-Analyse. Es war keine Veränderung der RNA-Mengen durch das überexprimierte NS2 Protein festzustellen.

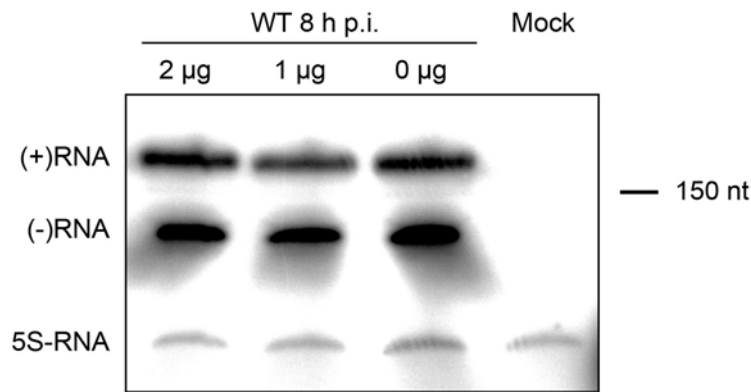


Abbildung 3.18 Primer-Extension Analyse von NS2-transfizierten und anschließend infizierten MDCKII Zellen. 10^6 MDCKII Zellen wurden mit den angegebenen Mengen von NS2 transfiziert und 24 h später mit WT Influenza A/WSN/33 Virus und einer MOI von 10 infiziert. 8 h p.i. wurde Gesamt-RNA isoliert und eine Primer-Extension Analyse wie in Abbildung 3.5 durchgeführt.

Außerdem wurde mittels Immunoblot überprüft, ob die Expression von NS2 die Infektion inhibiert, indem die Expression des Nukleoproteins verglichen wurde (siehe Abbildung 3.19).

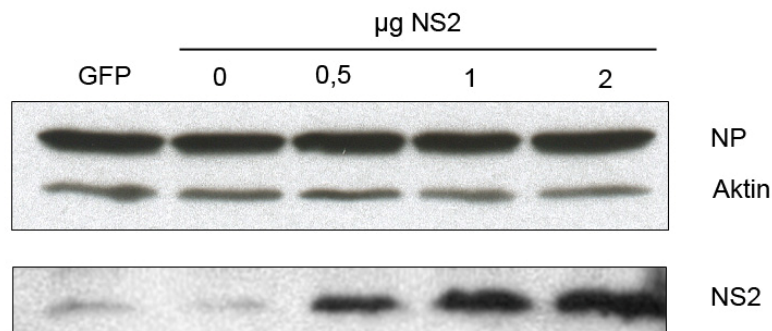


Abbildung 3.19 Immunoblot Analyse von NS2-transfizierten und anschließend infizierten MDCKII Zellen. 10^6 MDCKII Zellen wurden mit 2 µg GFP oder den angegebenen Mengen von pCAGGS-NS2 (in µg) transfiziert und 24 h später mit WT Influenza A/WSN/33 Virus mit einer MOI von 10 infiziert. 8 h p.i. wurden die Zellen lysiert und mittels Immunoblot auf ihren Gehalt an NP, Aktin und NS2 analysiert.

Die Analyse der transfizierten und infizierten MDCKII Zellen durch Immunoblotting zeigte, dass auch eine erhebliche Menge exprimiertes NS2 Protein keinen Effekt auf die virale NP-Synthese oder die Aktin-Konzentration in den Wirtszellen hatte (Abbildung 3.19).

4 Diskussion

4.1 Ziele dieser Arbeit

Das Schlüsselement der Virusreplikation ist die Synthese viraler RNA. Sobald die vRNPs in die Wirtszelle eingedrungen sind, werden sie in den Zellkern importiert, wo die virale Polymerase die vRNA in positiv-strängige virale mRNA transkribiert. Die spätere Replikation der vRNA erfolgt zweistufig, erst wird mit der cRNA eine vollständige komplementäre Kopie erstellt und von dieser Vorlage werden dann wiederum vRNA Segmente erstellt.

Trotz dieses Wissens über den Mechanismus der viralen RNA Synthese und diverse Faktoren, die dafür wichtig sind, wird die temporale Regulation der Synthese der drei verschiedenen RNA-Spezies kontrovers diskutiert. Verschiedene virale und zelluläre Proteine sind dabei als wichtige Faktoren identifiziert worden: Auf viraler Seite spielt NP die wichtigste Rolle (Beaton und Krug, 1986; Shapiro und Krug, 1988). Des Weiteren wurden zelluläre Faktoren als Regulatoren der viralen RNA Synthese beschrieben. Dazu zählen UAP56 (Momose et al., 2001), Hsp90 (Momose et al., 2002), hCLE (Huarte et al., 2001) und die MCM-Helikase (Kawaguchi und Nagata, 2007).

Erste Hinweise auf eine Rolle des NS2 Proteins in der Replikation zeigten Odagiri et al. 1990. Drei Punktmutationen im NS-Segment des A/Aichi/2/68 (H3N2) Virus, die in zwei ausgetauschten Aminosäuren resultierten (I32T, G67E), führten zum Auftreten von defekten und interferierenden Partikeln, die subgenomische Fragmente der Polymerase Segmente enthielten (Odagiri und Tobita, 1990). Bullido et al. zeigten später einen inhibitorischen Einfluss des NS2 Proteins auf die Expression eines vRNA ähnlichen Reportergens durch die virale Polymerase.

Die vorliegende Arbeit demonstriert, dass die Inhibition der Reportergenaktivität durch das NS2 Protein auf die Verringerung der mRNA Synthese zurückzuführen ist. Gleichzeitig charakterisiert sie einen bisher unbekanntem stimulierenden Einfluss des NS2 Proteins auf die vRNA-Replikation der viralen Polymerase. Außerdem weist sie auf einen möglichen Mechanismus hin, nämlich eine Protein-Protein Interaktion des NS2 Proteins mit der viralen Polymerase und zuletzt wird ein revidiertes Modell der RNA-Synthese des Influenza A Virus vorgeschlagen und diskutiert.

4.2 Einfluss des NS2 Proteins auf die mRNA Synthese der viralen Polymerase

Mittels Reporterstudien und *Primer Extension Assays* konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass das NS2 Protein die mRNA-Synthese der viralen Polymerase deutlich und dosisabhängig verringert (siehe Kapitel 3.1). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass das NS2-Protein eines Influenza A Virus auch eine Influenza B Virus Polymerase negativ regulieren kann. Erstaunlich war dieses Ergebnis aufgrund der Tatsache, dass die Sequenzen der NS2 Proteine von Influenza A/WSN- und Influenza B/Yamagata Viren nur eine 24 %ige Sequenzidentität aufweisen. Allerdings ist trotz der geringen Identität die chemische Natur der Aminosäurereste über weite Teile der Sequenz konserviert (Akarsu et al., 2003).

Das NS2 Protein bewirkt eine Verringerung der Reporterexpression durch die virale Polymerase, für die prinzipiell eine Reihe unterschiedlicher Mechanismen verantwortlich sein könnte. Dies könnte durch eine Interaktion des NS2 Proteins mit der Polymerase, der vRNA oder Wirtsfaktoren zustande kommen. Denkbar wäre auch eine Degradation der Polymerase oder eine toxische Wirkung von NS2 in hohen Dosen. Allerdings wurde eine Toxizität hier nie beobachtet, d.h. es wurde nach Expression von NS2 keine Veränderung der Mengen an zellulären Proteinen wie Aktin oder Tubulin, (z.B.

Abbildung 3.1 B) bzw. viralen Proteinen wie NP (z.B. Abbildung 3.19) oder PA (nicht gezeigt) beobachtet werden. Auch Bullido et al. beobachteten keine durch das NS2 Protein verursachte Zytotoxizität (Bullido et al., 2001).

Die Inhibition der mRNA-Synthese könnte alternativ auch durch Modulation verschiedener Funktionen der Polymerase erreicht werden, denkbar wäre z.B. die Inhibition der Endonukleasefunktion, oder eine veränderte Bindungsaffinität zum vRNA Promotor.

4.3 Expression des NS2 Proteins führt zur Steigerung der Negativ-Strang-RNA-Replikation

Interessanterweise wurde die Abnahme der mRNA-Menge durch Expression von NS2 Protein, von einer gleichzeitigen Steigerung der vRNA-Menge begleitet.

Bei Bullido et al. wurde durch ein Nuklease-Protektions-Assay ein gegenteiliger Effekt beobachtet, d.h. die Expression des NS2 Proteins führte zu einer Reduktion der

Synthese einer positivsträngigen RNA ohne Poly-Anhang von einer negativsträngigen Modell-RNA. Dies könnte unter anderem an der Verwendung einer anderen Modell-RNA, an der stöchiometrisch anders zusammengesetzten Menge an Polymeraseplasmiden, dem anderen Nachweisverfahren oder der Expression der Proteine durch eine Vacciniavirus-gestützte Expression der T7 Polymerase liegen. Zudem ist unklar, welche Menge an NS2-exprimierendem Plasmid eingesetzt wurde.

Andererseits wurde die Steigerung der vRNA in dieser Arbeit durch drei verschiedene Techniken, nämlich durch Reporterassays, Northern Blot Analysen (Abbildung 3.3) und Primer Extension-Assays bestätigt (Abbildung 3.6).

In der vorliegenden Arbeit kam es also einerseits zu einer Inhibition der mRNA Synthese und dadurch letztendlich auch der viralen Genexpression, während andererseits die Replikation des Genoms stimuliert wurde. Diese zweiseitige Regulation durch NS2, deckt sich mit früheren experimentellen Beobachtungen: Nachdem die für eine Replikation der viralen Gensegmente und deren Verpackung notwendigen Proteine exprimiert wurden, dominiert in der späteren Infektionsphase die vRNA-Synthese über die mRNA Synthese (Hay et al., 1977; Inglis und Mahy, 1979; Shapiro et al., 1987). NS2 wird erst später (Lamb und Choppin, 1976; Lamb et al., 1978) im viralen Vermehrungszyklus exprimiert, käme also zeitlich gesehen als auslösender Faktor für dieses Umschalten auf Replikation in Frage.

Es ist bisher nicht abschließend geklärt, wie das Virus dieses Umschalten reguliert. Zurzeit werden zwei verschiedene Modelle diskutiert, das klassische ‚Schalter‘-Modell und das neuere ‚Stabilisierungsmodell‘ (siehe Kapitel 1.2.4). Der hier beobachtete positive Einfluss des NS2 Proteins auf die cRNA- und vRNA-Synthese demonstriert, dass erhöhte NS2 Konzentrationen die RNA-Synthese der viralen Polymerase auf Replikation umstellen können.

4.4 NS2 interagiert mit dem viralen Polymerasekomplex

Mittels Koimmunpräzipitationen aus Lysaten von infizierten Zellen konnte anschließend gezeigt werden, dass NS2 *in vivo* mit der viralen Polymerase interagiert. Die Koimmunpräzipitation der PA Untereinheit war der erste Hinweis auf eine (schon mehrfach spekulierte) Interaktion des Influenza A Virus NS2 Proteins mit der viralen Polymerase. Interessanterweise war von Influenza B Viren eine Interaktion des NS2 Proteins mit vRNP-Partikeln bekannt, zusätzlich zu der bekannten Interaktion mit M1

(Imai et al., 2003). Dies waren allerdings Kofraktionierungs-Versuche, so dass leider nicht bekannt ist mit welcher Polymeraseuntereinheit das B/NS2 interagiert.

Da die virale Polymerase eine sehr kompakte Einheit bildet (Area et al., 2004), ist es nicht unwahrscheinlich, dass andere Untereinheiten des vRNP-Komplexes ebenfalls an der Interaktion beteiligt sind. NP und PB1 konnten allerdings in mehreren Experimenten nicht in NS2 Immunpräzipitaten nachgewiesen werden. Da PB2 aufgrund eines fehlenden funktionalen Antiserums im Immunoblot nicht detektiert werden konnte, kann eine Kopräzipitation von PB2 nicht ausgeschlossen werden. Es ist ebenfalls möglich, dass die Interaktion von NS2 mit der Polymerase indirekt über die Bindung von NS2 an M1 und dann an NP erfolgt, und damit an den vRNP-Komplex. Eine spezifische Interaktion von NS2 mit den einzelnen Untereinheiten wäre durch individuelle Transfektion der zu untersuchenden Faktoren und anschließende Immunpräzipitationen analysierbar. Allerdings sind einzeln exprimierte Polymeraseuntereinheiten in transfizierten Zellen instabil (Mukaigawa und Nayak, 1991), was die Untersuchung erschweren würde.

Ein indirekter oder direkter Einfluss von NS2 auf die PA-Untereinheit wäre kompatibel mit früheren Beobachtungen in diesem Gebiet. So wiesen Arbeiten mit temperatursensitiven Mutationen im PA-Gen auf eine Rolle der PA Untereinheit bei der Replikation der vRNA hin, da diese bei der nichtpermissiven Temperatur defizient in der vRNA-Synthese waren, aber dennoch mRNA synthetisieren konnten (Huarte et al., 2003; Krug et al., 1975; Rodriguez et al., 2007; Thierry und Danos, 1982).

Die in dieser Arbeit durch die Expression des NS2 Proteins beobachtete Inhibition der mRNA-Synthese, sowie die vermutete Interaktion von NS2 mit der PA Untereinheit der Polymerase, decken sich mit Beobachtungen einer Mutante des PA Proteins. Dass diese auch für die mRNA Synthese bedeutend ist, zeigte sich durch den Austausch einer Aminosäure (H510A) im C-terminalen Drittel des Proteins (Fodor et al., 2002). Dieser Austausch hatte zur Folge, dass die Polymerase zwar vRNA replizieren konnte (vRNA → cRNA → vRNA), aber nicht mehr transkribieren konnte (vRNA → mRNA). Der Phänotyp wird auf eine Störung der Endonukleaseaktivität der Polymerase zurückgeführt. Es liegt nahe, dass NS2 eben dieselbe Funktion durch Bindung an die PA-Untereinheit stören könnte.

Aktuelle Arbeiten von Kawaguchi & Nagata zeigten außerdem, dass die Influenza A Virus Polymerase in einem zellfreien System zwar in der Lage ist, RNA Replikation zu initiieren, aber keine produktive Elongation und somit keine vollständige cRNA

herstellen kann (Kawaguchi und Nagata, 2007). Sie konnten nachweisen, dass dafür der Wirtszellfaktor MCM (*minichromosome maintenance*), ein Komplex aus sieben verschiedenen Proteinen, notwendig ist. Dieser interagiert ebenfalls mit der PA Untereinheit der Polymerase.

Maier und Kollegen (Maier et al., 2008) konnten durch Alanin-Austausch fünf N-terminale Aminosäurepositionen im PA Protein identifizieren (in der Region L163-I178), deren Austausch eine reduzierte Bindung an der Polymerase an den cRNA Promotor zur Folge hatte. Auf die Bindung des vRNA Promotors hatten diese Mutationen dagegen wenig oder gar keinen Einfluss. Man kann spekulieren, dass das NS2 Protein diese Funktion des PA Proteins beeinflusst, nämlich eine Unterstützung der Bindung der Polymerase an den cRNA Promotor anstelle des vRNA Promotors. Dadurch ließe sich die Steigerung der vRNA-Synthese durch die Expression von NS2 Protein erklären, wie sie in Abschnitt 3.4 gezeigt wird.

Des Weiteren besitzt PA eine Proteaseaktivität, welche die zelluläre Polymerase II im späteren Verlauf des viralen Vermehrungszyklus degradiert (Rodriguez et al., 2007). Ein Einfluss von NS2 auf die Proteaseaktivität der PA-Untereinheit wäre denkbar. Eine erhöhte Degradation der Polymerase II durch PA bzw. den viralen Polymerasekomplex, könnte zu fehlenden mRNA-Molekülen führen, so dass diese auch nicht mehr als Primer für die virale mRNA Produktion zur Verfügung stehen.

Um diese Theorie zu untermauern, müsste die Interaktion zwischen NS2 und der Polymerase bestätigt und genauer charakterisiert werden. Mit Hilfe von Deletionsmutanten von NS2 und PA und einem *Pulldownassay* könnten die Bereiche eingegrenzt werden, die für die Interaktion notwendig sind und überprüft werden, ob das NS2 Protein tatsächlich mit der PA Untereinheit interagiert.

4.5 Mutationsanalyse konservierter Aminosäuren des NS2

Proteins

Um herauszufinden welche Bereiche des NS2 für die RNA-Synthese stimulierende- bzw. inhibierende Funktion wichtig sind, wurden mittels zielgerichteter Mutagenese konservierte Aminosäuren innerhalb des NS2 Proteins verändert.

Das NS2 Protein ist unter physiologischen Bedingungen ein kompaktes Monomer. Es besitzt eine gefaltete aber hochflexible Konformation, die Ähnlichkeiten mit der *molten globule* Konformation hat (Lommer und Luo, 2002). Dabei ist diese Flexibilität

nicht in allen Bereichen des Proteins gleichermaßen vorhanden, der N-Terminus ist hochflexibel, während der C-Terminus Sekundärstrukturen ausbildet und Protease-resistent ist. Der C-terminale Bereich konnte kristallisiert werden. Er besteht aus einer kompakten helikalen Haarnadel-Struktur, die aus zwei α -Helices und einer verbindenden Schleife besteht (Akarsu et al., 2003).

Die Doppelaustausche befanden sich, außer dem Austausch im NES im flexibleren N-Terminus (M1), hauptsächlich im Bereich der beiden Helices im C-terminalen Bereich (M3-M8). M2 (G53A/D54A) befindet sich zwischen diesen beiden Domänen.

Fluoreszenzmikroskopische Analysen des durch den pCAGGS-Vektor exprimierten NS2-WT Proteins (A/WSN/33) in dieser Arbeit zeigten eine fast homogene Verteilung des NS2 Proteins mit einer verstärkten Lokalisation im Kern und Aussparung der Nukleoli (Abbildung 3.9). Das NS2 Proteins eines durch einen SV40 Vektor exprimierten NS-Gensegmentes (A/PR8/34) wurde in CV1-1 Zellen mittels Immunfluoreszenz hauptsächlich im Kern gefunden, trotz des Kernexportsignals des Proteins (Greenspan et al., 1985). Diese Diskrepanz könnte verschiedene Ursachen haben, denkbar ist, dass die Expression durch den pCAGGS Vektor deutlich stärker ist und es dadurch auch zu einer weiteren Verteilung des Proteins kommen kann. Ähnliches ist von NP bekannt (Digard et al., 1999; Elton et al., 2001). Oder es kommt durch das Helfervirus bzw. Unterschiede in den verwendeten Zelllinien zu einer Änderung der Lokalisation. Die Immunfluoreszenzaufnahmen zeigten eine vergleichbare Expression aller mutierten Proteine. Die Lokalisation der mutierten NS2 Proteine wies zudem im Vergleich zum WT keine Veränderungen auf. Überraschenderweise zeigte sich auch bei Mutante M1 (M19T/L21S), bei der zwei Aminosäuren des Kernexportsignals ausgetauscht wurden, keine Lokalisationsänderung gegenüber dem WT. Mutante M1 lokalisierte wie alle anderen mutierten NS2 Proteine homogen in der Zelle. Dies könnte an der nur teilweisen Veränderung des NES liegen. In der Literatur wurden Lokalisationsänderungen eines GST-Proteins mit konjugiertem NES nur bei einem NES mit drei Aminosäureaustauschen (M16A/M19A/L21A) gezeigt (O'Neill et al., 1998).

Alle Mutanten zeigten eine verringerte Inhibitionseffizienz im Vergleich zum WT NS2 Protein, da die **Reporterexpression** eines Influenza A Virus Minigenoms deutlich gegenüber den WT NS2 transfizierten Zellen anstieg. Die Mutationen hatten also einen Funktionsverlust zu Folge. Eine eindeutige aber verminderte Inhibition der Minigenomexpression zeigte sich nur bei Mutante M5 (R77A/W78A). In einer anderen

Arbeit zeigte eine ähnliche NS2-Mutante, in der das Tryptophan an Position 78 zu Serin mutiert wurde, eine erheblich reduzierte Bindungsaffinität zum Matrixprotein M1 und somit zu dem theoretischen Exportkomplex M1-vRNP (Akarsu et al., 2003). Der fehlende Funktionsverlust, der in dieser Arbeit beobachtet wurde, lässt wiederum schließen, dass die Interaktion mit M1 über das Tryptophan nicht für die hier beobachtete regulatorische Funktion des NS2 Proteins vonnöten ist.

Der Einfluss der NS2-Mutationen auf die RNA-Synthese eines viralen Minigenom wurde mittels der *Primer Extension* Methode untersucht, bei der die Konzentrationen aller drei entstehenden RNA-Spezies, vRNA, cRNA und mRNA bestimmt werden können. Die Mutationen des NS2 Proteins führten wie im Reporterassay zu einem Funktionsverlust im Vergleich zum Wildtyp-Protein, da die Inhibition der **mRNA**-Synthese in den entsprechend transfizierten Zellen deutlich schwächer ausfiel (Abbildung 3.12). Hier war ebenfalls die M5 Mutation diejenige, die den geringsten Funktionsverlust verzeichnete, da die mRNA Konzentration fast der beim Wildtyp beobachteten Konzentration entsprach.

Dass die cRNA-Menge in allen Ansätzen mit ektopisch exprimierten NS2 Proteinen deutlich höher war als in dem Ansatz ohne NS2 (mit der Ausnahme von M3), zeigt dass die Mutanten, auch wenn sie im Western Blot nur schwach nachweisbar waren, wie z.B. M7, noch funktional waren.

Auch die Steigerung der vRNA-Synthese, die beim WT Protein beobachtet wurde, fiel bei den meisten Mutanten deutlich schwächer aus. Hier zeigte M5, wie bei den beiden anderen RNA-Spezies, den geringsten Funktionsverlust. Interessant war hier der Phänotyp der Mutante M1 (M19T/L21S). Diese Mutante zeigte eine der WT-Probe vergleichbare vRNA-Synthese. Dies war überraschend, da diese Mutante bei der Inhibition der mRNA-Synthese die Funktion völlig verloren hatte. Während das WT-Protein die mRNA-Konzentration auf unter 50 % der Leervektorkontrolle senkte, stieg sie in der M1 transfizierten Probe auf 136 % im Vergleich zur Vektorkontrolle. Dieses Ergebnis deckt sich auch mit dem Ergebnis im Reporterassay (Abbildung 3.11), in dem die M1 Mutante 64 % über der Luciferase-Expression der Vektorkontrolle lag, während das WT Protein diese auf 20 % senkte. Das deutet auf eine wichtige Funktion der Aminosäuren im NES bei der Inhibition der mRNA-Synthese hin. Die Steigerung der Replikation scheint dagegen durch diese Mutation kaum beeinträchtigt zu sein. Dies zeigt, dass die beiden unterschiedlichen Funktionen, also Inhibition der mRNA Synthese und Steigerung der vRNA Synthese, durch Mutation separierbar sind.

4.6 Auswirkung der NS2-Mutationen in rekombinanten Viren

Um die Auswirkungen der verschiedenen Mutationen *in vivo* zu analysieren, wurde versucht diese durch einen revers-genetischen Ansatz in das Influenza A/WSN/1933 Virus einzubringen. Die Tatsache, dass sich dabei keine Viren generieren ließen, welche die Mutationen M3 (Leu69Ser / Gln71Ala) und M6 (Leu79Ala / Ile80Ala) enthielten, weist auf die essentielle Bedeutung der konservierten Aminosäuren an diesen Positionen hin. Alle vier Positionen befinden sich in der Kristallstruktur des C-Terminus in der ersten Helix (C1) (siehe Abbildung 4.1 (Akarsu et al., 2003)).

Das in der Mutante M3 veränderte Leucin an Position 69 bildet im WT eine hydrophobe Wechselwirkung bzw. eine van der Waals-Brücke mit dem Isoleucin 113 in der zweiten Helix (C2). Diese Wechselwirkung würde bei Mutante M3 durch den Austausch gegen Serin verloren gehen. Bemerkenswert ist, dass in der *Primer Extension* Analyse der mutierten NS2 Proteine die Mutante M3 die geringsten cRNA und vRNA Konzentrationen zeigte (siehe Abbildung 3.12), die vRNA Konzentration lag sogar deutlich unter der der Vektorkontrolle. Dies deutet an, dass die hydrophobe Wechselwirkung zwischen L69 und I113 für die Regulator-Funktion des NS2 essentiell ist.

Bei Mutante M6 wurde das Leucin an Position 79 und das Isoleucin an Position 80 gegen Alanin ausgetauscht (L79A / I80A). Das Leucin an Position 79 ist zwischen Influenza A und B Viren konserviert, hat aber keine Funktion in der Helix-Helix-Interaktion innerhalb des NS2 Moleküls. Es bildet aber eine van der Waals-Brücke zwischen zwei NS2-Monomeren im postulierten NS2-Dimer (Akarsu et al., 2003). Das Isoleucin an Position 80 interagiert ähnlich wie bei Mutante M3 über van der Waals-Kräfte mit einem Leucin an Position 103 in der zweiten Helix des C-Terminus. Mutante M6 zeigte keine Verringerung der RNA-Replikation im *Primer Extension Assay* wie die Mutante M3, war allerdings im Immunoblot auch nur sehr schwach nachweisbar.

Da keine Viren mit diesen Mutationen generiert werden konnten, scheint die Helix-Helix-Interaktion durch hydrophobe Wechselwirkungen äußerst wichtig für die Ausbildung der kompakten C-terminalen Struktur und damit der Funktionalität des NS2 Proteins zu sein. Bemerkenswert ist allerdings, dass die Mutante M4 (E75A / I76A) replikationsfähig ist, obwohl wie in M6, ein theoretisch für die Helix-Helix-Interaktion wichtiges Isoleucin ausgetauscht wurde.

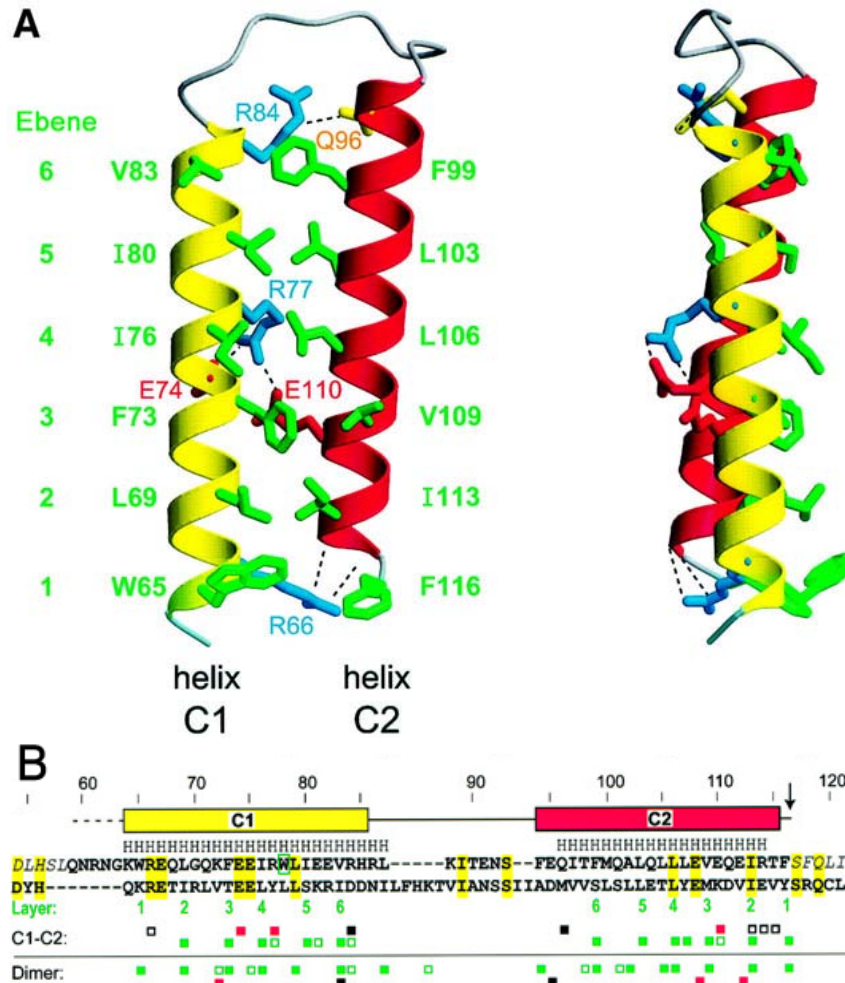


Abbildung 4.1 Sekundärstruktur und Sequenz des C-Terminus des NS2 Proteins.

A. Bänderdiagramm. Abgebildet sind die sechs Ebenen der hydrophoben Aminosäureinteraktionen zwischen den beiden Helices. Außerdem die Wasserstoffbrücke zwischen Arg84 und Gln96, die Kappeninteraktion zwischen Arg66 und dem C-Terminus der Helix C2 sowie die Ionenbindungen von Arg77, Glu74 und Glu110 dargestellt. **B.** Die mit H markierten Aminosäuren sind mit einer Wahrscheinlichkeit von über 90% helikal angeordnet (PHD Programm). Zwischen Influenza A und B Viren konservierte Aminosäuren sind gelb unterlegt. Das grün umrandete Tryptophan (W78) wird mit der Bindung des Matrixproteins M1 in Zusammenhang gebracht. Der Pfeil markiert das Ende des Protease-resistenten Fragmentes und die kursiv geschriebenen AS fehlten im zur Strukturbestimmung verwendeten Molekül. Kontakte zwischen den C1 und C2 Helices innerhalb eines Monomers oder zwischen den Monomeren eines Dimers sind wie folgt markiert: Grüne Kästen sind Van der Waals Kontakte die hydrophobe Aminosäuren involvieren (ausgefüllt) oder den aliphatischen Teil eines polaren Restes (leer). Rote Kästen sind Ionenbindungen. Schwarze Kästen sind Wasserstoffbrückenbindungen (ausgefüllt) oder gehören zu der Interaktion des Arg66 mit dem C-Terminus der C2-Helix (leer). (Akarsu et al., 2003).

In der Literatur wurde mittels *Pulldownassay* gezeigt, dass die Bindung einer W78S Mutante an das Matrixprotein M1 sehr stark reduziert war (Akarsu et al., 2003). Die Bindung an das Matrixprotein ist für den Export der vRNPs aus dem Zellkern wichtig. Das Virus mit der M5 Mutation (R77A/W78A) ist replikationsfähig, aber ist mit einem drei Logstufen niedrigeren Titer als der des Wildtyps sehr stark attenuiert.

Aufgrund der starken Attenuierung der rekombinanten Viren war es schwierig die **RNA Synthese** der Viren zu analysieren, da der Nachweis an technische Grenzen stieß. Ein

weiterer Versuch die rekombinanten Viren zu höheren Titern anzuziehen war erfolglos. Es konnte keine Veränderung der Verhältnisse der RNA-Spezies der rekombinanten Viren gezeigt werden. Der Phänotyp der Mutante M1, eine Steigerung der Replikation ohne gleichzeitige Verringerung der Inhibition der mRNA-Synthese eines Minigenoms, war in den mit dem entsprechenden Virus infizierten RNA-Proben nicht zu beobachten. Dies kann mehrere Gründe haben: Die Situation in der Infektion ist im Vergleich zum Minigenomassay komplexer, da alle viralen Komponenten vorhanden sind. Zudem wurde bisher nur ein Segment zu einem bestimmten Zeitpunkt innerhalb des dynamischen Infektionsverlaufs untersucht. Aus Zeitgründen war er leider nicht mehr möglich andere Segmente oder andere Zeitpunkte zu analysieren.

Die mutierten NS2 Proteine der Viren zeigten in **Immunfluoreszenzanalysen** keinen auffälligen Phänotyp. Auch das Nukleoprotein ist 6 h nach der Infektion der Zellen zum Teil wieder ins Zytoplasma exportiert. In der Literatur wurde für *virus like particles* (VLPs) mit dreifach mutiertem NES (M16A/M19A/L21A) gezeigt, dass das NS2 Protein zwar homogen in der Zelle verteilt war, aber das Nukleoprotein im Kern verbleibt (Neumann et al., 2000) während es beim WT-VLP aus dem Kern exportiert wurde. Bei der in dieser Arbeit erstellten Virusmutante M1 (M19T/L21S) wurde dagegen zytoplasmatisch lokalisiertes NP nachgewiesen. Dies liegt vermutlich an der geringeren Anzahl an ausgetauschten hydrophoben Aminosäuren im NES.

4.7 Einfluss von transfiziertem NS2 auf die Infektion

In Immunfluoreszenzanalysen von Zellen, die mit Wildtyp-NS2 transfiziert wurden und anschließend mit Wildtyp-Viren infiziert wurden, war zu beobachten, dass NS2-exprimierende Zellen kein NP Signal enthielten (Abbildung 3.18). Eine Überexpression von NS2 schien eine produktive Infektion dieser Zellen zu verhindern, denn NP war in Zellen, die ein deutliches NS2 Signal enthielten, weder im Zellkern noch im Zytoplasma nachzuweisen. Zwei denkbare Szenarien kommen als Erklärung für dieses Phänomen in Frage. Die eine Möglichkeit ist, dass große Mengen von NS2 durch die starke Inhibition der viralen mRNA Synthese eine Expression von NP unterbinden. Die zweite Möglichkeit ist eine Aktivierung des antiviralen Status durch das transfizierte NS2. Dieser antivirale Status würde ebenfalls die Expression und Replikation der viralen Gene verhindern. Es gibt Hinweise auf eine Aktivierung der Interferonsynthese durch liposomale Transfektion und eine dadurch erfolgende Aktivierung der Interferonabhängigen Gene (Li et al., 1998). Allerdings ist die Unterdrückung der

viralen Replikation als Folge einer durch die Transfektion hervorgerufenen Interferonantwort durch die Kontroll-Transfektion mit GFP, die keinerlei Einfluss auf die Infektion hatte, nahezu auszuschließen.

Die *Primer Extension* in der Abbildung 3.18 zeigte keinerlei Einfluss der verschiedenen Mengen von NS2 auf die RNA-Mengen. Dies könnte an dem in der Immunfluoreszenz gezeigten Phänomen liegen, dass heißt, dass die NS2-transfizierten Zellen nicht infiziert wurden und es deswegen nicht zu einer Veränderung der RNA-Mengen kam. Dann wäre allerdings zu erwarten, dass die virale RNA-Menge insgesamt abnehmen würde, da insgesamt weniger Zellen infiziert worden wären. Da die Transfektionsrate der MDCKII Zellen jedoch nur bei ca. 20 % lag, könnte der Effekt aufgrund des hohen Hintergrundes nicht zu erkennen gewesen sein. Dasselbe lässt sich auch für den fehlenden Einfluss im Immunoblot vermuten (Abbildung 3.19).

Die Inhibition der Infektion durch NS2 ist in der Immunfluoreszenz deutlich zu sehen, ist aber im Immunoblot und der *Primer Extension* nicht nachweisbar. Eine der Immunfluoreszenz ähnliche aber quantitativere Auswertung würde eine Durchflusszytometrische Messung der exprimierten Proteine bieten. Eine Sortierung der Zellen mit anschließender weitergehender Analyse (*Primer Extension*, Immunoblot, *Ribonuclease Protection Assay*) könnte sowohl Aufschluss über die Anzahl der NS2 transfizierten und dadurch nicht infizierten Zellen geben, als auch über die dafür notwendige Menge an exprimiertem NS2 in den Zellen. Leider waren diese Versuche aus Zeitgründen nicht mehr durchzuführen.

4.8 Neues Regulationsmodell der RNA-Synthese von des Influenza A Virus

Die RNA-Synthese von Influenza A Viren ist grob in zwei Phasen einzuteilen, eine frühe Phase, in der hauptsächlich Transkription ($vRNA \rightarrow mRNA$) stattfindet, und eine späte Phase, in der die Replikation erfolgt ($vRNA \rightarrow cRNA \rightarrow vRNA$). Bislang wurde angenommen, dass freies NP für ein Umschalten zwischen Transkription und Replikation verantwortlich ist. Dafür gab es mehrere Hinweise: Infizierte Zellen, die durch Cycloheximid-Behandlung an der Proteinsynthese gehindert wurden, konnten keine Replikation durchführen. Dies zeigte, dass für die Replikation *de novo* Proteinsynthese notwendig ist (Barrett et al., 1979). Außerdem konnten gereinigte vRNP-Moleküle *in vitro* zwar mRNA synthetisieren, aber keine cRNA. Wenn

allerdings Zellextrakte mit viralen Proteinen hinzugegeben wurden, wurde cRNA wieder synthetisiert (Beaton und Krug, 1986). Als verantwortlicher viraler Faktor für das Umschalten auf Replikation wurde NP vermutet, und zwar auf Grund von ts-Mutationen im NP, die dazu führten, dass die Viren keine Replikation mehr durchführen konnten. Weiterhin schien NP für die Synthese von cRNA notwendig zu sein, in dem es das vorzeitige Abbrechen der Elongation der cRNA am Poly-U-Signal verhinderte. Dieses klassische Modell besagt, dass neusynthetisiertes, freies NP durch eine direkte Interaktion mit der Polymerase (Biswas et al., 1998) oder mit dem Promotor der vRNA (Klumpp et al., 1997) den Modus der Polymeraseaktivität von Transkription auf Replikation umschaltet.

Im Gegensatz dazu geht das sogenannte „Stabilisierungs“-Modell davon aus, dass die Polymerase schon zu Beginn des Infektionszyklus in der Lage ist cRNA zu produzieren. Die synthetisierte cRNA soll dann aber durch zelluläre Exonukleasen sofort wieder abgebaut werden, da zu diesem Zeitpunkt noch keine zusätzlichen Polymerasekomplexe bzw. Nukleoproteine vorliegen, die die cRNA vor diesem Abbau schützen würden (Vreede et al., 2004). Überraschenderweise wurde gezeigt, dass die Zugabe von zusätzlichem NP *in vitro* und auch die vorherige Transfektion von NP bei anschließender Infektion nicht zu einem Anstieg der c- bzw. vRNA Synthese führte, sondern dass das Gegenteil der Fall war (Mullin et al., 2004).

Auch die zusätzliche Transfektion und Expression von Polymerasekomplexen, in denen durch Mutation von Aminosäuren des Reaktionszentrums die Polymerasefunktion ausgeschaltet ist, und freiem NP, führte nicht zu einer Steigerung der RNA-Synthese (Vreede und Brownlee, 2007). Das bedeutet, dass das System entweder schon maximal produktiv ist, oder dass die Menge an vorliegenden Nukleoproteinen oder Polymerasekomplexen keine Kontrolle auf die cRNA bzw. vRNA Konzentration ausübt, weder über Steigerung der Synthese, noch über die Stabilisierung der RNA.

Dies wirft wiederum die Frage nach dem Mechanismus der temporalen Regulation der RNA Synthese auf. Es scheint, als wenn dazu noch ein oder mehrere zusätzliche Faktoren notwendig sind. Die hier gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass das NS2 Protein die fehlende Regulatorfunktion ausübt.

Ein Modell, das den Einfluss von NS2 auf die virale RNA-Synthese mit einbezieht, würde dem postulierten Stabilisierungsmodell ähnlich sehen, mit freiem Nukleoprotein als Voraussetzung für die Stabilität der Replikationsprodukte in der Wirtszelle. Das in der späteren Phase der Infektion exprimierte NS2 moduliert durch Protein-Protein

Wechselwirkung die Funktion der viralen Polymerase. Abbildung 4.2 zeigt den Vorschlag für ein revidiertes Modell der Regulation der RNA-Synthese der Influenza A Viren.

Für die Stabilisierung der cRNA und der vRNA werden neusynthetisiertes NP und Polymeraseproteine benötigt, die in der späten Phase in ausreichender Menge vorhanden wären. Das NS2 Protein wäre der virale Faktor, der später für eine gezielte Synthese von cRNA- bzw. vRNA-Synthese verantwortlich ist und gleichzeitig die mRNA Synthese herunterreguliert. Dass NS2 eine Rolle bei der cRNA Synthese spielt, deckt sich mit den Beobachtungen von Odagiri et al., die beobachteten, dass eine NS2 Mutante des A/Aichi/2/1968 Virus (I32T) fehlerhafte cRNA Produkte synthetisierte, und es dadurch zur vermehrten Bildung von defekten interferierenden Partikeln kam (Odagiri et al., 1994).

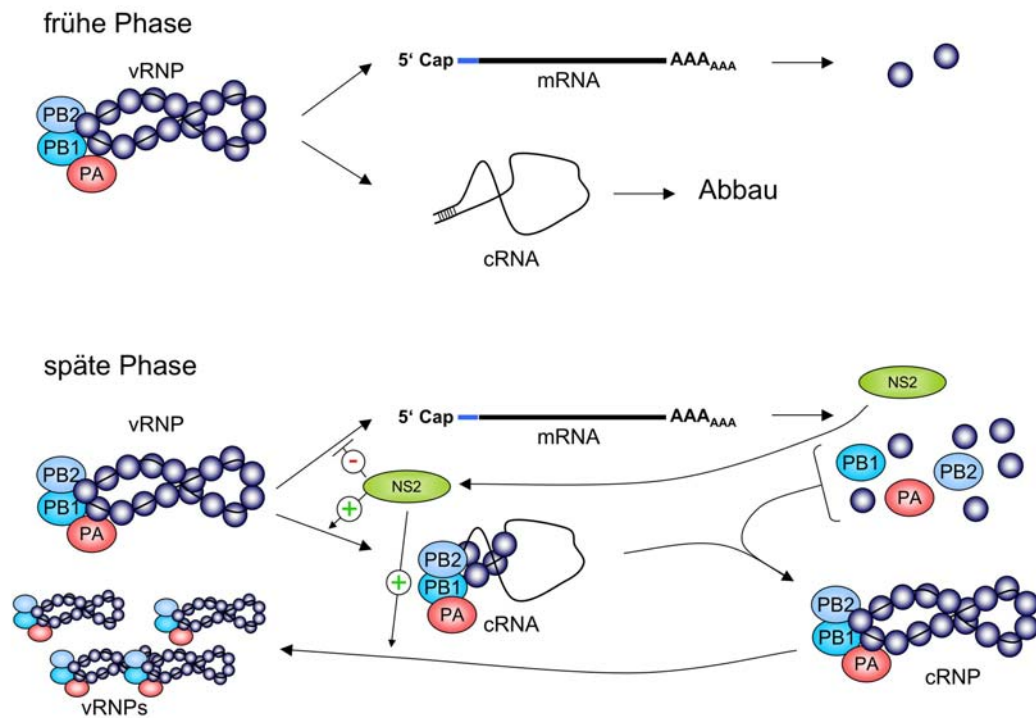


Abbildung 4.2 Schematisches Modell der Rolle von NS2 in der Regulation der viralen RNA-Synthese. In der späten Phase ermöglicht NP die Stabilisierung der c- und vRNA, während NS2 durch Wechselwirkung mit der Polymerase diese von Transkriptions- auf Replikationsmodus umschaltet.

4.9 Ausblick

In dieser Arbeit wurde das NS2 Protein als Regulator der viralen Polymerase charakterisiert. Die Expression des NS2 Proteins beeinflusste sowohl die Transkription als auch die Replikation einer viralen Polymerase. Dies ist aufgrund der momentanen Lage der Literatur zur Regulation der viralen RNA Synthese interessant, da die dem NP

zugesprochene Funktion der Regulation der RNA Synthese kürzlich in Frage gestellt wurde. Vreede und Brownlee zeigten, dass die Zugabe von NP und Polymerase zu einem viralen Minigenom nicht wie erwartet zur Steigerung der Replikation führte (Vreede und Brownlee, 2007). Ebenso zeigte die Transfektion von ansteigenden Mengen eines NP-Expressionsplasmids zu einem Minigenom nicht die erwartete Umstellung der viralen Polymerase auf Replikation (Mullin et al., 2004). Diese Ergebnisse stellen die bisherigen Modelle auf die Probe, nach denen NP entweder die Polymerase auf Replikation umschalten sollte oder zusammen mit der Polymerase als Stabilisator der Replikationsprodukte funktionieren sollte. Das NS2 Protein in seiner hier gezeigten Funktion als Regulator der RNA-Synthese könnte diese Erklärungslücke schließen.

Als nächster Schritt wäre es sinnvoll, die Wirkung der NS2 Expression auf die Synthese unterschiedlicher Segmente zu untersuchen, um die Regulation der gesamten RNA-Synthese besser zu verstehen.

Weiterhin wäre es wichtig, den physikalischen Mechanismus der Regulation durch NS2 eingehender zu untersuchen. Dazu sollte die durch Kopräzipitation festgestellte Interaktion des NS2 Proteins mit der viralen Polymerase durch weitere Studien belegt und genauer lokalisiert werden. Die Polymeraseuntereinheit PA wurde in Hierfür könnten die hier hergestellten Protein- und Virusmutanten verwendet werden. Eventuell wäre es auch sinnvoll, Deletionsmutanten des NS2 Proteins herzustellen.

Interessant wäre es auch, den Effekt der Infektions-Inhibition der in der Immunfluoreszenz beobachtet wurde abschließend zu untersuchen. Angedacht war hier eine durchflusszytometrische Analyse von transfizierten und anschließend infizierten Zellen, um den Effekt quantitativ zu bestimmen oder auszuschließen zu können.

Ein effizientes Mittel gegen Grippe ist die Impfung mit attenuierten Virusstämmen. Bisher sind für diese Art der Impfung nur kälteadaptierte Viren eingesetzt worden. Diese sind bei normalen Temperaturen nicht replikationsfähig, aber die dafür verantwortlichen Mechanismen sind bisher noch unbekannt. Für die gezielte Herstellung von attenuierten Lebend-Impfstämmen würden mehrere Mutationen eingebracht werden müssen, um das Revertieren zum virulenten Wildtyp zu verhindern. Einige der hier untersuchten hochkonservierten Positionen im NS2, z.B. die Mutanten M1, M2, M5 und M7, wären geeignete Kandidaten für solch attenuierende Mutationen.

5 Zusammenfassung

Die RNA-Synthese der Influenza Viren ist ein Schlüsselement der Virusreplikation. Während der Mechanismus der viralen RNA-Synthese aufgeklärt ist, wirft ihre Regulation nach wie vor Fragen auf. In der vorliegenden Arbeit konnte das NS2 Protein des Influenza A Virus als ein Regulatorprotein der viralen RNA Synthese charakterisiert werden. Die Expression des NS2 Proteins kann die Expression eines Reportergens durch die virale Polymerase dosisabhängig inhibieren. Dieser Effekt wurde mittels *Northern Blot* und *Primer Extension* Analysen auf die Inhibition der mRNA-Synthese der viralen Polymerase zurückgeführt. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass die Expression des NS2 Proteins die Synthese von cRNA und vRNA deutlich stimuliert. Eine ansteigende Menge des NS2 Proteins verringert also die Transkription viraler Gensegmente in mRNA Moleküle, während sie zugleich die Replikation dieser Gensegmente durch die virale Polymerase induziert.

Um den Mechanismus dieser Regulation aufzuklären, wurde nach potentiellen Interaktionspartnern des NS2 gesucht. In Immunpräzipitationen des NS2 Proteins aus Lysaten infizierter Zellen konnte die PA Untereinheit der viralen Polymerase identifiziert werden. Dies ist der erste Hinweis auf eine Interaktion des NS2 Proteins mit dem viralen Polymerasekomplex und diese Interaktion deutet auf einen möglichen Mechanismus für die Regulatorfunktion des NS2 Proteins hin.

Durch gezielte Mutagenese wurden konservierte Aminosäuren des NS2-Proteins verändert, um die strukturellen und funktionalen Bereiche für diese Regulation zu identifizieren. In Reporterstudien zeigten diese veränderten Proteine im Vergleich zum WT Protein einen deutlichen Funktionsverlust bezüglich der Inhibition der Reporterexpression. Einzige Ausnahme war die Doppelmutation M5 (R77A/W78A), die diese Funktion kaum beeinträchtigte. Der Funktionsverlust der Mutanten konnte mittels Primer Extension auf eine fehlende Inhibition der mRNA-Synthese zurückgeführt werden. Die Interaktion des NS2 Proteins mit dem Matrixprotein M1, die unter anderem über das betroffene Tryptophan an Position 78 (W78) stattfinden soll, scheint für die regulatorische Funktion keine tragende Rolle zu spielen. Die NS2-Mutante M1 (M19T/L21S) zeigte zwar einen deutlichen Funktionsverlust in der Inhibition der mRNA Synthese, aber die Stimulation der vRNA Synthese war nicht eingeschränkt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass

diese beiden regulatorischen Funktionen des NS2 Proteins sich durch Mutation separieren lassen, also in unterschiedlichen Bereichen des NS2 lokalisiert sein könnten. Die Herstellung von rekombinanten Influenza A Viren, welche die veränderten NS2 Proteine exprimieren, ermöglichte, die Auswirkung der Mutationen auf die virale Replikation zu untersuchen. Das Virus mit der Mutation M5 (R77A-W78A) in der vermutlichen M1-Interaktionsdomäne zeigte in der Regulation der RNA Synthese keinen Funktionsverlust, war aber in der Replikation im Hühnerei um drei Größenordnungen gegenüber dem WT attenuiert. Dies zeigt, zusammen mit den Reporterstudien, dass die NS2-M1 Interaktion für die Regulation der RNA Synthese keine Rolle spielt, im viralen Replikationszyklus jedoch wichtig ist. Zwei rekombinante Viren mit mutierten NS2 Proteinen konnten trotz mehrerer Versuche nicht erzeugt werden: Mutante M3 (L69S/Q71A) und Mutante M6 (L79A/I80A). Dies und die starke Attenuierung der rekombinanten Viren M1 (M19T/L21S), M2 (G53A/D54A), M5 (R77A/W78A) und M7 (E82A/V83A), weisen auf die wichtige Rolle des NS2 Proteins im viralen Replikationszyklus hin.

Zusammenfassend sei gesagt, dass die hier gezeigte Regulation der viralen RNA Synthese durch das NS2 Protein ein attraktives Modell darstellt, um die in der Literatur beobachtete Kinetik der RNA-Synthese des Influenza A Virus während des Infektionszyklus zu erklären.

6 Abstract

The RNA synthesis of RNA-viruses is a key factor in replication of these viruses. While the mechanism of RNA synthesis is well established, its regulation is still poorly understood. In this study the NS2 protein of an influenza A virus was characterised as a regulatory factor of viral RNA synthesis. It was demonstrated, that expression of an Influenza virus-like reportergene mediated by a recombinant virus polymerase was inhibited by expression of the NS2 Protein in a dose dependent manner. This effect was attributed to the inhibition of mRNA synthesis by northern blotting and primer extension assays. Simultaneously expression of NS2 stimulated synthesis of viral cRNA and vRNA. So on one hand increasing doses of NS2 protein inhibited the expression of viral gene segments, while on the other hand these doses concomitantly stimulated the replication of the same gene segments.

To elucidate the physical mechanisms of this regulation, a search for potential interactors of NS2 was conducted. Indeed the PA subunit of the viral polymerase was identified in lysates of infected cells precipitated with an NS2 antiserum. This is the first evidence of an interaction between NS2 and the trimeric polymerase complex and illustrates a possible regulating mechanism.

To identify the structural and functional regions that are important for regulation, conserved amino acids in the NS2 Protein were changed by site directed mutagenesis. Activity of the mutated proteins was analyzed by reportergene assays, in which most mutant proteins showed a loss of function concerning the inhibition of reportergene expression. An exception was the mutation M5 (R77A-W78A), which hardly affected the regulatory function. The loss of function was attributed to a deficiency in inhibition of mRNA synthesis by primer extension assays. The interaction of NS2 and the matrix protein M1, which is thought to be mediated by the tryptophan on position 78 (W78) of NS2, seems to be irrelevant for the regulatory function, since the NS2 Mutant M5 (R77/A-W78A) is not impaired. NS2 Mutant M1 (M19T/L21S) showed a clear loss of function concerning mRNA inhibition, but was otherwise not impaired in the stimulation of vRNA replication. This shows, that there are two separate regulatory functions that they might be located in different regions of the NS2 protein.

Production of recombinant influenza A viruses expressing the mutated proteins described above, facilitated the investigation of the mutated proteins impact on viral

replication. The virus containing mutation M5 showed no loss of function in RNA synthesis regulation, but was attenuated by 3 orders of magnitude when compared to the WT Virus. This demonstrates that the W78 is indeed important for the viral replication cycle. Even in multiple attempts, viruses carrying mutations M3 (L69S/Q71A) and M6 (L79A/I80A) in their NS2 Protein could not be rescued. This together with the strong attenuation of most of the recombinant viruses except M4 (E75A/I76A) and M7 (E82A/V83A), points out the importance of the NS2 protein in the viral lifecycle.

To sum up, new aspects in the regulation of viral RNA synthesis by the NS2 protein have been characterized in this study. This regulation of RNA synthesis by the NS2 protein represents an attractive model to explain the RNA kinetics observed during the replication cycle of influenza A viruses.

7 Abkürzungsverzeichnis

μ	mikro
A	Adenin
A	Ampere
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin 5'-triphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinder Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C-	Carboxy-(terminal)
c	zenti
ca.	zirka
CCD	<i>charged coupled device</i>
cDNA	<i>copy</i> / kodierte DNA
CMV	Zytomegalievirus
CO ₂	Kohlendioxid
cRNA	<i>copy/complementary RNA</i> . Vollständige, komplementäre Kopie der vRNA
C-terminal	carboxyterminal
CHO	Chinese Hamster Ovary
Ci	Curie (1 Ci = 3,7*10 ¹⁰ Bq)
CIP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i> , alkalische Phosphatase
d	Tag
Da	Dalton
DABCO	1,4-Diazabicyklo-[2,2,2]-oktan
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Deoxyribonukleosid-triphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immuno-sorbent assay</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , fötales Kälberserum
g	Gramm
G	Guanin
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
H ⁺	Hydrogenium-Ion
HA	Hämagglutinin
H ₂ O	Wasser

Abkürzungsverzeichnis

HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IB	Immunoblot
IF	Immunfluoreszenz
IP	Immunpräzipitation
k	kilo
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
m	milli
M	molar
M	Matrixprotein
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption/ionisation – time of flight</i> Massenspektrometer
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
min	Minute
MP	Milchpulver
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NA	Neuraminidase
NES	<i>nuclear export signal</i> , Kernexportsignal
NLS	<i>nuclear localization signal</i> , Kernlokalisierungssignal
NP	Nukleoprotein
NPC	<i>nuclear pore complex</i> , Kernporenkomplex
nm	Nanometer
ng	Nanogramm
NP	Nukleoprotein
NS	Nichtstrukturprotein
N-terminal	aminoterminal
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pen	Penicillin
pi	<i>post infection</i> , nach Infektion
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pfu	<i>plaque forming units</i>
pH	<i>potentia hydrogenii</i> , negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein-Komplex
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
ssRNA	„ <i>singlestranded RNA</i> “, einzelsträngige RNA
Strep	Streptomycin
T	Thymin
TBST	<i>tris buffered saline with tween</i>

Abkürzungsverzeichnis

TEMED	N,N,N',N',-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
ts	temperatursensitiv
U	<i>unit</i>
ÜN	über Nacht
ÜS	Überstand
V	Volt
VLP	<i>virus like particle</i>
vRNA	virale RNA
vRNP	viraler Ribonukleoprotein-komplex
WHO	<i>World Health Organisation</i>
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht

Aminosäuren

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

8 Literaturverzeichnis

- Akarsu, H., Burmeister, W.P., Petosa, C., Petit, I., Muller, C.W., Ruigrok, R.W. and Baudin, F. (2003) Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2). *Embo J*, **22**, 4646-4655.
- Alonso-Caplen, F.V. and Krug, R.M. (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**, 1092-1098.
- Aragon, T., de la Luna, S., Novoa, I., Carrasco, L., Ortin, J. and Nieto, A. (2000) Eukaryotic translation initiation factor 4GI is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus. *Mol Cell Biol*, **20**, 6259-6268.
- Area, E., Martin-Benito, J., Gastaminza, P., Torreira, E., Valpuesta, J.M., Carrascosa, J.L. and Ortin, J. (2004) 3D structure of the influenza virus polymerase complex: localization of subunit domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 308-313.
- Arnheiter, H., Davis, N.L., Wertz, G., Schubert, M. and Lazzarini, R.A. (1985) Role of the nucleocapsid protein in regulating vesicular stomatitis virus RNA synthesis. *Cell*, **41**, 259-267.
- Barrett, T., Wolstenholme, A.J. and Mahy, B.W. (1979) Transcription and replication of influenza virus RNA. *Virology*, **98**, 211-225.
- Baudin, F., Petit, I., Weissenhorn, W. and Ruigrok, R.W. (2001) In vitro dissection of the membrane and RNP binding activities of influenza virus M1 protein. *Virology*, **281**, 102-108.
- Beaton, A.R. and Krug, R.M. (1986) Transcription antitermination during influenza viral template RNA synthesis requires the nucleocapsid protein and the absence of a 5' capped end. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 6282-6286.
- Biswas, S.K., Boutz, P.L. and Nayak, D.P. (1998) Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins. *J Virol*, **72**, 5493-5501.
- Biswas, S.K. and Nayak, D.P. (1994) Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1. *J Virol*, **68**, 1819-1826.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Bui, M., Wills, E.G., Helenius, A. and Whittaker, G.R. (2000) Role of the influenza virus M1 protein in nuclear export of viral ribonucleoproteins. *J Virol*, **74**, 1781-1786.
- Bullido, R., Gomez-Puertas, P., Saiz, M.J. and Portela, A. (2001) Influenza A virus NEP (NS2 protein) downregulates RNA synthesis of model template RNAs. *J Virol*, **75**, 4912-4917.
- Carr, S.M., Carnero, E., Garcia-Sastre, A., Brownlee, G.G. and Fodor, E. (2006) Characterization of a mitochondrial-targeting signal in the PB2 protein of influenza viruses. *Virology*, **344**, 492-508.
- Chen, W., Calvo, P.A., Malide, D., Gibbs, J., Schubert, U., Bacik, I., Basta, S., O'Neill, R., Schickli, J., Palese, P., Henklein, P., Bennink, J.R. and Yewdell, J.W. (2001) A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med*, **7**, 1306-1312.
- Cianci, C., Tiley, L. and Krystal, M. (1995) Differential activation of the influenza virus polymerase via template RNA binding. *J Virol*, **69**, 3995-3999.
- Connor, R.J., Kawaoka, Y., Webster, R.G. and Paulson, J.C. (1994) Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology*, **205**, 17-23.
- Cooper, P.D. (1961) The plaque assay of animal viruses. *Adv Virus Res*, **8**, 319-378.

- de Jong, M.D., Simmons, C.P., Thanh, T.T., Hien, V.M., Smith, G.J., Chau, T.N., Hoang, D.M., Chau, N.V., Khanh, T.H., Dong, V.C., Qui, P.T., Cam, B.V., Ha do, Q., Guan, Y., Peiris, J.S., Chinh, N.T., Hien, T.T. and Farrar, J. (2006) Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med*, **12**, 1203-1207.
- Digard, P., Blok, V.C. and Inglis, S.C. (1989) Complex formation between influenza virus polymerase proteins expressed in *Xenopus* oocytes. *Virology*, **171**, 162-169.
- Digard, P., Elton, D., Bishop, K., Medcalf, E., Weeds, A. and Pope, B. (1999) Modulation of nuclear localization of the influenza virus nucleoprotein through interaction with actin filaments. *J Virol*, **73**, 2222-2231.
- Elton, D., Simpson-Holley, M., Archer, K., Medcalf, L., Hallam, R., McCauley, J. and Digard, P. (2001) Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. *J Virol*, **75**, 408-419.
- Enami, K., Sato, T.A., Nakada, S. and Enami, M. (1994) Influenza virus NS1 protein stimulates translation of the M1 protein. *J Virol*, **68**, 1432-1437.
- Engelhardt, O.G., Smith, M. and Fodor, E. (2005) Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II. *J Virol*, **79**, 5812-5818.
- Fodor, E., Crow, M., Mingay, L.J., Deng, T., Sharps, J., Fechter, P. and Brownlee, G.G. (2002) A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase inhibits endonucleolytic cleavage of capped RNAs. *J Virol*, **76**, 8989-9001.
- Fodor, E., Palese, P., Brownlee, G.G. and Garcia-Sastre, A. (1998) Attenuation of influenza A virus mRNA levels by promoter mutations. *J Virol*, **72**, 6283-6290.
- Fodor, E., Pritlove, D.C. and Brownlee, G.G. (1994) The influenza virus panhandle is involved in the initiation of transcription. *J Virol*, **68**, 4092-4096.
- Gamblin, S.J., Haire, L.F., Russell, R.J., Stevens, D.J., Xiao, B., Ha, Y., Vasisht, N., Steinhauer, D.A., Daniels, R.S., Elliot, A., Wiley, D.C. and Skehel, J.J. (2004) The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin. *Science*, **303**, 1838-1842.
- Garaigorta, U. and Ortin, J. (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**, 4573-4582.
- Garcia-Robles, I., Akarsu, H., Muller, C.W., Ruigrok, R.W. and Baudin, F. (2005) Interaction of influenza virus proteins with nucleosomes. *Virology*, **332**, 329-336.
- Garcia-Sastre, A., Egorov, A., Matassov, D., Brandt, S., Levy, D.E., Durbin, J.E., Palese, P. and Muster, T. (1998) Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology*, **252**, 324-330.
- Gastaminza, P., Perales, B., Falcon, A.M. and Ortin, J. (2003) Mutations in the N-terminal region of influenza virus PB2 protein affect virus RNA replication but not transcription. *J Virol*, **77**, 5098-5108.
- Gonzalez, S. and Ortin, J. (1999) Distinct regions of influenza virus PB1 polymerase subunit recognize vRNA and cRNA templates. *Embo J*, **18**, 3767-3775.
- Greenspan, D., Krystal, M., Nakada, S., Arnheiter, H., Lyles, D.S. and Palese, P. (1985) Expression of influenza virus NS2 nonstructural protein in bacteria and localization of NS2 in infected eucaryotic cells. *J Virol*, **54**, 833-843.
- Hao, L., Sakurai, A., Watanabe, T., Sorensen, E., Nidom, C.A., Newton, M.A., Ahlquist, P. and Kawaoka, Y. (2008) Drosophila RNAi screen identifies host genes important for influenza virus replication. *Nature*, **454**, 890-893.

- Hatada, E., Hasegawa, M., Mukaigawa, J., Shimizu, K. and Fukuda, R. (1989) Control of influenza virus gene expression: quantitative analysis of each viral RNA species in infected cells. *J Biochem (Tokyo)*, **105**, 537-546.
- Hay, A.J., Lomniczi, B., Bellamy, A.R. and Skehel, J.J. (1977) Transcription of the influenza virus genome. *Virology*, **83**, 337-355.
- Hay, A.J., Skehel, J.J. and McCauley, J. (1982) Characterization of influenza virus RNA complete transcripts. *Virology*, **116**, 517-522.
- Herz, C., Stavnezer, E., Krug, R. and Gurney, T., Jr. (1981) Influenza virus, an RNA virus, synthesizes its messenger RNA in the nucleus of infected cells. *Cell*, **26**, 391-400.
- Hinshaw, V.S., Olsen, C.W., Dybdahl-Sissoko, N. and Evans, D. (1994) Apoptosis: a mechanism of cell killing by influenza A and B viruses. *J Virol*, **68**, 3667-3673.
- Honda, A., Endo, A., Mizumoto, K. and Ishihama, A. (2001) Differential roles of viral RNA and cRNA in functional modulation of the influenza virus RNA polymerase. *J Biol Chem*, **276**, 31179-31185.
- Honda, A., Ueda, K., Nagata, K. and Ishihama, A. (1988) RNA polymerase of influenza virus: role of NP in RNA chain elongation. *J Biochem*, **104**, 1021-1026.
- Hsu, M.T., Parvin, J.D., Gupta, S., Krystal, M. and Palese, P. (1987) Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal panhandle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 8140-8144.
- Huang, T.S., Palese, P. and Krystal, M. (1990) Determination of influenza virus proteins required for genome replication. *J Virol*, **64**, 5669-5673.
- Huang, X., Liu, T., Muller, J., Levandowski, R.A. and Ye, Z. (2001) Effect of influenza virus matrix protein and viral RNA on ribonucleoprotein formation and nuclear export. *Virology*, **287**, 405-416.
- Huarte, M., Falcon, A., Nakaya, Y., Ortin, J., Garcia-Sastre, A. and Nieto, A. (2003) Threonine 157 of influenza virus PA polymerase subunit modulates RNA replication in infectious viruses. *J Virol*, **77**, 6007-6013.
- Huarte, M., Sanz-Ezquerro, J.J., Roncal, F., Ortin, J. and Nieto, A. (2001) PA subunit from influenza virus polymerase complex interacts with a cellular protein with homology to a family of transcriptional activators. *J Virol*, **75**, 8597-8604.
- Imai, M., Watanabe, S. and Odagiri, T. (2003) Influenza B virus NS2, a nuclear export protein, directly associates with the viral ribonucleoprotein complex. *Arch Virol*, **148**, 1873-1884.
- Inglis, S.C. and Mahy, B.W. (1979) Polypeptides specified by the influenza virus genome. 3. Control of synthesis in infected cells. *Virology*, **95**, 154-164.
- Ishihama, A. and Barbier, P. (1994) Molecular anatomy of viral RNA-directed RNA polymerases. *Arch Virol*, **134**, 235-258.
- Kawaguchi, A. and Nagata, K. (2007) De novo replication of the influenza virus RNA genome is regulated by DNA replicative helicase, MCM. *Embo J*, **26**, 4566-4575.
- Kawaguchi, A., Naito, T. and Nagata, K. (2005) Involvement of influenza virus PA subunit in assembly of functional RNA polymerase complexes. *J Virol*, **79**, 732-744.
- Klumpp, K., Ruigrok, R.W. and Baudin, F. (1997) Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure. *Embo J*, **16**, 1248-1257.
- Krug, R.M., Ueda, M. and Palese, P. (1975) Temperature-sensitive mutants of influenza WSN virus defective in virus-specific RNA synthesis. *J Virol*, **16**, 790-796.
- Lamb, R.A. and Choppin, P.W. (1976) Synthesis of influenza virus proteins in infected cells: translation of viral polypeptides, including three P polypeptides, from RNA produced by primary transcription. *Virology*, **74**, 504-519.
- Lamb, R.A., Etkind, P.R. and Choppin, P.W. (1978) Evidence for a ninth influenza viral polypeptide. *Virology*, **91**, 60-78.

- Lamb, R.A. and Lai, C.J. (1980) Sequence of interrupted and uninterrupted mRNAs and cloned DNA coding for the two overlapping nonstructural proteins of influenza virus. *Cell*, **21**, 475-485.
- Lamb, R.A. and Lai, C.J. (1984) Expression of unspliced NS1 mRNA, spliced NS2 mRNA, and a spliced chimera mRNA from cloned influenza virus NS DNA in an SV40 vector. *Virology*, **135**, 139-147.
- Latham, T. and Galarza, J.M. (2001) Formation of wild-type and chimeric influenza virus-like particles following simultaneous expression of only four structural proteins. *J Virol*, **75**, 6154-6165.
- Lee, K.H. and Seong, B.L. (1998) The position 4 nucleotide at the 3' end of the influenza virus neuraminidase vRNA is involved in temporal regulation of transcription and replication of neuraminidase RNAs and affects the repertoire of influenza virus surface antigens. *J Gen Virol*, **79 (Pt 8)**, 1923-1934.
- Li, M.L., Rao, P. and Krug, R.M. (2001) The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits. *Embo J*, **20**, 2078-2086.
- Li, X.L., Boyanapalli, M., Weihua, X., Kalvakolanu, D.V. and Hassel, B.A. (1998) Induction of interferon synthesis and activation of interferon-stimulated genes by liposomal transfection reagents. *J Interferon Cytokine Res*, **18**, 947-952.
- Lommer, B.S. and Luo, M. (2002) Structural plasticity in influenza virus protein NS2 (NEP). *J Biol Chem*, **277**, 7108-7117.
- Ludwig, S., Wang, X., Ehrhardt, C., Zheng, H., Donelan, N., Planz, O., Pleschka, S., Garcia-Sastre, A., Heins, G. and Wolff, T. (2002) The influenza A virus NS1 protein inhibits activation of Jun N-terminal kinase and AP-1 transcription factors. *J Virol*, **76**, 11166-11171.
- Maier, H.J., Kashiwagi, T., Hara, K. and Brownlee, G.G. (2008) Differential role of the influenza A virus polymerase PA subunit for vRNA and cRNA promoter binding. *Virology*, **370**, 194-204.
- Martin, K. and Helenius, A. (1991) Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell*, **67**, 117-130.
- Matrosovich, M., Matrosovich, T., Garten, W. and Klenk, H.D. (2006) New low-viscosity overlay medium for viral plaque assays. *Virol J*, **3**, 63.
- Mayer, D., Molawi, K., Martinez-Sobrido, L., Ghanem, A., Thomas, S., Baginsky, S., Grossmann, J., Garcia-Sastre, A. and Schwemmle, M. (2007) Identification of cellular interaction partners of the influenza virus ribonucleoprotein complex and polymerase complex using proteomic-based approaches. *J Proteome Res*, **6**, 672-682.
- Mena, I., Jambriana, E., Albo, C., Perales, B., Ortin, J., Arrese, M., Vallejo, D. and Portela, A. (1999) Mutational analysis of influenza A virus nucleoprotein: identification of mutations that affect RNA replication. *J Virol*, **73**, 1186-1194.
- Mereckiene, J., Cotter, S., Weber, J.T., Nicoll, A., Levy-Bruhl, D., Ferro, A., Tridente, G., Zanoni, G., Berra, P., Salmaso, S. and O'Flanagan, D. (2008) Low coverage of seasonal influenza vaccination in the elderly in many European countries. *Euro Surveill*, **13**.
- Min, J.Y., Li, S., Sen, G.C. and Krug, R.M. (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**, 236-243.
- Momose, F., Basler, C.F., O'Neill, R.E., Iwamatsu, A., Palese, P. and Nagata, K. (2001) Cellular splicing factor RAF-2p48/NPI-5/BAT1/UAP56 interacts with the influenza virus nucleoprotein and enhances viral RNA synthesis. *J Virol*, **75**, 1899-1908.

- Momose, F., Naito, T., Yano, K., Sugimoto, S., Morikawa, Y. and Nagata, K. (2002) Identification of Hsp90 as a stimulatory host factor involved in influenza virus RNA synthesis. *J Biol Chem*, **277**, 45306-45314.
- Mukaigawa, J. and Nayak, D.P. (1991) Two signals mediate nuclear localization of influenza virus (A/WSN/33) polymerase basic protein 2. *J Virol*, **65**, 245-253.
- Mullin, A.E., Dalton, R.M., Amorim, M.J., Elton, D. and Digard, P. (2004) Increased amounts of the influenza virus nucleoprotein do not promote higher levels of viral genome replication. *J Gen Virol*, **85**, 3689-3698.
- Naffakh, N., Massin, P. and van der Werf, S. (2001) The transcription/replication activity of the polymerase of influenza A viruses is not correlated with the level of proteolysis induced by the PA subunit. *Virology*, **285**, 244-252.
- Naito, T., Kiyasu, Y., Sugiyama, K., Kimura, A., Nakano, R., Matsukage, A. and Nagata, K. (2007) An influenza virus replicon system in yeast identified Tat-SF1 as a stimulatory host factor for viral RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 18235-18240.
- Nakagawa, Y., Kimura, N., Toyoda, T., Mizumoto, K., Ishihama, A., Oda, K. and Nakada, S. (1995) The RNA polymerase PB2 subunit is not required for replication of the influenza virus genome but is involved in capped mRNA synthesis. *J Virol*, **69**, 728-733.
- Neumann, G., Hughes, M.T. and Kawaoka, Y. (2000) Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *Embo J*, **19**, 6751-6758.
- Newcomb, L.L., Kuo, R.L., Ye, Q., Jiang, Y., Tao, Y.J. and Krug, R.M. (2008) Interaction of the influenza A virus nucleocapsid protein with the viral RNA polymerase potentiates unprimed viral RNA replication. *J Virol*.
- Niwa, T., Yoshizumi, H., Emoto, Y., Miyazaki, T., Hashimoto, N., Takeda, N., Tatematsu, A. and Maeda, K. (1991) Accumulation of quinolinic acid in uremic serum and its removal by hemodialysis. *Clin Chem*, **37**, 159-161.
- O'Neill, R.E., Talon, J. and Palese, P. (1998) The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *Embo J*, **17**, 288-296.
- Odagiri, T. and Tashiro, M. (1997) Segment-specific noncoding sequences of the influenza virus genome RNA are involved in the specific competition between defective interfering RNA and its progenitor RNA segment at the virion assembly step. *J Virol*, **71**, 2138-2145.
- Odagiri, T. and Tobita, K. (1990) Mutation in NS2, a nonstructural protein of influenza A virus, extragenetically causes aberrant replication and expression of the PA gene and leads to generation of defective interfering particles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 5988-5992.
- Odagiri, T., Tominaga, K., Tobita, K. and Ohta, S. (1994) An amino acid change in the non-structural NS2 protein of an influenza A virus mutant is responsible for the generation of defective interfering (DI) particles by amplifying DI RNAs and suppressing complementary RNA synthesis. *J Gen Virol*, **75 (Pt 1)**, 43-53.
- Olsen, D.B., Benseler, F., Cole, J.L., Stahlhut, M.W., Dempski, R.E., Darke, P.L. and Kuo, L.C. (1996) Elucidation of basic mechanistic and kinetic properties of influenza endonuclease using chemically synthesized RNAs. *J Biol Chem*, **271**, 7435-7439.
- Opitz, B., Rejaibi, A., Dauber, B., Eckhard, J., Vinzing, M., Schmeck, B., Hippenstiel, S., Suttorp, N. and Wolff, T. (2007) IFNbeta induction by influenza A virus is mediated by RIG-I which is regulated by the viral NS1 protein. *Cell Microbiol*, **9**, 930-938.
- Ortega, J., Martin-Benito, J., Zurcher, T., Valpuesta, J.M., Carrascosa, J.L. and Ortin, J. (2000) Ultrastructural and functional analyses of recombinant influenza virus

- ribonucleoproteins suggest dimerization of nucleoprotein during virus amplification. *J Virol*, **74**, 156-163.
- Palese, P. and Shaw, M. (2006) Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. In al., D.M.K.e. (ed.), *Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Vol. 2, p. 1655.
- Palese, P., Tobita, K., Ueda, M. and Compans, R.W. (1974) Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology*, **61**, 397-410.
- Paragas, J., Talon, J., O'Neill, R.E., Anderson, D.K., Garcia-Sastre, A. and Palese, P. (2001) Influenza B and C virus NEP (NS2) proteins possess nuclear export activities. *J Virol*, **75**, 7375-7383.
- Perez, D.R. and Donis, R.O. (1998) The matrix 1 protein of influenza A virus inhibits the transcriptase activity of a model influenza reporter genome in vivo. *Virology*, **249**, 52-61.
- Pleschka, S., Jaskunas, R., Engelhardt, O.G., Zurcher, T., Palese, P. and Garcia-Sastre, A. (1996) A plasmid-based reverse genetics system for influenza A virus. *J Virol*, **70**, 4188-4192.
- Pleschka, S., Wolff, T., Ehrhardt, C., Hobom, G., Planz, O., Rapp, U.R. and Ludwig, S. (2001) Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade. *Nat Cell Biol*, **3**, 301-305.
- Plotch, S.J., Bouloy, M., Ulmanen, I. and Krug, R.M. (1981) A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell*, **23**, 847-858.
- Poole, E., Elton, D., Medcalf, L. and Digard, P. (2004) Functional domains of the influenza A virus PB2 protein: identification of NP- and PB1-binding sites. *Virology*, **321**, 120-133.
- Portela, A. and Digard, P. (2002) The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol*, **83**, 723-734.
- Potter, C.W. and Oxford, J.S. (1979) Determinants of immunity to influenza infection in man. *Br Med Bull*, **35**, 69-75.
- Richardson, J.C. and Akkina, R.K. (1991) NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells. *Arch Virol*, **116**, 69-80.
- Richman, D.D., Murphy, B.R., Baron, S. and Uhlenhof, C. (1976) Three strains of influenza A virus (H3N2): interferon sensitivity in vitro and interferon production in volunteers. *J Clin Microbiol*, **3**, 223-226.
- Robertson, J.S. (1979) 5' and 3' terminal nucleotide sequences of the RNA genome segments of influenza virus. *Nucleic Acids Res*, **6**, 3745-3757.
- Rodriguez, A., Perez-Gonzalez, A. and Nieto, A. (2007) Influenza virus infection causes specific degradation of the largest subunit of cellular RNA polymerase II. *J Virol*, **81**, 5315-5324.
- Ruigrok, R.W. and Baudin, F. (1995) Structure of influenza virus ribonucleoprotein particles. II. Purified RNA-free influenza virus ribonucleoprotein forms structures that are indistinguishable from the intact influenza virus ribonucleoprotein particles. *J Gen Virol*, **76 (Pt 4)**, 1009-1014.
- Samuel, C.E. (2001) Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev*, **14**, 778-809, table of contents.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Sanz-Ezquerro, J.J., de la Luna, S., Ortin, J. and Nieto, A. (1995) Individual expression of influenza virus PA protein induces degradation of coexpressed proteins. *J Virol*, **69**, 2420-2426.

- Schmitt, A.P. and Lamb, R.A. (2005) Influenza virus assembly and budding at the viral budzone. *Adv Virus Res*, **64**, 383-416.
- Shapiro, G.I., Gurney, T., Jr. and Krug, R.M. (1987) Influenza virus gene expression: control mechanisms at early and late times of infection and nuclear-cytoplasmic transport of virus-specific RNAs. *J Virol*, **61**, 764-773.
- Shapiro, G.I. and Krug, R.M. (1988) Influenza virus RNA replication in vitro: synthesis of viral template RNAs and virion RNAs in the absence of an added primer. *J Virol*, **62**, 2285-2290.
- Shaw, M.L., Stone, K.L., Colangelo, C.M., Gulcicek, E.E. and Palese, P. (2008) Cellular proteins in influenza virus particles. *PLoS Pathog*, **4**, e1000085.
- Sieczkarski, S.B. and Whittaker, G.R. (2002) Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis. *J Virol*, **76**, 10455-10464.
- Stegmann, T. (2000) Membrane fusion mechanisms: the influenza hemagglutinin paradigm and its implications for intracellular fusion. *Traffic*, **1**, 598-604.
- Thierry, F. and Danos, O. (1982) Use of specific single stranded DNA probes cloned in M13 to study the RNA synthesis of four temperature-sensitive mutants of HK/68 influenza virus. *Nucleic Acids Res*, **10**, 2925-2938.
- Vreede, F.T. and Brownlee, G.G. (2007) Influenza virion-derived viral ribonucleoproteins synthesize both mRNA and cRNA in vitro. *J Virol*, **81**, 2196-2204.
- Vreede, F.T., Jung, T.E. and Brownlee, G.G. (2004) Model suggesting that replication of influenza virus is regulated by stabilization of replicative intermediates. *J Virol*, **78**, 9568-9572.
- Wagner, R., Matrosovich, M. and Klenk, H.D. (2002) Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Rev Med Virol*, **12**, 159-166.
- Ward, A.C., Castelli, L.A., Lucantoni, A.C., White, J.F., Azad, A.A. and Macreadie, I.G. (1995) Expression and analysis of the NS2 protein of influenza A virus. *Arch Virol*, **140**, 2067-2073.
- Whittaker, G., Bui, M. and Helenius, A. (1996) Nuclear trafficking of influenza virus ribonucleoproteins in heterokaryons. *J Virol*, **70**, 2743-2756.
- Wright, P., Neumann, G. and Kawaoka, Y. (2006) Orthomyxoviruses. In al., D.M.K.e. (ed.), *Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Vol. 2, p. 1691.
- Wu, W.W., Weaver, L.L. and Pante, N. (2007) Ultrastructural analysis of the nuclear localization sequences on influenza A ribonucleoprotein complexes. *J Mol Biol*, **374**, 910-916.
- Yasuda, J., Nakada, S., Kato, A., Toyoda, T. and Ishihama, A. (1993) Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix. *Virology*, **196**, 249-255.
- Zebedee, S.L. and Lamb, R.A. (1988) Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *J Virol*, **62**, 2762-2772.
- Zheng, H., Palese, P. and Garcia-Sastre, A. (1996) Nonconserved nucleotides at the 3' and 5' ends of an influenza A virus RNA play an important role in viral RNA replication. *Virology*, **217**, 242-251.
- Zvonarjev, A.Y. and Ghendon, Y.Z. (1980) Influence of membrane (M) protein on influenza A virus virion transcriptase activity in vitro and its susceptibility to rimantadine. *J Virol*, **33**, 583-586.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig und unter ausschließlicher Verwendung der angeführten Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht.

Berlin, 28.11.2008