



# Induktion und Blockade des Typ I Interferonsystems durch Influenza A Viren des Subtyps H5N1

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I Biowissenschaften

der



MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT  
HALLE-WITTENBERG

von

Herrn Markus Matthaei,

geboren am 27.07.1979

in Frankfurt (Oder)

Gutachter:

1. Prof. Dr. Sven-Erik Behrens
2. PD. Dr. Thorsten Wolff
3. Prof. Dr. Stephan Ludwig

Halle (Saale), den 15.10.2010



# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>III</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Inflenzaviren</b>	<b>1</b>
1.1.1 Aufbau von Influenza A Viren	2
1.1.2 Replikation der Influenza A Viren	3
1.1.3 Pathogenese saisonaler Influenza A Viren	6
<b>1.2 Die nicht-adaptive Immunantwort</b>	<b>7</b>
1.2.1 Das Typ I Interferonsystem	7
1.2.2 Erkennung von Pathogenen durch das nicht-adaptive Immunsystem	8
1.2.2.1 Die Typ I IFN-induzierte Immunantwort auf Influenzavirusinfektionen	10
1.2.2.2 Modulation der nicht-adaptiven Immunantwort durch Influenza A Viren	13
<b>1.3 Influenzavirus-Pandemien und ihre Entstehung</b>	<b>14</b>
1.3.1 Antivirale Therapie und Prophylaxe	16
1.3.2 Charakteristika zoonotischer Influenza A Viren des Subtyps H5N1	17
<b>1.4 Fragestellung</b>	<b>20</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>22</b>
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	22
2.1.2 Verwendete Zellen	23
2.1.3 Influenzavirusstämme	24
2.1.4 Bakterienstämme	24
2.1.5 Medien für Bakterien	24
2.1.6 Enzyme	25
2.1.7 Kits	25
2.1.8 Plasmide	25
2.1.9 Oligonukleotide	26
2.1.10 Antikörper	26
2.1.11 Puffer und Lösungen	27
2.1.12 Geräte	27
2.1.13 Software	28
<b>2.2 Methoden</b>	<b>29</b>
2.2.1 Zellkultur	29
2.2.1.1 Kultur der permanenten Zelllinien und NHBE-Zellen	29
2.2.1.2 Präparation und Haltung humaner Makrophagen	29
2.2.1.3 Kultur der humanen Lungengewebsbiopsien	30
2.2.1.4 Transfektion eukaryotischer Zellen	30
2.2.2 Arbeiten mit Influenza A Viren	31
2.2.2.1 Infektion von eukaryotischen Zellen mit Influenza A Viren	31
2.2.2.2 Virusanzucht im Hühnerei, VERO- und MDCK-Zellen	33
2.2.2.3 Titerbestimmung von Influenzaviren mittels Plaquetest	33
2.2.2.4 Herstellung reassortanter Influenza A Viren	34
2.2.3 Molekularbiologische Methoden	35
2.2.3.1 Reverse Transkription	35
2.2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)	35
2.2.3.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel	35
2.2.3.4 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> durch Hitzeschock	36
2.2.3.5 Plasmidpräparation	36
2.2.3.6 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	36
2.2.3.7 DNA-Sequenzierung nach Sanger	36
2.2.3.8 Herstellung von H5N1-NS-Segment-enthaltenden pHW2000-Plasmiden	37
2.2.3.9 vRNA-Transfektionsexperimente und <i>real time</i> -PCR-Versuche	38

2.2.4	Proteinbiochemische Methoden	39
2.2.4.1	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	39
2.2.4.2	Western Blot	40
2.2.4.3	Multiplex-ELISA und IFN $\beta$ -ELISA	40
2.2.4.4	Reportergenstudien	41
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>42</b>
<b>3.1</b>	<b>Vermehrung und Typ I IFN-Induktion der H5N1-Viren in humanen Zellen</b>	<b>42</b>
3.1.1	Vermehrungsfähigkeit der H5N1-Influenzaviren in A549-Zellen	43
3.1.2	Monozyklische Vermehrung der H5N1-Influenzaviren in A549-Zellen	44
3.1.3	IFN $\beta$ -Sekretion Influenza A Virus-infizierter A549-Zellen	46
3.1.4	Vermehrungsfähigkeit der H5N1-Influenzaviren in Calu-3-Zellen	47
3.1.5	Typ I IFN-Sekretion Influenza A Virus-infizierter Calu-3-Zellen	48
3.1.6	Virale Vermehrungsfähigkeit in primären humanen Zellen und Lungengeweben	49
3.1.7	Typ I IFN-Sekretion H5N1-Virus-infizierter humaner Makrophagenpräparationen	52
3.1.8	Untersuchung der Zytokinsekretion Influenza A Virus-infizierter Zellen	55
<b>3.2</b>	<b>Das Typ I IFN-System reduziert die Vermehrung der H5N1-Isolate</b>	<b>60</b>
3.2.1	Vermehrung der H5N1-Viren in Typ I IFN-defizienten VERO-Zellen	60
3.2.2	Vermehrung der H5N1-Viren in Typ I IFN-vorbehandelten Zellen	61
<b>3.3</b>	<b>Die Aktivierung des Typ I IFN-Systems durch die H5N1-Isolate</b>	<b>65</b>
3.3.1	Analyse der Primärstruktur der viralen Proteine	66
3.3.2	Aktivierung von PKR durch die untersuchten Influenza A Viren	69
3.3.3	Die H5N1-Isolate aktivieren RIG-I abhängig das humane Typ I IFN-System	70
<b>3.4</b>	<b>Funktionalität der H5N1-NS1-Proteine in humanen Zellen</b>	<b>73</b>
3.4.1	Primärstrukturvergleich der verschiedenen NS1-Proteine	74
3.4.2	Herstellung und Analyse von Pan/99 x H5N1-NS-Reassortanten	75
3.4.3	Vermehrungsfähigkeit reassortanter Pan/99 x H5N1-NS-Viren	76
3.4.3.1	Vermehrung der reassortanten Viren in A549-Zellen	76
3.4.3.2	Vermehrung der reassortanten Viren in Calu-3-Zellen	78
3.4.3.3	Vermehrung der reassortanten Viren in VERO-Zellen	79
3.4.3.4	Vermehrung der reassortanten Viren in humanen Lungengeweben	80
3.4.4	IFN $\beta$ -Sekretion von mit den H5N1-NS-Reassortanten infizierten Zellen	81
3.4.5	Inhibition der Aktivierung des humanen IFN $\beta$ -Promotors durch die NS1-Proteine	83
<b>3.5</b>	<b>Mögliche Ursachen für die starke Aktivierung des RIG-I-Signalweges durch die aviären H5N1-Isolate</b>	<b>84</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>87</b>
<b>4.1</b>	<b>Vermehrungsfähigkeit und Typ I IFN-Induktion der H5N1-Stämme in humanen Zellen</b>	<b>89</b>
<b>4.2</b>	<b>Mechanismen der Induktion und Blockade des Typ I IFN-Systems durch die H5N1-Stämme</b>	<b>94</b>
<b>4.3</b>	<b>Humane H5N1-Isolate lösen keine stärkere Zytokinsekretion in homogenen Zellkulturen aus</b>	<b>98</b>
<b>4.4</b>	<b>Mögliche Erklärungen für die unterschiedlich starke Typ I IFN-Induktion der aviären und humanen H5N1-Isolate</b>	<b>100</b>
<b>4.5</b>	<b>Ergebnis dieser Arbeit</b>	<b>104</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>107</b>
	<b>ANHANG</b>	<b>I</b>
	Literatur	I
	Sequenzdaten der untersuchten H5N1-Isolate	XIII
	Danksagung	XXVIII
	Tabellarischer Lebenslauf	XXIX
	Eidesstattliche Versicherung	XXX
	Publikationen, Tagungsbeiträge und Förderung	XXXI

# Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
5'-m7G	7-Methylguanidin-Kappe am 5'-Ende der mRNA
5'-PPP-RNA	5'-triphosphorylierte RNA
A	Ampere
AP-1	dimerer Komplex von Jun- und Fos-Genprodukten
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BA	bovines Albumin
BSA	bovines Serumalbumin
C-terminal	Carboxy-terminal
cDNA	( <i>copy/complementary</i> ) DNA
CIAP	Alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm
CPSF30	<i>Cleavage and polyadenylation specificity factor 30</i>
cRNA	( <i>copy/complementary</i> ) RNA
d	Tag(e)
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
ddNTP	2'-Dideoxyribonukleotidtriphosphat(e)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	2'-Desoxyribonukleinsäure
dNTP(s)	2'-Desoxyribonukleotidtriphosphat(-mix)
ds	doppelsträngig ( <i>double stranded</i> )
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF2 $\alpha$	eukaryotischer Initiationsfaktor-2 $\alpha$
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	und andere ( <i>et alteri</i> )
FACS	Durchflusszytometrie ( <i>fluorescence activated/assisted cell sorting</i> )
FBS	fötales Rinderserum
g	Gramm
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HLH	Hämophagozytische Lymphohistiozytose
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
IFN	Interferon
IL	Interleukin
I- $\kappa$ B	Inhibitor von NF- $\kappa$ B
IKK	Inhibitor von NF- $\kappa$ B-Kinase
IP-10	<i>IFN<math>\gamma</math>-inducible protein, CXCL10</i>
IPS-1	Interferon $\beta$ -Promotor Stimulator 1
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -Thiogalactopyranidose
IRF-3	Interferon regulierender Faktor 3

ISG	Interferon stimulierte(s) Gen(e)
ISGF-3	Interferon stimulierter Genfaktor-3
ISRE	DNA-Motiv über das Gene nach IFN-Stimulation aktiviert werden
l	Liter
LB	Luria Bertani
LSM	Lymphozytenseparationsmedium
μ	mikro
m	milli
M	molar (mol/l)
M1 und 2	Matrixprotein 1 und 2
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1, CCL2</i>
MDA-5	<i>Myeloma differentiation associated</i> Genprodukt 5
MDCK	Madin-Darby Hundenieren(-Zellen)
MEM	Minimal erforderliches Medium ( <i>minimal essential medium</i> )
MIG	<i>Monokine induced by gamma interferon, CXCL9</i>
min	Minute
MIP-1β	<i>Macrophage inflammatory protein 1-beta, CCL4</i>
Mock	Blindwert, Negativkontrolle
moi	Multiplizität der Infektion (Viren (pfu)/Zelle)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MxA	<i>Myxovirus (influenza virus) resistance A</i>
N-terminal	Amino-terminal
N	Anzahl Versuche
NA	Neuraminidase
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCR	nichtkodierende Region ( <i>non-coding region</i> )
NEP	Kernexportprotein (alternative Bezeichnung für NS2)
NES	Kernexportsignal ( <i>nuclear export signal</i> )
NF-κB	Nukleärer Faktor-κB
NHBE	primäre humane bronchioläre Epithelzellen
NLR	NOD-ähnliche Rezeptoren
nm	Nanometer
NP	Nukleoprotein
Nt	Nukleotid(e)
NS1 und 2	Nichtstrukturprotein 1 und 2
OAS	Oligoadenylatsynthetase 1 und 2
OD	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
p	pico
PA	saures ( <i>acidic</i> ) Polymeraseprotein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PB1 und 2	basische Polymeraseproteine 1 und 2
PB1-F2	Produkt des 2. Leserahmens ( <i>frame</i> ) im PB1-Segment
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pen/Strep	Penizillin/Streptomycin
pfu	Plaque-bildende Einheiten

PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PKR	RNA-abhängige Proteinkinase R
PRR	Pathogen-, oder PAMP-erkennender Rezeptor
RANTES	<i>Regulated on activation normally T-cell expressed and secreted, CCL5</i>
RIG-I	<i>Retinnoic acid inducible gene product I</i>
RKI	Robert Koch-Institut
RLR	RIG-I-ähnliche Rezeptoren
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoproteinkomplex
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardabweichung der Mittelwerte
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SOCS	<i>Suppressor of cytokine signalling</i>
ss	einzelsträngig ( <i>single stranded</i> )
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TBE	Tris/Borsäure/EDTA-Puffer
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
TLR	Toll-ähnliche Rezeptoren
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
TPCK	Tosyl-L-phenylalaninchlormethylketon
TRIM25	Ring-, Zink-Finger- und <i>coiled-coil (tripartite)</i> -Motiv enthaltendes Protein 25
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton-X100	t-Octylphenoxyethoxyethanol
U	Enzymeinheit ( <i>unit</i> )
UV	ultraviolett
V	Volt
vRNA	virale RNA
vRNP	viraler Ribonukleoproteinkomplex
WHO	Weltgesundheitsorganisation
wt	wildtyp



# 1 Einleitung

Alle Lebewesen sind ständig Pathogenen, wie Viren, Bakterien, Pilzen und Würmern, ausgesetzt. Wirbeltiere verteidigen sich gegen diese Pathogene durch ein nicht-adaptives und ein adaptives Immunsystem. Das adaptive (erworbene) Immunsystem agiert pathogenspezifisch über spezifische T- und B-Zellrezeptoren, beziehungsweise Antikörper. Gegen Pathogene, die dem Wirt unbekannt sind, müssen diese spezifischen Rezeptoren erst gebildet werden. Das nicht-adaptive (angeborene) Immunsystem bildet in diesem Fall die erste Verteidigungslinie gegen eindringende Pathogene.

Viren sind obligat intrazelluläre Parasiten, deren kleinste infektiöse Einheit aus einer einzelsträngigen RNA bestehen kann. Da Viren keinen eigenen Stoffwechsel betreiben, sind sie zu der Amplifikation ihres Genoms auf Wirtszellen angewiesen. Dazu haben Viren Strategien entwickelt, die nicht-adaptive Immunantwort des Wirtes zu umgehen. Durch die Aufklärung dieser Strategien lassen sich neue Erkenntnisse über das nicht-adaptive Immunsystem und die Viren gewinnen.

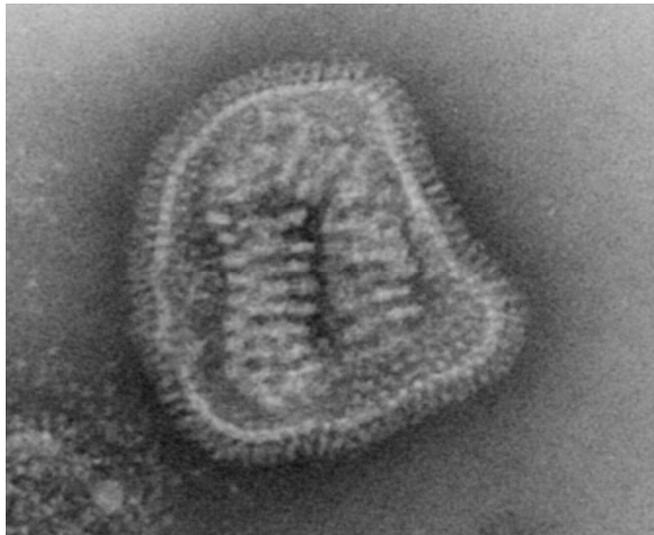
## 1.1 Influenzaviren

Die behüllten Influenzaviren besitzen ein segmentiertes einzelsträngiges RNA-Genom mit negativer Orientierung, also komplementär und in entgegengesetzter Orientierung zu *messenger* (m)RNA und werden den *Orthomyxoviridae* (griechisch: orthos = Standard, richtig; myxa = Schleim) zugeordnet. Zu der Familie der *Orthomyxoviridae* gehören Influenzaviren der Typen A, B und C sowie Thogoto- und Isaviren. Während Influenzaviren der Typen B und C in ihrem Wirtsspektrum fast ausschließlich auf den Menschen beschränkt sind, kommen Influenza A Viren in verschiedenen Spezies vor. Vögel, insbesondere Wasservögel, bilden das natürliche Influenza A Virusreservoir. Neben dem Menschen infizieren Influenza A Viren Schweine, Pferde und viele andere Säugerspezies. Die Influenzavirustypen A, B und C werden durch immunogenetische Unterschiede ihrer Nukleo- und Matrixproteine unterschieden. Influenza A Viren werden weiterhin in verschiedene Subtypen entsprechend ihrer Oberflächenproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) unterteilt. Von 16 verschiedenen HA- und 9 verschiedenen NA-Varianten kommen H1 bis H3 sowie N1 und N2 bei im Menschen verbreiteten Influenza A Viren vor (Lamb, 2001).

Influenzavirusstämme werden benannt durch Angabe des Typs (A, B oder C), der Spezies aus dem der Stamm isoliert wurde, des Ortes der Isolation, einer laufenden Nummer und dem Jahr in dem der Stamm isoliert wurde (WHO, 1980). Für Influenza A Viren wird zusätzlich der Subtyp angegeben. Wurde der Virusstamm aus einem Menschen isoliert, verzichtet man auf die Speziesangabe. Die Bezeichnung B/Memphis/18/95 gehört demnach zu einem Influenza B Virusisolat in Memphis aus dem Jahr 1995 oder A/duck/Vietnam/367/2005 (H5N1) zu einem Influenza A Virus isoliert aus einer Ente in Vietnam im Jahr 2005 vom Subtyp H5N1. Die folgenden Ausführungen beschränken sich auf die für diese Arbeit relevanten Influenza A Viren.

### 1.1.1 Aufbau von Influenza A Viren

Influenza A Viren erscheinen im Elektronenmikroskop als sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 80 - 120 nm (Abbildung 1-1). Stabförmige HA- und pilzförmige NA-Fortsätze ragen circa 10 - 14 nm aus der Lipidhülle der Viruspartikel (Lamb, 2001), die der Wirtszellmembran entstammt (Kates *et al.*, 1962). Die HA- und NA-Proteine bilden die wichtigsten antigenen Determinanten der Influenza A Viren. Das Matrixprotein 2 (M2) wird in nur geringer Anzahl als Tetramer auf der Lipidhülle präsentiert (Zebedee & Lamb, 1988).

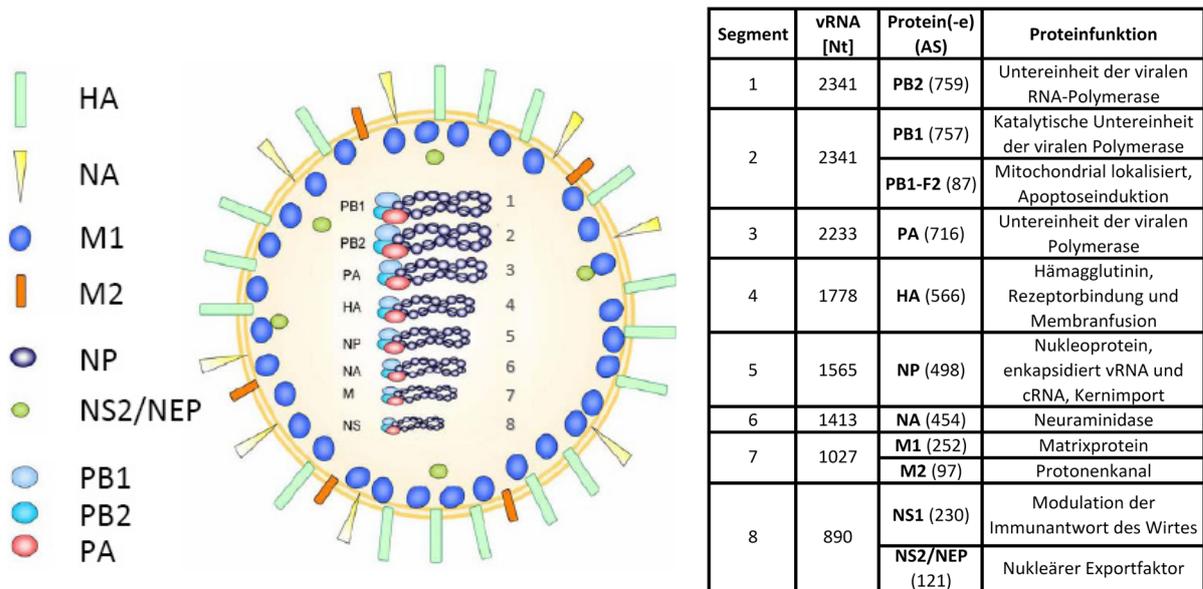


**Abbildung 1-1:** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Influenzaviruspartikels.  
([http://phil.cdc.gov/PHIL/Images/8430/8430\\_lores.jpg](http://phil.cdc.gov/PHIL/Images/8430/8430_lores.jpg); von L. Palmer; M. L. Martin, CDC/Erskine).

Der schematische Aufbau eines Influenza A Virions (Abbildung 1-2) zeigt

unter der Lipidhülle eine Schicht von Matrixprotein 1 (M1), die acht Segmente des Virusgenoms (insgesamt 13-14.000 Nukleotide) in Form von Ribonukleoproteinkomplexen (vRNPs) und einige NS2/NEP-Proteine (Richardson & Akkina, 1991). Die vRNPs bestehen aus je einer einzelsträngigen RNA an die Nukleoproteine (NP) sowie RNA-abhängige RNA-Polymerasekomplexe assoziiert sind, die aus den drei Polymeraseproteinen PA, PB1 und PB2 bestehen (Murti *et al.*, 1992). Das Nichtstrukturprotein 1 (NS1) und das nicht von allen Influenza A Viren kodierte PB1-F2 Protein (Chen *et al.*, 2001) werden nur in Wirtszellen exprimiert und nicht in Virionen verpackt.

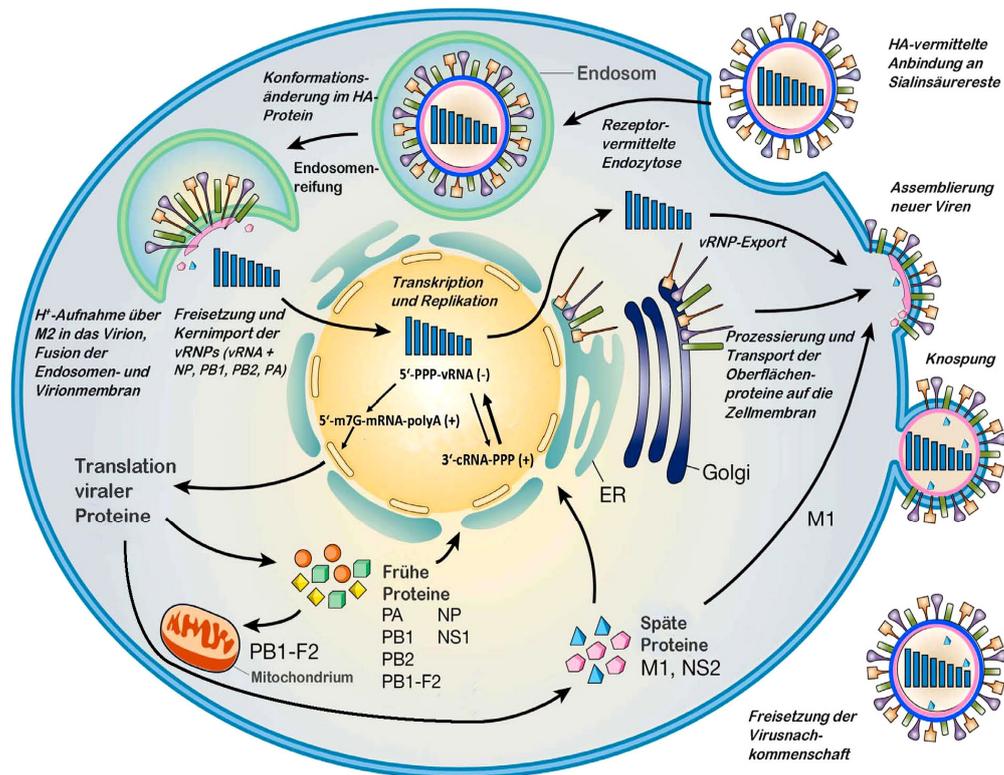
Die acht viralen RNA-Segmente (vRNA) enthalten die genetische Information für die verschiedenen viralen Proteine, wie in Abbildung 1-2 angedeutet. Die vRNA liegt im Virion vermutlich in quasizirkulärer, pfannenstiel-ähnlicher Form als *coiled-coil* vor (Compans *et al.*, 1972; Hsu *et al.*, 1987). Jedes vRNA-Segment enthält nichtkodierende komplementäre Regionen am 3'- und 5'-Ende. Diese terminalen 12 oder 13 Nukleotide sind hoch konserviert und Bindestelle für den viralen Polymerasekomplex (Tiley *et al.*, 1994).



**Abbildung 1-2: Schematischer Aufbau eines Influenza A Virions und eine Übersicht zu den viralen Gensegmenten und der von ihnen kodierten Proteine.** Dargestellt sind die neun Strukturproteine, der Aufbau eines Virions und tabellarisch die viralen Gensegmente, die ihrer Größe entsprechend von 1-8 nummeriert werden. Die in der Tabelle aufgeführten NS1- und PB1-F2-Proteine werden nur in infizierten Zellen exprimiert.

### 1.1.2 Replikation der Influenza A Viren

Influenza A Viren binden über ihr HA-Protein an terminale Sialinsäurereste (N-Azetylneuraminsäuren) glykosylierter Membranproteine der Zielzelle. Aviäre Influenza A Viren binden über ihr HA-Protein an die in Vögeln überwiegend vorkommenden  $\alpha 2,3$  an die folgende Galaktose gebundenen Sialinsäurereste, das HA-Protein humaner Stämme an die im Menschen überwiegenden  $\alpha 2,6$ -Konjugate (Connor *et al.*, 1994; Couceiro *et al.*, 1993; Rogers & Paulson, 1983). Der Spezies-spezifisch unterschiedliche Rezeptorbesatz wurde und wird als ein wesentlicher Bestandteil der Interspeziesbarriere zwischen Vogel und Mensch für Influenza A Viren angesehen. Seit kurzem erst ist bekannt, dass  $\alpha 2,3$ -verknüpfte Sialinsäurereste auch von einigen humanen Lungenzellen präsentiert werden (Shinya *et al.*, 2006).



**Abbildung 1-3: Der Replikationszyklus von Influenzaviren**, modifiziert nach (Neumann et al., 2009). Die Abbildung wird in dem sich unmittelbar anschließenden Textteil erläutert.

Nach Anbindung des Viruspartikels (Abbildung 1-3) wird es über Rezeptor-vermittelte Endozytose in das Zellinnere aufgenommen (Matlin *et al.*, 1981). Die Ansäuerung des Endosoms im Zytoplasma löst eine Konformationsänderung der HA-Proteine aus. Das HA-Fusionspeptid wird dabei exponiert und initiiert die Fusion der Virus- und Endosomenmembran (Bullough *et al.*, 1994). Über die durch M2-Proteine gebildeten tetrameren Ionenkanäle strömen Protonen aus dem Endosom in das Innere des Viruspartikels (Pinto *et al.*, 1992; Sugrue & Hay, 1991). Protein-Protein-Interaktionen zwischen den vRNPs und den M1-Proteinen werden dadurch geschwächt und es kommt zu der Freisetzung der vRNPs in das Zytoplasma (Martin & Helenius, 1991a).

Influenzaviren replizieren im Zellkern der Wirtszelle (Martin & Helenius, 1991b). Die vRNPs werden dazu NP-abhängig aktiv von Wirtszellproteinen in den Zellkern transportiert (O'Neill *et al.*, 1995). Von der vRNA wird im Zellkern mRNA durch den viralen Polymerasekomplex transkribiert. Als Primer für die Transkription in mRNA dienen 12-14 Nukleotide lange 5'-m7G-Enden, die durch den viralen Polymerasekomplex von Polymerase-II abhängig entstehender Wirtszell-mRNA geschnitten werden („cap snatching“) (Krug *et al.*, 1979; Plotch *et al.*, 1981). Durch den viralen RNA-abhängigen RNA-

Polymerasekomplex wird auch eine 3'-poly-Adeninsequenz generiert (Luo *et al.*, 1991; Pritlove *et al.*, 1998).

Die mRNA des M- und NS-Segments wird gespleißt, wodurch jeweils zwei Proteine (M1 und M2, bzw. NS1 und NS2/NEP) translatiert werden (Lamb & Choppin, 1981; Lamb *et al.*, 1978; Lamb *et al.*, 1981). PB1-F2 wird über einen alternativen Leserahmen von der PB1-mRNA translatiert (Chen *et al.*, 2001). Während PB1-F2 sich an Mitochondrien lokalisiert findet, werden die restlichen translatierten viralen Proteine wieder in den Zellkern transportiert (Smith *et al.*, 1987) oder im Fall der Oberflächenproteine über das raue Endoplasmatische Retikulum prozessiert.

Entweder über den nukleären NP-Gehalt (Shapiro & Krug, 1988; Vreede *et al.*, 2004) oder NS2/NEP-abhängig (Robb *et al.*, 2009) kommt es im Infektionsverlauf zu einem Umschalten von der Transkription der vRNA-Segmente zu deren Replikation. Dazu wird Primer-unabhängig komplette komplementäre cRNA von der vRNA abgeschrieben, die dann als Matrize für neue vRNA dient. Die neu gebildete vRNA wird in Form von vRNPs durch Wechselwirkung mit dem Matrixprotein M1 (Martin & Helenius, 1991a) und dem nukleären Exportprotein NEP/NS2 in der späten Infektionsphase aus dem Zellkern transportiert (O'Neill *et al.*, 1998).

Die Oberflächenproteine HA, NA und M2 werden von dem rauhen Endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Apparat und das Trans-Golgi-Netzwerk prozessiert und auf die Zellmembran transportiert. Dabei werden verschiedene Modifikationen, wie N-Glykosylierungen und Palmitoylierungen, angefügt (Lamb, 2001).

Da gezeigt wurde, dass transfiziertes M1 allein eine Knospung virusähnlicher Partikel vermittelt (Gomez-Puertas *et al.*, 2000), wurde angenommen, dass M1 die treibende Kraft für das Knospen der Viren von der Wirtszellmembran ist, wie es für die meisten anderen lipidumhüllten Viren der Fall ist. Neuere Erkenntnisse deuten aber darauf hin, dass HA und nicht M1, bei Anwesenheit von Neuraminidaseaktivität, die Knospung antreibt (Chen *et al.*, 2007a).

Wie die vRNPs in neue Virionen eingebaut werden, ist unklar. Ursprünglich nahm man an, dass bis zu 12 vRNPs zufällig in die Viruspartikel verpackt werden, so dass statistisch nur 10 % der Virusnachkommen alle acht RNA-Segmente enthalten (Enami *et al.*, 1991). Neuerdings werden segmentspezifische Signale, die den Einbau der vRNPs in die sich neu

bildenden Partikel steuern, immer häufiger diskutiert (Marsh *et al.*, 2008; Noda *et al.*, 2006; Odagiri & Tashiro, 1997).

Auf der Zellmembran befindliche Sialinsäurereste werden durch die Neuraminidaseaktivität des NA-Proteins abgespalten, um eine Readsorption der neu gebildeten Viren an der Zellmembran zu verhindern (Palese *et al.*, 1974). Das HA-Protein wird als Vorläuferprotein exprimiert und überwiegend durch Wirtsproteasen, zum Beispiel Protease Clara oder Plasmin im Respirationstrakt von Säugern in eine HA1- und HA2-Untereinheit gespalten und dadurch aktiviert (Kido *et al.*, 1999). HA1 und HA2 bleiben über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden (Skehel & Wiley, 2000).

Die Funktion der Nichtstrukturproteine NS1 und PB1-F2 ist überwiegend immunmodulatorischer Art. PB1-F2 wird nicht bei Infektion aller Influenza A Viren exprimiert und scheint eine proapoptotische Funktion in Monozyten zu besitzen, während es wenig Einfluss auf die Replikation und Vermehrung von Influenza A Viren zeigt (Chen *et al.*, 2001; McAuley *et al.*, 2010). Die Funktion des NS1-Proteins wird unter 1.2.2.2 erläutert.

### **1.1.3 Pathogenese saisonaler Influenza A Viren**

Influenzaviren sind die Erreger der echten Grippe (Influenza) im Unterschied zu gewöhnlichen Erkältungserkrankungen, die überwiegend von Reo-, Adeno- und Rhinoviren oder durch bakterielle Infektionen ausgelöst werden. Saisonal bilanziert man bis zu 15.000 durch Influenzavirusinfektionen bedingte Todesfälle allein in Deutschland (AGI, 2008).

Die Influenza ist eine respiratorische Erkrankung, da sich Influenzaviren im Menschen fast ausschließlich in den Epithelien des Respirationstraktes vermehren. Dieser Gewebetropismus wird vermutlich durch das Vorhandensein entsprechender Proteasen zu der HA-Aktivierung bedingt. Übertragen werden Influenzaviren über ausgeatmete Aerosole, seltener durch Kontakt. Typische Symptome einer Influenzavirusinfektion sind unter anderem Kopf- und Gliederschmerzen, trockener Husten und insbesondere plötzlich auftretendes hohes Fieber. In den meisten Fällen ist die Influenza eine selbstlimitierende Erkrankung. Komplikationen treten häufiger bei älteren oder immunsupprimierten Menschen und Hochschwangeren auf. Die Vorschädigung der Epithelien durch Influenzaviren erleichtert eine Infektion mit anderen Erregern, so dass es häufig zu bakteriellen Sekundärinfektionen kommt.

### **1.2 Die nicht-adaptive Immunantwort**

In Säugern unterscheidet man eine spezifische, adaptive Immunantwort und die evolutionär ältere, unspezifischere nicht-adaptive Immunantwort. Gegenüber dem Organismus unbekanntem Erregern ist in den ersten Tagen der Infektion das nicht-adaptive Immunsystem die einzige Verteidigung des Wirtes und ist bereits kurz nach Eindringen des Pathogens aktiv.

Das nicht-adaptive Immunsystem wird auch als angeborenes Immunsystem (im engl. *innate immunity*) bezeichnet und wird durch bestimmte auf Pathogenen wiederkehrende Strukturen (*pathogen associated molecular patterns (PAMPs)*) aktiviert, die von wenigen spezifischen Rezeptoren (*pattern recognition receptors (PRR, Abschnitt 1.2.2)*) als fremd erkannt werden (Janeway, 1989). Diese PRR kommen auf nahezu allen Zellen vor, so dass Pathogen befallene Gewebszellen, ebenso wie spezialisierte Zellen des nicht-adaptiven Immunsystems, wie Makrophagen, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen, zu der Aktivierung einer Immunantwort beitragen können. Der Pathogenerkennung folgt eine rasche intrazelluläre Aktivierung verschiedener Gene die für Proteine kodieren, die die Pathogenabwehr aktivieren. So wie beispielsweise die Typ I Interferon (IFN)-Gene (Abschnitt 1.2.1) werden nur wenige Gene direkt durch PRR-vermittelte Signale aktiviert. Sekretiertes Typ I IFN (ko-)stimuliert dann allerdings die Expression vieler weiterer Gene, die für direkt antiviral wirkende Proteine oder verschiedene Zytokine kodieren (Samuel, 2001). Neben den durch sie induzierten Zytokinen wirken sekretierte Typ I IFN auch selbst aktivierend auf spezialisierte Immunzellen, wie natürliche Killerzellen und dendritische Zellen (Biron *et al.*, 1999; Gallucci *et al.*, 1999; Le Bon *et al.*, 2001). Durch die Koevolution von Wirt und Virus haben Influenza A Viren, wie alle anderen Viren auch, Mechanismen entwickelt, die Aktivierung einer nicht-adaptiven Immunantwort zu unterdrücken und/oder deren Wirkung zu entgehen (Abschnitt 1.2.2.1). Influenza A Viren unterdrücken dazu die Aktivierung des Typ I IFN-Systems und zusätzlich die Funktion einiger antiviral wirkender Proteine (Abschnitt 1.2.2.2).

#### **1.2.1 Das Typ I Interferonsystem**

Bereits 1957 identifizierten Isaacs und Lindenmann das Interferon als einen pH-resistenten Faktor, der von Zellen nach Behandlung mit durch Hitze inaktiviertem Influenza A Virus sezerniert wird und die Replikation homo- und heterologer Viren inhibiert (Isaacs &

Lindenmann, 1957). Interferone waren die ersten entdeckten und therapeutisch verwendeten Zytokine. Interferone werden in drei Typen unterteilt. Zu der Familie der Typ I IFN zählen im Menschen ein IFN $\beta$ -Gen, 13 IFN $\alpha$ -Isotypen und je ein IFN $\omega$ , - $\epsilon$  und - $\kappa$ -Gen (Pestka *et al.*, 2004). Die Bedeutung des Typ I IFN-Systems wird durch die hohe Suszeptibilität von Menschen und Mäusen mit einem Defekt in Signalwegen des Typ I IFN-Systems gegenüber viralen Infektionen veranschaulicht (Deonarain *et al.*, 2000; Dupuis *et al.*, 2003). Das einzige bekannte Typ II IFN (IFN $\gamma$ ) wird von Makrophagen und anderen Immunzellen sekretiert und ist wichtig für die Ausbildung einer adaptiven Immunantwort. Typ I und III IFN zeigen stark überlappende Funktionen. Typ III IFN (IFN $\lambda$ 1-3)-defiziente Mäuse mit intakten Typ I IFN-Genen weisen nur eine geringfügig höhere Suszeptibilität gegenüber Influenzaviren auf und der Typ III IFN-Rezeptor (ein heterodimerer IL-28R $\alpha$ /IL-10R $\beta$ -Komplex) wird auch nur in einigen Geweben exprimiert (Mordstein *et al.*, 2008).

### 1.2.2 Erkennung von Pathogenen durch das nicht-adaptive Immunsystem

Pathogene werden durch das nicht-adaptive Immunsystem über drei verschiedene Rezeptorfamilien erkannt, die zelleigene von fremden Strukturen unterscheiden.

Toll-ähnliche Rezeptoren (TLRs = *Toll-like receptors*) sind membranständige Rezeptoren. Von den elf bekannten humanen TLR detektieren TLR-3, -7, -8 und -9 virale Strukturen. TLR-7 und -8 erkennen in Endosomen virale RNA (Diebold *et al.*, 2004; Lund *et al.*, 2004), TLR-9 virale oder bakterielle, nicht methylierte DNA (Hemmi *et al.*, 2000; Lund *et al.*, 2003) und TLR-3 erkennt doppelsträngige (ds-)RNA (Alexopoulou *et al.*, 2001). Alle TLR, die virale Infektionen erkennen, stimulieren die Typ I IFN-Gene (Kawai & Akira, 2008).

NOD-ähnliche Rezeptoren (NLRs, neuerdings als *nucleotide binding domain and leucine rich repeat containing receptors* bezeichnet) detektieren zytoplasmatisch eine Vielzahl zellfremder Strukturen. Seit 2009 finden sich in der Fachliteratur zunehmend Hinweise, dass NLRs in die Detektion von Virusinfektionen und in die Aktivierung des nicht-adaptiven Immunsystems involviert sind. Beispielsweise wurde gezeigt, dass das NLR mit Pyrin-Domäne (NLRP)-3-Protein-enthaltende Inflammasom in die Aktivierung von Caspase-1 und der Caspase-1-vermittelten Reifung von IL-1 $\beta$  und IL-18 während Influenza A Virus-Infektionen in Mäusen und humanen Zellen involviert ist (Allen *et al.*, 2009). Während die Expression von NLRP-3 in Makaken zwar durch Influenzaviren stammspezifisch reguliert wird, wurde in diesem Modellsystem ein Einfluss von NLRP-3 auf die Typ I IFN-Sekretion nicht deutlich (Cilloniz *et al.*, 2009). Andererseits zeigten Sabbah *et al.* kürzlich für NOD2

eine (möglicherweise indirekte) Interaktion mit ssRNA und eine darauf folgende Aktivierung von IRF-3 über IPS-1 (Sabbah *et al.*, 2009).

Die beiden DExD/H-Box Helikasen RIG-I und MDA-5 (Andrejeva *et al.*, 2004; Yoneyama *et al.*, 2004) bilden die dritte bekannte Familie von PRR, die RIG-I-ähnlichen Rezeptoren (RLR). Diese zytoplasmatischen Rezeptoren binden dsRNA und RIG-I zusätzlich 5'-triphosphorylierte (5'-PPP-)ssRNA. Nach der Bindung von RIG-I an 5'-PPP-RNA, bzw. nach dsRNA-Bindung durch MDA-5, binden diese Rezeptoren an IPS-1 (auch als MAVS, VISA und Cardif bezeichnet) was zu der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und IRF-3 führt und somit unter anderem zu einer Aktivierung der Typ I IFN-Gene (Kawai *et al.*, 2005; Meylan *et al.*, 2005; Seth *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2005). Interessanterweise stellt NLRX-1 (NLR mit unbekannter N-terminaler Domäne-1) einen Negativregulator dieses Signalweges dar, indem es möglicherweise konstitutiv kompetitiv die Interaktion von RIG-I und wahrscheinlich MDA-5 mit IPS-1 inhibiert (Moore *et al.*, 2008). Die Funktionalität der RIG-I und NOD2-Proteine erscheint stark redundant. Beide Proteine binden IPS-1 und beide aktivieren IRF-3 nach Influenzavirusinfektionen (Sabbah *et al.*, 2009; Yoneyama *et al.*, 2004). Es wurde aber auch spekuliert, dass NOD2 zu früheren Zeitpunkten nach Infektion IRF-3 aktiviert und RIG-I im weiteren Verlauf der Infektion diese Funktion übernimmt (Sabbah *et al.*, 2009).

DsRNA wurde über Jahrzehnte als universeller Aktivator des nicht-adaptiven Immunsystems bei Virusinfektionen betrachtet. Nicht nur das Typ I IFN-System, sondern auch viele antiviral wirksame Proteine werden durch dsRNA aktiviert und man nahm an, dass dsRNA während der Replikation aller Viren gebildet wird. Bei der Replikation einzelsträngiger RNA-Viren können dsRNA-Intermediate bei der Synthese der komplementären genomischen und antigenomischen RNA entstehen, während dsRNA bei DNA-Virusinfektionen vermutlich durch Transkripte gegenläufiger Leserahmen gebildet wird ((Jacobs & Langland, 1996; Kumar & Carmichael, 1998; Weber *et al.*, 2006) und darin enthaltene Quellen). Lange Zeit wurde daher angenommen, dass TLR-3 auch das nicht-adaptive Immunsystems als Antwort auf Influenza A Virusinfektionen aktiviert (Alexopoulou *et al.*, 2001). Bei der Replikation von negativ-Strang RNA-Viren, wie Influenza- und La Crosse Viren (*Orthomyxoviridae*) sowie Sendai und New Castle Disease Viren (*Paramyxoviridae*) deren ssRNA-Genom mit Nukleoproteinen assoziiert ist, konnte jedoch kaum dsRNA in infizierten Zellen nachgewiesen werden (Pichlmair *et al.*, 2006;

Weber *et al.*, 2006). Die Entdeckung von RIG-I und die Erkenntnis, dass virale 5'-PPP-RNA ebenfalls eine nicht-adaptive Immunantwort auslösen kann, waren wohl die bedeutendsten Erkenntnisse der molekularen Virologie der letzten Jahre (Hornung *et al.*, 2006; Pichlmair *et al.*, 2006; Yoneyama *et al.*, 2004). Auch während Influenza A Virusinfektionen wird das nicht-adaptive Immunsystem durch Induktion der Typ I IFN-Gene als Folge der Erkennung der 5'-triphosphorylierten c- und vRNA durch RIG-I, aktiviert (Hornung *et al.*, 2006; Opitz *et al.*, 2007; Pichlmair *et al.*, 2006).

Für verschiedene RNA-Viren sind mittlerweile Mechanismen bekannt, die RLR-abhängigen Signalwege zu inhibieren. So inhibieren Paramyxoviren durch ihre V-Proteine MDA-5, bei Hepatitis C Virus-Infektionen wird IPS-1 durch die virale NS3/4A-Protease abgebaut und Picornaviren sequestrieren die 5'-PPP-Enden der viralen RNA durch ihr Vpg-Protein, degradieren RIG-I durch 3C(pro) und induzieren die Degradation von MDA-5 durch zelluläre Proteasen (Andrejeva *et al.*, 2004; Barral *et al.*, 2009; Meylan *et al.*, 2005). Auch Inflenzaviren unterdrücken die Aktivierung des RIG-I-Signalweges (Abschnitt 1.2.2.2).

### 1.2.2.1 Die Typ I IFN-induzierte Immunantwort auf Influenzavirusinfektionen

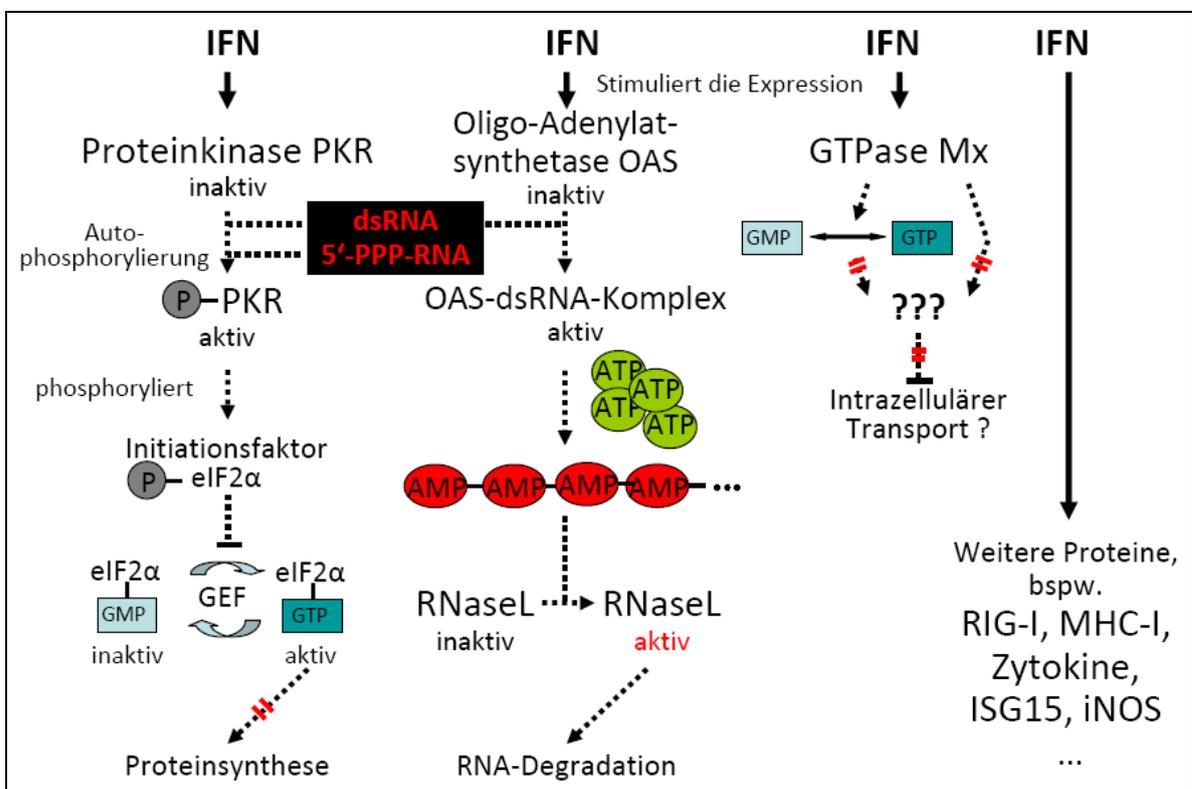
Nach der Bindung von RIG-I an Influenzavirus-5'-PPP-RNA kommt es zu einer Aktivierung des RIG-I-Signalweges (Hornung *et al.*, 2006; Opitz *et al.*, 2007; Pichlmair *et al.*, 2006). Die Bindung 5'-PPP-RNA und eventuell dsRNA durch RIG-I führt zu einer Konformationsänderung im RIG-I-Protein und zu dessen Bindung an IPS-1 an der äußeren Mitochondrienmembran (Seth *et al.*, 2005). Über die Rekrutierung mehrerer Adapterproteine und verschiedener Kinasen kommt es dann zu der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF-3 und NF- $\kappa$ B (Wathelet *et al.*, 1998). Aktiviertes IRF-3 translokalisiert in den Zellkern, wo es mit dem Transkriptionskoaktivator CBP (*creb binding protein*, auch p300) assoziiert, die Positivregulatorischen Domänen -I und -III in den Typ I IFN-Promotoren bindet und die Transkription der Typ I IFN-Gene im Zusammenspiel mit NF- $\kappa$ B und AP-1 stimuliert.

Sekretiertes Typ I IFN bindet auto- und parakrin an Typ I IFN-Rezeptoren und induziert so die Phosphorylierung und Aktivierung der Januskinasen Jak1 und Tyk2, die dann STAT1 und STAT2 aktivierend phosphorylieren. Zusammen mit IRF-9 bilden STAT1 und -2 einen trimeren Komplex. Dieser, IFN stimulierter Genfaktor (ISGF-3) genannte Komplex, bindet im Zellkern spezifische DNA-Sequenzen (ISRE, *interferon stimulated responsive elements*) in

den Promotoren über hundert verschiedener Gene, die als IFN-stimulierte Gene (ISG) zusammengefasst werden (zusammengefasst in (Wolff *et al.*, 2008)).

Die Sekretion von Typ I IFN führt so zu einer verstärkten Expression verschiedener Zytokine, antiviral wirkender Proteine und auch von Komponenten des RIG-I-Signalweges, wie RIG-I selbst, wodurch sich die Typ I IFN-Antwort selbst amplifiziert (Der *et al.*, 1998; Sanda *et al.*, 2006; Taniguchi & Takaoka, 2002).

Die Aktivierung einer Typ I IFN-Antwort hat weit reichende Folgen auf die Replikation von Viren. Die durch Typ I IFN auto- und parakrin induzierte Expression antiviral wirkender Proteine versetzt IFN-stimulierte Zellen in einen so genannten „antiviralen Zustand“ in dem die Virusreplikation unterdrückt wird (Abbildung 1-4).



**Abbildung 1-4: Funktionen ausgewählter antiviral wirksamer Proteine.** Typ I IFN-stimulierte Zellen exprimieren unter anderem verstärkt die Proteinkinase R (PKR), Oligoadenylatsynthetase (OAS) -1 und -2, Mx-Proteine (im Menschen MxA) sowie RIG-I, MHC-1 (*Major histocompatibility complex I*), ISG15 (IFN-stimuliertes Genprodukt, 15 kDa), iNOS (induzierbare Stickoxidsynthetase) und weitere Proteine mit direkter oder indirekter antiviraler Funktion. Die Bindung von dsRNA und eventuell 5'-PPP-RNA führt zu der Aktivierung von PKR und OAS, wodurch es zu einem Stopp der Proteinbiosynthese und zu unspezifischer Degradation zellulärer und viraler RNA kommt. Die Mx-Proteine besitzen GTPase-Aktivität und hemmen möglicherweise den intrazellulären Transport viraler RNPs.

Die wichtigsten Typ I IFN-abhängig exprimierten antiviralen Proteine, die die Influenzavirusreplikation unterdrücken können, sind die Proteinkinase R (PKR), MxA

(*myxovirus (influenza virus) resistance A*) und die 2'-5'-Oligoadenylatsynthetasen (OAS) -1 und -2 (Samuel, 2001).

PKR phosphoryliert in Anwesenheit von dsRNA, oder bestimmten ssRNA-Spezies, unter anderem den Elongationsfaktor eIF2 $\alpha$  (Galabru & Hovanessian, 1987; Nallagatla *et al.*, 2007; Samuel, 1979) und inhibiert dadurch dessen essentielle Funktion bei der Initiation der Proteinbiosynthese. Aktivierte PKR unterdrückt so die Translation zellulärer und viraler mRNA. Die PKR-Expression wird zwar Typ I IFN-abhängig stimuliert, PKR ist aber auch konstitutiv exprimiert. Die antivirale Bedeutung von PKR wird dadurch unterstrichen, dass verschiedenste Viren die PKR-vermittelte Inhibition der Proteinbiosynthese unterdrücken. So sequestriert das Vaccinia Virus über das E3L Protein dsRNA, ICP34.5 des humanen Herpesvirus I sorgt für die Dephosphorylierung von eIF2 $\alpha$  und die Virus-assoziierte RNA1 von Adenoviren blockiert die dsRNA-Bindestelle in der PKR ohne zu deren Aktivierung zu führen (Chang *et al.*, 1992; He *et al.*, 1997; Kostura & Mathews, 1989).

Das humane MxA-Protein, eine Dynamin-ähnliche GTPase, ist im Zytoplasma lokalisiert (Lindenmann, 1964; Staeheli & Haller, 1985). Die Typ I IFN-induzierte Expression der Mx-Proteine kann die Replikation einiger Viren der *Orthomyxoviridae* (Influenza- und Thogoto Viren), *Paramyxoviridae* (Masern Virus), *Bunyaviridae* (La Crosse Virus) und *Rhabdoviridae* (Vesikuläres Stomatitis Virus), Zelllinien- und Spezies-spezifisch, inhibieren. Bei Infektionen von Thogoto und La Crosse Viren konnte gezeigt werden, dass das MxA Protein den intrazellulären Transport viraler Proteine oder Ribonukleoproteinpartikel inhibiert (zusammengefasst in (Haller *et al.*, 2007)).

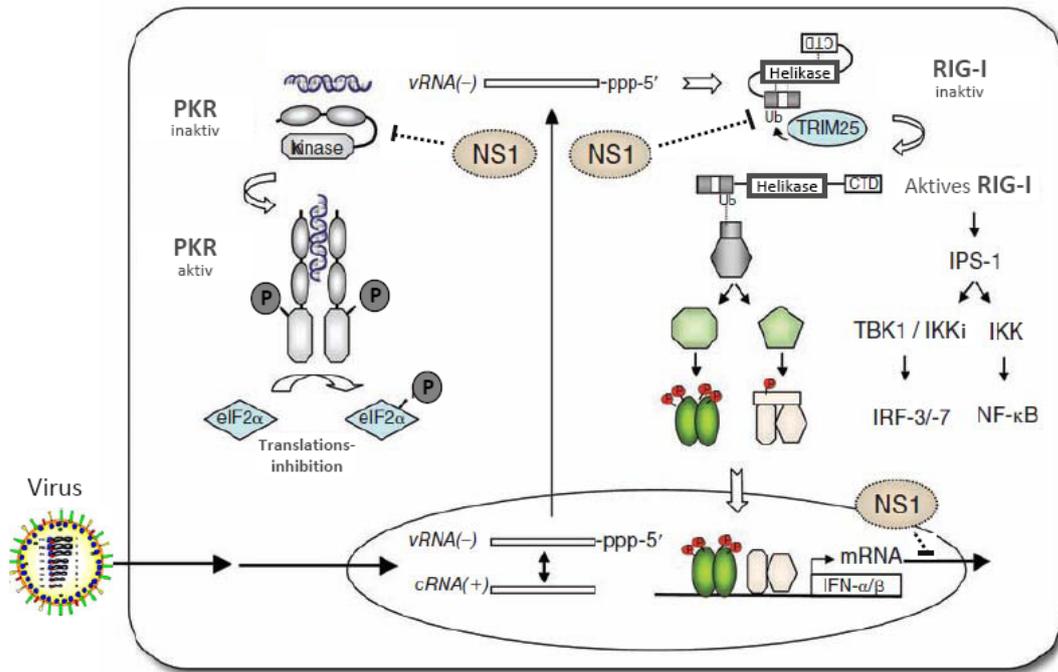
Weiterhin wird die OAS durch eine Typ I IFN-Stimulation verstärkt exprimiert. Die Synthese von 2'-5'-oligoA-Strängen durch die OAS in Gegenwart von dsRNA (Kerr & Brown, 1978), depletiert den ATP-Haushalt der Wirtszelle und aktiviert die konstitutiv exprimierte Endoribonuklease RNaseL, welche nach Bindung an 2'-5'-oligoA unspezifisch virale und zelluläre RNA, einschließlich ribosomaler RNA, degradiert (Clemens & Williams, 1978; Diaz-Guerra *et al.*, 1999).

Zusätzlich stimulieren Typ I IFN die Expression und Sekretion verschiedener Zytokine von Influenza A Virus-infizierten Epithelzellen, die zu der Rekrutierung und Aktivierung von Makrophagen, dendritischen Zellen und Neutrophilen beitragen können (Veckman *et al.*, 2006).

### 1.2.2.2 Modulation der nicht-adaptiven Immunantwort durch Influenza A Viren

Influenza A Viren unterdrücken die Aktivierung des Typ I IFN-Systems durch ihr NS1-Protein. Ein NS1-defizientes Influenza A Virus vermehrt sich kaum in IFN-kompetenten Zellen, aber effizient in VERO-Zellen oder STAT1-*knock-out* Mäusen, deren Typ I IFN-Antwort blockiert ist (Garcia-Sastre *et al.*, 1998). Es wurde weiterhin gezeigt, dass das NS1-Protein die Virus-vermittelte Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF-3, NF- $\kappa$ B und AP-1 und so die Induktion der Typ I IFN-Gene inhibiert (Garcia-Sastre *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 2007; Ludwig *et al.*, 2002; Mibayashi *et al.*, 2007; Talon *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000). Ursprünglich nahm man an, dass das NS1-Protein dazu während der Virusreplikation entstehende dsRNA-Intermediate bindet, diese vor den PRR sequestriert und so die Aktivierung des Typ I IFN-Systems verhindert. Andere Studien führten die IFN-antagonistische Wirkung des NS1-Proteins auf dessen Fähigkeit zurück, Polyadenylierung, Spleißen und den nukleären Export zellulärer mRNA zu inhibieren (Fortes *et al.*, 1994; Lu *et al.*, 1994; Nemeroff *et al.*, 1998; Qiu & Krug, 1994). Diese Fähigkeit der NS1-Proteine scheint aber Virusstamm-spezifisch stark zu variieren (Kochs *et al.*, 2007).

Die Transkriptionsfaktoren, die die Transkription der Typ I IFN-Gene stimulieren, werden überwiegend RIG-I-vermittelt bei saisonalen Influenzavirusinfektionen aktiviert (Opitz *et al.*, 2007). Das Influenzavirus-NS1-Protein unterdrückt diese Aktivierung der Transkriptionsfaktoren. So wurde eine Interaktion zwischen den NS1-Proteinen saisonaler Influenza A Viren und RIG-I nachgewiesen (Guo *et al.*, 2007; Mibayashi *et al.*, 2007). Des Weiteren wurde auch eine Interaktion von NS1 mit TRIM25 gezeigt, wodurch eine TRIM25-vermittelte aktivierende Ubiquitylierung von RIG-I unterdrückt wird (Abbildung 1-5 und (Gack *et al.*, 2009)). Neben der Unterdrückung der Aktivierung des Typ I IFN-Systems und somit der Expression IFN-induzierter antiviraler Proteine, wie beispielsweise Mx1, iNOS und ISG15, moduliert das NS1-Protein auch die Aktivierung von PKR und OAS. Dazu bindet und sequestriert NS1 PKR- und OAS-aktivierende RNA (Lu *et al.*, 1995; Min & Krug, 2006) und interagiert direkt mit PKR (Min *et al.*, 2007; Tan & Katze, 1998). Weiterhin wirkt NS1 der virusinduzierten Apoptose infizierter Zellen durch eine Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges entgegen (Ehrhardt *et al.*, 2007).



**Abbildung 1-5: Das Influenza A Virus NS1-Protein inhibiert die Aktivierung des Typ I IFN-Systems durch RIG-I und die Aktivierung der Proteinkinase R (PKR).** Die während der viralen Replikation gebildete 5'-PPP-vRNA wird im Verlauf der Infektion aus dem Zellkern exportiert und von RIG-I und PKR gebunden. Das NS1-Protein inhibiert RIG-I unter anderem durch Bindung an TRIM25, wodurch die Signalweiterleitung an IPS-1 und die folgende Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF-3/-7 und NF-κB unterdrückt wird. NS1 interagiert weiterhin mit PKR und unterdrückt die zu deren Aktivierung essentielle Autophosphorylierung. Weiterhin unterdrücken die NS1-Proteine einiger Stämme den Kernexport zellulärer mRNA und so auch die Expression antiviral wirkender Proteine. Modifiziert nach (Wolff & Ludwig, 2009).

Anhand von Mauszellen, denen gleichzeitig funktionelle PKR-, RNaseL- und Mx-Gene fehlen, wurde gezeigt, dass weitere Proteine in begrenztem Umfang zu einem IFN-induzierten antiviralen Zustand beitragen (Zhou *et al.*, 1999). Dies sind vermutlich antiviral wirkende Proteine, wie beispielsweise die Adenosin-Desaminase (ADAR) oder ISG15. ISG15 (IFN-stimuliertes Genprodukt, 15 kDa) wird ähnlich Ubiquitin an verschiedene Proteine, unter anderem an Proteine mit direkter oder indirekter antiviraler Wirkung konjugiert. Während der Wirkmechanismus von ISG15 unbekannt ist, ist bekannt, dass ISG15<sup>-/-</sup>-Mäuse suszeptibler für Influenzavirusinfektionen sind und dass das NS1-Protein von Influenza B Viren die ISG15-Konjugation unterdrückt (Lenschow *et al.*, 2007; Yuan & Krug, 2001; Zhao *et al.*, 2005).

### 1.3 Influenzavirus-Pandemien und ihre Entstehung

Zu einer Influenza-Pandemie, einem weltweiten Grippeausbruch, kommt es, wenn sich neuartige Influenzaviren, gegen die der Mensch keine bestehende Immunität besitzt, in

der menschlichen Population ausbreiten. Im 20. Jahrhundert kam es 1918, 1957 und 1968 zu solchen Pandemien sowie im Jahr 2009.

1918/19 verursachte ein Influenza A Virus vom Subtyp H1N1 die „Spanische Grippe“ mit 20 - 50 Millionen Todesfällen weltweit. Man geht davon aus, dass das vermutlich rein aviäre H1N1-Virus direkt von Vögeln auf Schwein und Mensch übertragen wurde (Taubenberger *et al.*, 1997). Die „Asiatische Grippe“ des Jahres 1957 wurde von einem Influenza A Virus verursacht das neben 5 Segmenten des H1N1-Virus die PB1-, HA- und NA-Segmente eines aviären H2N2-Virus besaß und demnach durch Reassortierung entstand (Kawaoka *et al.*, 1989; Scholtissek *et al.*, 1978). Das Virus der „Hong-Kong-Grippe“ von 1968 entstand durch Reassortierung des zirkulierenden H2N2-Virus mit einem weiteren aviären Influenza A Virus. Das so entstandene H3N2-Virus besaß neben dem HA auch das PB1-Segment des aviären Virus (Kawaoka *et al.*, 1989).

Im Unterschied zu den bisher genannten Pandemien, kam es im Jahr 2009 bei der „Schweinegrippe-Pandemie“ zu einem Neueintrag eines Virus mit Oberflächenproteinen bisher im Menschen vorkommender Subtypen. Allerdings besaß das H1N1-Virus das HA Protein eines klassischen Schweinevirus und das NA-Protein eines eurasischen Vogel-ähnlichen Schweinevirus. Aus diesen Viren stammen bis auf die Polymeraseuntereinheiten auch die weiteren Genomsegmente. PA und PB2 entstammen einem Nordamerikanischen aviären Influenzavirus und das PB1-Segment einem saisonalen H3N2-Stamm (Dawood *et al.*, 2009; Neumann *et al.*, 2009).

Reassortante Influenzaviren entstehen durch gleichzeitige Infektion einer Zelle mit verschiedenen Influenzavirusstämmen. In die neu gebildeten Virionen werden dann Segmente beider Viren eingebaut (Webster *et al.*, 1971). Die H2N2- und H3N2-Reassortanten entstanden möglicherweise in Schweinen, die auf ihren Lungenzellen Membranproteine mit  $\alpha$ 2,3- und  $\alpha$ 2,6-verknüpften Sialinsäureresten tragen und demnach gut von aviären und humanen Influenza A Viren infiziert werden können. In Schweinen können so reassortante Viren entstehen, denen das humane Immunsystem naiv gegenüber steht und die sich auch von Mensch zu Mensch gut verbreiten, da sie humane Zellen über  $\alpha$ 2,6-Sialinsäurereste infizieren können.

Neben Reassortierungsereignissen, die zu einem so genannten Antigen-*shift* führen können, kommt es in den im Menschen zirkulierenden saisonalen Influenzaviren zu dem Auftreten von Drift-Varianten. Durch kleinere Unterschiede in den Oberflächenproteinen

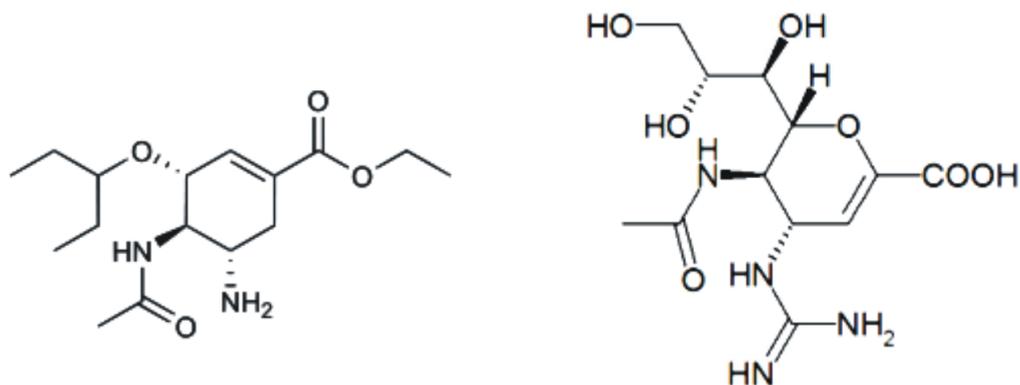
entgehen diese Varianten den durch Impfungen oder durch frühere Infektionen im Menschen gebildeten neutralisierenden Antikörpern und verursachen dadurch die saisonalen Grippewellen.

Ursache für die Entstehung solcher Drift-Varianten ist die hohe Fehlerrate der RNA-abhängigen RNA-Polymerase, wodurch es zu häufig auftretenden Aminosäureaustauschen in den viralen Proteinen kommt.

Je nach Wirt in dem das Virus repliziert, werden auch vorteilhafte Aminosäureaustausche in anderen Virusproteinen selektioniert. Da Inflenzaviren überwiegend in Vögeln replizieren, sind sie sehr gut an aviäre Wirte angepasst. In Vögeln vorteilhafte Varianten können bei zoonotischen Infektionen allerdings hinderlich sein und neue, für die Replikation im neuen Wirt vorteilhafte, Varianten bilden sich selektionsbedingt aus. Dies kann dazu führen, dass es zu deutlichen funktionellen Unterschieden zwischen Inflenzavirusproteinen von beispielsweise humanen und aviären Inflenzavirusstämmen kommt. So ist bekannt, dass aviäre Inflenzaviren in humanen Zellen initial schlecht replizieren (Hayman *et al.*, 2007; Hayman *et al.*, 2006) und dass Inflenzaviren durch mehrmaliges Passagieren in einem Wirt an diesen adaptiert werden können. Dabei akkumulieren genetische und funktionelle Unterschiede mit der zunehmenden Zirkulationsdauer des Virus im neuen Wirt. Die zunehmende Affinität der Inflenzavirus HA-Proteine zu  $\alpha$ 2,6-verknüpften Sialinsäureresten ist dafür ein gutes Beispiel. Eine weitere häufig beobachtete Anpassung ist der Aminosäureaustausch E627K im PB2-Protein bei einem Neueintrag aviärer Inflenzaviren in die menschliche Population (Subbarao *et al.*, 1993).

### **1.3.1 Antivirale Therapie und Prophylaxe**

Momentan sind zwei Wirkstoffklassen antiviraler Medikamente gegen Influenza A Viren verfügbar. Adamantane (Amantadin und Rimantadin) blockieren die Ionenkanalfunktion des M2-Proteins (Hay, 1992) und Oseltamivir (Tamiflu, Roche) und Zanamivir (Relenza, GlaxoSmithKline) inhibieren die virale Neuraminidase (Abbildung 1-6). Adamantanresistente H3N2-Inflenzavirusstämme sowie Oseltamivir-resistente H1N1-Stämme sind mittlerweile aber weit verbreitet (AGI, 2008). Die neue pandemische H1N1-Variante aus Schweinen weist bisher eine Resistenz gegen Adamantane, kaum aber gegen Oseltamivir auf (CDC, 2009).



**Abbildung 1-6: Strukturformeln der zugelassenen antiviralen Chemotherapeutika Oseltamivir (links) und Zanamivir (rechts).** Oseltamivir wird unter dem Markennamen Tamiflu in Tablettenform vertrieben, während Zanamivir als Relenza als zu inhalierendes Pulver angeboten wird [<http://en.wikipedia.org/wiki/Oseltamivir> und <http://en.wikipedia.org/wiki/Zanamivir>].

Impfstoffe vermitteln einen sehr guten Schutz gegen saisonale Influenzaviren, können aber nur gegen Stämme schützen die bereits bekannt sind und für eine Anzucht zur Verfügung stehen. Die Vorlaufzeit für „Grippe“-Impfstoffe beträgt zurzeit etwa ein halbes Jahr, wie die Entwicklung und Produktion von Impfstoffen gegen die neue H1N1-Variante (Schweinegrippe) zeigte. Des Weiteren muss die Formulierung der trivalenten saisonalen Influenzavirusvakzine auf Grund der auftretenden Drift-Varianten kontinuierlich angepasst werden.

### 1.3.2 Charakteristika zoonotischer Influenza A Viren des Subtyps H5N1

Während die vergleichsweise milden Pandemien 1957 und 1968 durch reassortante Viren ausgelöst wurden, kam es bei der verheerenden Spanischen Grippe vermutlich zu einer direkten Übertragung aviärer Influenzaviren auf den Menschen. Auch die Influenza A Viren des Subtyps H5N1 („Vogelgrippe“) wurden 1997 direkt von Vögeln auf den Menschen übertragen. Von den 18 initial in Hongkong Infizierten starben 6 Menschen bevor das Keulen allen Geflügels in Hongkong diesen Ausbruch beendete. Seit Beginn des Jahres 2003 kommt es erneut zu direkten Übertragungen von aviären H5N1 Influenza A Viren auf den Menschen. Bis Juni 2010 wurden der WHO annähernd 500 Infektionen im Menschen gemeldet, die zu etwa 60 % fatal verliefen (WHO, 2010a).

Im Gegensatz zu den oben genannten pandemischen Influenza A Viren und der aktuell zirkulierenden H1N1-Variante aus Schweinen, wurde eine direkte Übertragung der H5N1-Stämme von Mensch zu Mensch nur in Ausnahmefällen beobachtet. Da H5N1-Stämme jedoch fortgesetzt auf den Menschen übertragen werden, besteht weiterhin die Gefahr, dass sie durch Reassortierung oder andere genetische Veränderungen eine höhere

Übertragbarkeit von Mensch zu Mensch erwerben und in Folge dessen eine Pandemie auslösen könnten.

Die zoonotischen H5N1-Infektionen im Menschen unterscheiden sich im Krankheitsverlauf deutlich von Infektionen mit saisonalen Influenzaviren. H5N1-infizierte Patienten zeigen neben allgemeinen Grippesymptomen, Atemnot und Leukopenie und entwickeln häufig schwere virale Pneumonien, die zu einem akuten Atemnotsyndrom (*acute respiratory distress syndrome*, ARDS) und multiplem Organversagen bis hin zum Tod führen (Abdel-Ghafar *et al.*, 2008). Berichte über andere Influenza A Viren, die bei Infektion im Menschen eine so hohe Mortalität ( $\approx 60\%$ ) verursachen, sind nicht bekannt (WHO, 2010b). Die hohe Pathogenität der H5N1-Stämme wurde mit einer hohen Viruslast in den Infizierten und einer starken Zytokininduktion in Zusammenhang gebracht (de Jong *et al.*, 2006; Deng *et al.*, 2008; Peiris *et al.*, 2004; To *et al.*, 2001; Uiprasertkul *et al.*, 2007). Damit übereinstimmend sind in H5N1-Infizierten oftmals eine periphere Lymphopenie, interstitielle Pneumonien, aktive Hämophagozytose sowie vielfältige Schädigungen der Lunge nachweisbar (Ng *et al.*, 2006; To *et al.*, 2001; Tran *et al.*, 2004; Uiprasertkul *et al.*, 2007). Ob die teilweise beobachteten hohen Zytokinkonzentrationen in Patientenserum Ursache oder Folge der beobachteten Lungenschäden in H5N1-Patienten sind, ist jedoch unklar (Uiprasertkul *et al.*, 2007).

Die in H5N1-Infizierten beobachtete Hämophagozytose, ist vergleichbar mit der sogenannten Hämophagozytischen Lymphohistiozytose (HLH) (Henter *et al.*, 2006). Die oft fatal verlaufende HLH geht einher mit einer massiven Hyperzytokinämie, tritt oft als Folge bakterieller, viraler oder Tumorerkrankungen auf und ähnelt im Krankheitsbild einer akuten Sepsis (Fisman, 2000). Die Phagozytose von Blutzellen und deren Vorläuferzellen erfolgt durch Makrophagen und Monozyten, die wahrscheinlich durch hohe Konzentrationen an IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und IL-6 aktiviert werden. Als Quelle dieser Zytokine werden deregulierte T-Lymphozyten vermutet (zusammengefasst in Fisman, 2000). Eine Verbindung zwischen einer unkontrollierten IFN-Antwort und einem fehlerhaften Umschalten auf eine adaptive Immunantwort wurde für fatale SARS-Coronavirusinfektionen, die ebenfalls zu einer Hyperzytokinämie führen, postuliert und für H5N1-Infektionen vermutet (Cameron *et al.*, 2007).

Die beobachtete hohe Zytokinsekretion und die starke Aktivität von Immunzellen in H5N1-Patienten deuten darauf hin, dass während H5N1-Infektionen das humane nicht-adaptive

Immunsystem stark aktiviert wird, was direkt oder durch eine fehlerhafte Aktivierung adaptiver Immunmechanismen den Krankheitsverlauf negativ beeinflussen könnte.

Im Unterschied zu den H5N1-Stämmen, sind die Influenza A Viren, die saisonale Grippewellen verursachen, streng darauf angewiesen, die Aktivierung des nicht-adaptiven Immunsystems zu unterdrücken, um sich effizient im Menschen vermehren zu können. Auch in Zellkulturexperimenten wurde gezeigt, dass H5N1-Isolate aus Patienten die Transkription der Typ I IFN-Gene stark stimulieren können und dass verschiedene Zytokine im Vergleich zu saisonalen Influenzaviren verstärkt von H5N1-infizierten humanen Zellen sekretiert werden (Chan *et al.*, 2005; Cheung *et al.*, 2002). Weitere Untersuchungen zeigten, dass sich H5N1-Stämme aus dem Jahr 1997 auch in Anwesenheit von IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$  oder TNF $\alpha$ , Hauptaktivatoren der antiviralen Funktionen des nicht-adaptiven Immunsystems, zu ähnlich hohen Titern wie in unstimulierten Zellen vermehren können. Saisonale Influenzaviren zeigten diese Fähigkeit, die mit dem H5N1-NS-Segment assoziiert wurde, nicht (Seo *et al.*, 2002). Ursprünglich wurden diese Versuche als auf Lungenepithelzellen vom Schwein durchgeführt, publiziert. Die Herkunft der Zellen aus der Schweinelunge wird mittlerweile aber bezweifelt (Silversides *et al.*, 2010).

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die H5N1-Stämme gut im Menschen replizieren können, trotzdem sie, im Gegensatz zu saisonalen Influenzaviren, eine starke nicht-adaptive Immunantwort auslösen. Während die starke Aktivierung der Immunantwort durch schlechte Anpassung an humane Zellen hervorgerufen werden könnte, scheint die Immunantwort gegen die H5N1-Stämme unwirksam zu sein. Es wäre aber auch denkbar, dass andere Besonderheiten in den asiatischen H5N1-Stämmen diesen Viren einen Vorteil vermitteln, der den Nachteil der starken nicht-adaptiven Immunantwort auf deren Vermehrung aufwiegt.

Die gute Vermehrung der H5N1-Stämme im Menschen wird sicher teilweise durch das Fehlen neutralisierender Antikörper begünstigt. Auch besitzen die H5N1-Stämme die Fähigkeit sich systemisch im Menschen auszubreiten (Buchy *et al.*, 2007; de Jong *et al.*, 2006; Gu *et al.*, 2007). Die Fähigkeit dazu liegt im HA-Protein dieser Viren. Die HA-Proteine von H5- und H7-Subtypen können eine multibasische Spaltstelle aufweisen. Solche HA-Proteine, wie sie auch in den asiatischen H5N1-Stämmen vorkommen, sind nicht auf spezifische extrazelluläre Proteasen zu ihrer Aktivierung angewiesen, sondern werden bereits im Trans-Golgi-Netzwerk durch ubiquitär vorkommende Subtilisin-ähnliche

Proteasen in HA1 und HA2 prozessiert und aktiviert (Klenk & Garten, 1994; Stieneke-Grober *et al.*, 1992). Die multibasische Spaltstelle wird auch mit der hohen Pathogenität dieser Viren in Vögeln assoziiert, wenn auch neuere Erkenntnisse vermuten lassen, dass eine multibasische Spaltstelle allein nicht ausreichend ist, um eine hohe Pathogenität in Vögeln zu vermitteln (Stech *et al.*, 2009).

Weiterhin werden die NS1-, PB1-F2- und PB2-Proteine als wichtige Determinanten für die Pathogenität der H5N1-Stämme in Säugern betrachtet. Im PB2-Protein der H5N1-Stämme sind Adaptationen (E627K, D701N und einige mehr) beschrieben, die mit der hohen Pathogenität der H5N1-Stämme assoziiert werden konnten und zu einer besseren Vermehrungsfähigkeit in Säugern führen (Chen *et al.*, 2007b; Le *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2005; Mehle & Doudna, 2008; Subbarao *et al.*, 1993). Für das H5N1 PB1-F2-Protein ist eine stark pro-apoptische Aktivität beschrieben. Für die Aminosäureposition 66 in PB1-F2 wurde gezeigt, dass ein Serin an dieser Position einem H5N1-Stamm aus dem Jahr 1997 und dem rekonstituierten H1N1-Virus von 1918 eine höhere Pathogenität und Virulenz in Mäusen vermittelt (Conenello *et al.*, 2007). Während die NS1-Proteine saisonaler Influenzaviren die Aktivierung einer IFN-Antwort in humanen Zellen inhibieren, ist unklar, ob die H5N1-NS1-Proteine diese Fähigkeit ebenfalls besitzen (Cheung *et al.*, 2002; Lipatov *et al.*, 2005). Die H5N1-NS1-Proteine wurden aber auch für die effiziente Vermehrung von H5N1-Stämmen auf IFN-behandelten Zellen verantwortlich gemacht, während saisonale Influenzaviren diese Fähigkeit nicht aufwiesen (Seo *et al.*, 2002). Die NS1-Proteine könnten so wesentlich zu der Pathogenität der H5N1-Stämme beitragen.

### **1.4 Fragestellung**

Es ist bekannt, dass saisonale Influenza A Viren die von RIG-I vermittelte Aktivierung des Typ I IFN-Systems durch ihr NS1-Protein effizient unterdrücken (Garcia-Sastre *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2000; Ludwig *et al.*, 2002; Mibayashi *et al.*, 2007; Opitz *et al.*, 2007; Pichlmair *et al.*, 2006; Talon *et al.*, 2000). Dies ist essentiell für ihre effiziente Vermehrung in humanen Zellen, da die Expression IFN-stimulierter Gene die Replikation dieser Viren stark unterdrückt. Weiterhin wurde gezeigt, dass bestimmte hochpathogene asiatische H5N1-Stämme im Menschen eine starke Sekretion verschiedener Zytokine auslösen, in humanen Zellen das Typ I IFN-System stark aktivieren und zumindest in einigen Zellen in Gegenwart hoher Typ I IFN-Konzentrationen gut replizieren (Chan *et al.*, 2005; Cheung *et al.*, 2002; de Jong *et al.*, 2006; Seo *et al.*, 2002). Andererseits ist bekannt,

dass aviäre Influenzaviren sich in humanen Zellen oft nur schlecht vermehren (Hayman *et al.*, 2007; Hayman *et al.*, 2006). Für die direkt von Vögeln auf den Menschen übertragenen H5N1-Stämme ist allerdings eine gute Vermehrungsfähigkeit im Menschen oder humanen Zellen gezeigt (de Jong *et al.*, 2006; Zeng *et al.*, 2007).

Es sollten daher folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Unterscheiden sich H5N1-Isolate, die aus Patienten oder Vögeln isoliert wurden, in ihrer Vermehrungsfähigkeit in humanen Zellen und wie stark aktivieren sie das humane Typ I IFN-System? Welchen Einfluss hat das humane Typ I IFN-System auf die Vermehrungsfähigkeit verschiedener H5N1-Isolate?
2. Finden sich genomische oder funktionelle Unterschiede in den untersuchten H5N1-Stämmen, auf die gegebenenfalls die beobachteten Unterschiede zu saisonalen Influenzaviren bei der Aktivierung und Blockade des humanen Typ I IFN-Systems zurückgeführt werden können?
3. Zeigen insbesondere die H5N1-NS1-Proteine Unterschiede in ihrer Funktionalität die Aktivierung des humanen Typ I IFN-Systems zu unterdrücken?

Um diesen Fragen nachzugehen wurden verschiedene H5N1-Isolate aus Vögeln und Menschen im Hinblick auf ihre Replikationsfähigkeit und Induktion des Typ I IFN-Systems in verschiedenen humanen Zellkultursystemen untersucht und mit einem saisonalen H3N2-Isolat und einer rekombinanten Variante dieses Isolates mit einer Deletion des NS1-Genes verglichen.

Motivation dieser Arbeit war es, zu klären, durch welche viralen Faktoren und über welche Signalwege es bei H5N1-Infektionen in humanen Zellen zu der berichteten starken Aktivierung des Typ I IFN-Systems im Vergleich zu saisonalen Influenzaviren kommt. Die Ursachen der beschriebenen Hyperzytokinämie bei H5N1-Infektionen ließen sich dadurch möglicherweise auf molekularer Ebene erklären. Die effiziente Replikation der H5N1-Stämme in Anwesenheit hoher Typ I IFN-Konzentrationen deutete weiterhin auf eine für Influenzaviren bisher nicht beobachtete Fähigkeit hin, der antiviralen Wirkung von Typ I IFN zu entgehen. Ein besseres Verständnis der Prozesse bei der Modulation des nicht-adaptiven Immunsystems durch Influenzaviren dient nicht nur dem Erkenntnisgewinn, sondern könnte möglicherweise auch zu neuen Therapieansätzen führen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

1,5 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
15 ml Röhrchen	Roth, Karlsruhe
50 ml Röhrchen	TPP, Schweiz
Acrylamid (Rotiphorese)	Roth, Karlsruhe
Agarose NEEQ Ultra Qualität	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Ampizillin	Roche, Mannheim
Avicel RC-581	FMC BioPolymer, Belgien
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Bacto-Agar	Becton-Dickenson, Heidelberg
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bruteier (VALO SPF-Eier)	Lohmann, Cuxhaven
Bromphenolblau	Sigma, Steinheim
Bovines Serum Albumin 30 % (BSA)	PAA Laboratories, Linz
Bovines Albumin (BA) Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Medium für bronchiale Epithelzellen (BEGM)	Lonza, USA
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Ciprofloxacin	MP Biomedicals, Eschwege
CL-XPosure™ Film	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue R250	Roth, Karlsruhe
DEAE-Dextran	Sigma, Steinheim
Dimethylsulfoxid	Sigma, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
DNA-Längenstandard Mass Ruler	Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-Längenstandard Fast Ruler	Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-6x Ladepuffer	Fermentas, St. Leon-Rot
Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Einwegspritzen	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendinitrietetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
FACS-Röhrchen	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Formaldehyd 10 % (Methanol-frei)	Polysciences, Inc., USA
Formaldehyd 37 %	Roth, Karlsruhe
Fötales Rinderserum (FBS)	Biochrom, Cambridge, GB
Glukose	Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	Roth, Karlsruhe
Glyzerol	Roth, Karlsruhe
Glyzin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Becton-Dickenson, Heidelberg
HiPerfect	Qiagen, Hilden
IFNα, rekombinant	PBL InterferonSource, NJ, USA
IGEPAL CA-830	Sigma, Steinheim
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kristallviolett	Serva, Heidelberg
LipofectAMINE2000	Invitrogen, Karlsruhe
poly-D-Lysin	Sigma, Steinheim
Lymphozyten-Separationsmedium LSM-1077	PAA Laboratories, Linz

Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Minimal Essential Medium (MEM)	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdesoxycholat	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natriumvanadat	Sigma, Steinheim
Nichtessentielle Aminosäuren, Lösung für die Zellkultur	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe
Nitrozellulose Transfer-Membran (Protran)	Schleicher & Schuell, Dassel
Opti-MEM	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe
Opti PRO SFM ohne Glutamin	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe
Pefabloc	Roth, Karlsruhe
Penizillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Invitrogen, Karlsruhe
Pipetten für die Zellkultur	Roth, Karlsruhe
Protein-Assay zur Protein-Konzentrationsbestimmung	BioRad, München
Protein-Molekulargewichtsstandard	Fermentas, St. Leon-Rot
RPMI 1640	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
SuperSignal WestDura Extended Duration Substrat	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton-X100	Serva, Heidelberg
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin (TPCK behandelt)	Sigma, Steinheim
Trypton	Difco, Heidelberg
Tween-20	Roth, Karlsruhe
Zellkulturflaschen	TPP, Schweiz
Zellkulturflaschen	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Zellkulturschalen	TPP, Schweiz
Zellkulturschalen	Greiner, Solingen
Zellschaber	TPP, Schweiz

### 2.1.2 Verwendete Zellen

293T-Zellen	Humane Nierenzelllinie
A549-Zellen	Humane adenokarzinome Lungenepithelzelllinie
Calu-3-Zellen	Humane Bronchioepithelzelllinie
Humane Makrophagen	zu Makrophagen ausdifferenzierte Monozyten aus Spenderblut
Humane Lungengewebe	überwiegend alveoläre Lungendissektionen, tumorfrei
MDCK-Zellen	Epithelzelllinie aus der Niere eines Hundes
NHBE-Zellen	Primäre humane Bronchioepithelzellen
VERO-Zellen	Epithelzelllinie aus der Niere einer Grünen Meerkatze; serumfrei, (AVIR GreenHills Biotechnology, Österreich)

### 2.1.3 Influenzavirusstämme

HK/97 - A/Hongkong/156/1997 (H5N1)	Stammsammlung FG 17; RKI; Berlin
Thai/04 - A/Thailand/1 (Kan-1)/2003 (H5N1)	Stammsammlung FG 17; RKI; Berlin
Ch/Ind - A/Chicken/Indonesien/R132/2006 (H5N1)	Stammsammlung FG 17; RKI; Berlin
Duck/VN - A/Duck/Vietnam/TG24-01/2005 (H5N1)	Stammsammlung FG 17; RKI; Berlin
Buzz/BlN - A/Common Buzzard/Berlin/1/2006 (H5N1)	Stammsammlung FG 17; RKI; Berlin
Pan/99 - A/Panama/2007/1999 (H3N2)	Stammsammlung FG 17; RKI; Berlin
Pan-delNS1 - A/Panama-delNS1 (H3N2)	Stammsammlung FG 17; RKI; Berlin

Angegeben sind die hier gebrauchten Abkürzungen und vollständigen Bezeichnungen der verwendeten Influenzavirusstämme. Bei den H3N2-Stämmen (Pan/99 und Pan-delNS1) handelt es sich um rekombinante Viren, dargestellt von A. Zöhner, RKI. Das rekombinante Pan/99-Virus wurde bereits charakterisiert und zeigt eine zum natürlichen Isolat identische Vermehrungsfähigkeit (Anton, 2010) und löst eine vergleichbar geringe Typ I IFN-Sekretion in A549-Zellen aus (persönliche Mitteilung G. Heins).

### 2.1.4 Bakterienstämme

*Escherichia coli*, Stamm XL1-Blue                      Bioline, Luckenwalde

### 2.1.5 Medien für Bakterien

<b>LB-Medium</b>	Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 g/l
	pH 7,2, Antibiotika-Zugabe nach dem Autoklavieren	
<b>2x YT-Medium</b>	Trypton	16 g/l
	Hefeextrakt	10 g/l
	NaCl	10 g/l
	pH 7,2	
<b>SOC- Medium</b>	Trypton	20 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
	(nach dem Autoklavieren) Mg <sup>2+</sup> -Stock	20 mM
<b>Mg<sup>2+</sup>-Stock</b>	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	1 M
	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1 M
	Glukose	0,4 % (w/v)
<b>LB-Agar mit Ampizillin</b>	LB-Medium	
	Bacto-Agar	1,5 % (w/v)
(nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf < 50 °C)	Ampizillin	100 µg/ml

### 2.1.6 Enzyme

<i>Calf intestine alkaline phosphatase</i> (CIAP) (200 U/μl)	Fermentas, St. Leon-Rot
RevertAid M-MuLV Reverse Transkriptase (200 U/μl)	Fermentas, St. Leon-Rot
M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
RNase I (100 U/μl)	Applied Biosystems, Darmstadt
RNase III (1 U/μl)	Applied Biosystems, Darmstadt
RNasin (40 U/μl)	Promega, Mannheim
BsmB1 (10 U/μl)	NEB, Frankfurt am Main

### 2.1.7 Kits

Invisorb Spin Plasmid Mini Two	Invitex, Berlin
QIA Shredder Kit	Qiagen, Hilden
QIAspin Plasmid Maxi/Midi/Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAEXII Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Expand High Fidelity PCR System	Roche, Mannheim
In-Fusion Dry-Down PCR Cloning Kit	Clontech/Takara, Frankreich
BigDye Terminator 3.1 Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
QIAamp MinElute Virus Spin Kit	Qiagen, Hilden
IFNβ-ELISA	Invitrogen, Karlsruhe
Zytokin-Multiplex-ELISA	BioRad, München und Panomics, Italien

### 2.1.8 Plasmide

pHW2000	erhalten von R. Webster (Hoffmann <i>et al.</i> , 2000)
pHW2000-A/Pan/2007/99-PB1	(A. Zöhner, RKI, FG 17)
pHW2000-A/Pan/2007/99-PB2	(A. Zöhner, RKI, FG 17)
pHW2000-A/Pan/2007/99-PA	(A. Zöhner, RKI, FG 17)
pHW2000-A/Pan/2007/99-HA	(A. Zöhner, RKI, FG 17)
pHW2000-A/Pan/2007/99-NP	(A. Zöhner, RKI, FG 17)
pHW2000-A/Pan/2007/99-NA	(A. Zöhner, RKI, FG 17)
pHW2000-A/Pan/2007/99-M	(A. Zöhner, RKI, FG 17)
pHW2000-A/Pan/2007/99-NS	(A. Zöhner, RKI, FG 17)
pTK-RL-luc	Promega
pNF-κB-luc	Stratagene/Agilent Technologies
p125-luc	erhalten von T. Fujita (Yoneyama <i>et al.</i> , 1996)
pHW2000-A/Vietnam/1194/2004-HA	(A. Zöhner, RKI, FG 17)
pHW2000-A/Moskau/10/99-HA	(A. Anton, RKI, FG 17)
pHW2000-A/WSN/33-HA	(A. Zöhner, RKI, FG 17)

## 2.1.9 Oligonukleotide

Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung des PA-Segments	
BD-Uni-PA1	CGA AGT TGG GGG GGA GCG AAA GCA GGT AC
BD-Uni-PA2	GGC CGC CGG GTT ATT AGT AGA AAC AAG GTA CTT
A/Thai-HK-PA-1501-1483 r	TGA ATT TGC TTA TCA TTG G
A/Thai-HK-PA-1301-1319 f	CAA TTG AGC ACA TTG CAA G
A/Ck/duck-Ind/VN-PA-1663-1644 r	CTC CTA TCT CGA GGA CAC AG
A/Ck/duck-Ind/VN-PA intern f	TCC CAC TTG AGG AAT GAT AC
PA-Buzzard-1136-1155 r	CGT CAT TTC TTA CTT CTC CGC
PA-Buzzard-88-69 f	ATC CGA GAT TGG AGC CAC AC

Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung des PB1-Segments	
BD-Uni-PB1-1	CGA AGT TGG GGG GGA GCG AAA GCA GGC A
BD-Uni-PB1-2	GGC CGC CGG GTT ATT AGT AGA AAC AAG GCA TTT
PB1-484-503	GGT CTA ACA GCT AAT GAA TC
PB1-Buzzard/Rev-1062-1042	GTT TGA GAA CAT TAT AGG GGC
PB1-HK+Thai1121-1145 f	CAC AAA TAC CAG CAG AAA TGC TTG C
PB1-HK+Thai 1373-1348 r	TGA GAG CGA AAT CAT CAG AGG ATT GG
PB1-HK+Thai 542-564 f	CAA TGG ATA AGG AAG AAA TGG AG
PB1-HK+Thai 101-80 r	CCA GTA TAA GGG AAT GTG GTA C
PB1-HK+Thai 1624-1643 f	ATG ATA AAC AAC GAC CTT GG
PB1-HK+Thai 2160-2180 f	AGG CCA GTT GGA ATT TCC AGC
PB1-Indo-VN-1200 f	CTG AAT CTT GGA CAG AAA AGG
PB1-Indo-VN-500 f	GCT GCA ACT GCT TTG GCC AAC

Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung des PB2-Segments	
BD-Uni-PB2-1	CGA AGT TGG GGG GGA GCG AAA GCA GGT C
BD-Uni-PB2-2	GGC CGC CGG GTT ATT AGT AGA AAC AAG GTC GTT T
PB2-598-616 f	GAA GAA CTC CGA GAT TGC
PB2-1735-1718 r	TTG CAG GAT TCG GAC ACC
PB2-Buzzard-133-114 f	TAT CTC CCG AAG AGG TCA GC
PB2-Buzzard-99-93d1 r	CGT CAT TTC TTA CTT CTC CGC

Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung des HA-Segments	
BD-Uni-HA-1	CGA AGT TGG GGG GGA GCA AAA GCA GGG G
BD-Uni-HA-2	GGC CGC CGG GTT ATT AGT AGA AAC AAG GGT TTT AAC
A/Buss-HA-1403-1432 f	TAG GGA TAA TGC AAA GGA GCT TGG TAA CGG
A/Buss-HA-252-223 r	CAT TGA GGA ATT CGT CAC ACA TTG GGT TCC
HAHS-1203-1184 f	GAT CGA GTT GAC CTT ATT GG
H5HA-Primer 428-444 f	CCC AAA AGT TCT TGG TC
H5-HA 504-480 r	AAA CTA TTC GGT ATG GTG TAA AGA

Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung des NA-Segments	
BD-Uni-NA-1	GCA AGT TGG GGG GGA GCA AAA GCA GGA GT
BD-Uni-NA-2	GGC CGC CGG GTT ATT AGT AGA AAC AAG GAG T
NA-Buss1160-1190 f	TCC AGC ATC CAG AAC TGA CAG GAT TAG ATT GC
NA-Buss150-121 r	GCT GAT TGG TTC AGC TTG GCG TTG ATT CCC

Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung des M-Segments	
BD-Uni-M-1	CGA AGT TGG GGG GGA GCA AAA GCA GGT AG
BD-Uni-M-2	GGC CGC CGG GTT ATT AGT AGA AAC AAG GTA G

Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung des NS-Segments	
BD-Uni-NS #1	CGA AGT TGG GGG GGA GCA AAA GCA GGG TG
BD-Uni-NS#2	GGC CGC CGG GTT ATT AGT AGA AAC AAG GGT G

Primer für reverse Transkription von vRNA	
Uni12a	AGC AAA AGC AGG
Uni12g	AGC GAA AGC AGG

Oligonukleotide <i>real time</i> -Experimente	
M + 25	AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG
M - 124	CCW GCA AAR ACA TCY TCA AGT YTC TG
Sonde M+64 MGB	FAM - TCA GGC CCC CTC AA - MGB
Tubulin fw.	TGG AAC CCA CAG TCA TTG ATG A
Tubulin rev.	TGA TCT CCT TGC CAA TGG TGT A
Sonde	FAM - AGA TGC TGC CAA TAA CTA TGC CGC AGG- P

<i>small interfering</i> -RNA	
Kontroll-siRNA (sense)	UUC UCC GAA CGU GUC ACG U-dTdT
Kontroll-siRNA (anti-sense)	ACG UGA CAC GUU CCG AGA A-dTdT
RIG-1-siRNA (sense)	CGA UUC CAU CAC UAU CCA U-dTdT
RIG-1-siRNA (anti-sense)	AUG GAU AGU GAU GGA AUC G-dTdT

Tabelle 2-1: Verwendete Primer, Sonden und siRNA

## 2.1.10 Antikörper

Primäre Antikörper			
gerichtet gegen	Hersteller/Vertreiber	Spezies	Verdünnung
Influenza A/NS1	BioGenes	Kaninchen	1:5000
Influenza A/NP	Sigma/ABD-Serotec	Maus	1:1000
β-Tubulin	Sigma	Maus	1:10.000
α-Aktin	Novus Biologicals	Kaninchen	1:4.000
Rig-I	Axxora	Kaninchen	1:1000
Stat1	Santa Cruz	Maus	1:200
p-Stat1	Cell Signaling Technology	Kaninchen	1:1.000
STAT2	Santa Cruz	Kaninchen	1:800
p-STAT2	Cell Signaling Technology	Kaninchen	1:1.000
PKR	Epitomics	Kaninchen	1:2.500
p-PKR (T446)	Epitomics	Kaninchen	1:1.000
eIF2α	Cell Signaling Technology	Kaninchen	1:1.000
p-eIF2α (S51)	Cell Signaling Technology	Kaninchen	1:1.000
CD14-FITC	BD-Biosciences	Maus	1:50
CD206-APC	BD-Biosciences	Maus	1:50
CD86-PE	BD-Biosciences	Maus	1:50
CD3-FITC	BD-Biosciences	Maus	1:50
CD56-PE	BD-Biosciences	Maus	1:50
CD80-FITC	BD-Biosciences	Maus	1:50
HLA-RD-FITC	BD-Biosciences	Maus	1:50
CD154-APC	BD-Biosciences	Maus	1:50

Sekundäre Antikörper			
gerichtet gegen	Hersteller/Vertreiber	Spezies	Verdünnung
Polyklonaler anti-Kaninchen-HRP	Dako Cytomation	Schwein	1:10.000
Polyklonaler anti-Maus-HRP	Dako Cytomation	Kaninchen	1:10.000
IRDye 800 CW anti-Kaninchen	Li-Cor	Ziege	1:8.000
IRDye 600 anti-Maus	Li-Cor	Ziege	1:10.000
Polyklonaler anti-Kaninchen-HRP	Cell Signaling Technology	Ziege	1:10.000

Tabelle 2-2: Für Western Blots und FACS-Untersuchungen verwendete Antikörper

### 2.1.11 Puffer und Lösungen

<b>PBS</b>	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	80,9 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
<b>Kristallviolett-Lösung</b>	1:10 mit 4 % Formaldehyd/PBS verdünnte 10x Stocklösung aus	
	Ethanol	20 % (v/v)
	Kristallviolett	1 % (w/v)
<b>Zelllysispuffer</b>	Tris, pH 7,5	25 mM
	NaCl	137 mM
	Glyzerol	10 % (v/v)
	SDS	0,1 % (w/v)
	Na-Deoxycholat	0,5 % (w/v)
	NP40	1 % (v/v)
	EDTA	2 mM
	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	1 mM
	Pefabloc	1 mM
<b>10x SDS-Elektrophoresepuffer</b>	Tris	250 mM
	Glycin	1,92 M
	SDS	10 g/l
<b>6x SDS-Probenpuffer</b>	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	9,8 ml
	1 M Tris-HCl, pH 7,5	1,2 ml
	1 M HCl	0,4 ml
	SDS	1,7 g
	0,5 M EDTA	0,5 ml
	Glyzerin	5 ml
	Bromphenolblau	Spatelspitze
	β-Mercaptoethanol	8 % (v/v)
<b>Semidry-Blotpuffer</b>	Tris	48 mM
	Glyzin	30 mM
	SDS	1,3 mM
	Methanol	20 % (v/v)
<b>10x TBS-T</b>	Tris-HCl, pH 8,0	100 mM
	NaCl	1,5 M
	Tween 20	0,5 % (v/v)
<b>10x TBE-Puffer</b>	Tris	0,89 M
	Borsäure	0,89 M
	EDTA, pH 8,0	10 mM
<b>6x DNA-Probenpuffer</b>	Bromphenolblau	0,1 % (w/v)
	Xylencyanol	0,1 % (w/v)
	Glycerol	30 % (v/v)
	EDTA, pH 8,0	10 mM

### 2.1.12 Geräte

ABI Prism 3100 Genetic Analyzer  
 BIO-LINK CrossLinker

Applied Biosystems  
 Vilber Lourmat, Eberhardzell

## Material und Methoden

---

Elektrophoresezubehör	BioRad, München
Eppendorf Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
FACS-Calibur	BD Biosciences
Immunfluoreszenz-Mikroskop Diaphot 300	Nikon, Düsseldorf
Laminar Airflow HERAsafe	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Luminex100	BioRad, München
LB941 TriStar Multimode Luminometer	Berthold, Pforzheim
MS2 Minishaker	IKA, Staufen
Nanodrop1000	Thermo Fischer
Nikon Eclipse TS100	Nikon, Düsseldorf
Odyssey-Scanner	LI-COR biosciences, USA
PCR-Gerät Primus 96	PeqLab, Erlangen
Power Pac 200 und 300	BioRad, München
SPOT RT Digitalkamera	Diagnostic Instruments
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	BioRad, München
Transilluminator	INTAS, Göttingen
Zellkulturschrank	Sanyo/EWALD Innovationstechnik
Zellkulturschrank NuAIRE	Varolab, Gießen
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Multifuge 1SR	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Zentrifuge Pico 17	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Zentrifuge RC5C mit den Rotoren SS-34 und GSA	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe

### 2.1.13 Software

ABI-Prism 5	Tabellenkalkulation, Statistik
Adobe Photoshop CS3 extended	Bildbearbeitung
Adobe Acrobat Professional 9	Textverarbeitung
AIDA Image Analyzer v.4.18	Bildbearbeitung
Corel Draw 12 und X3	Grafikgestaltung
Endnote X2	Textverarbeitung
FlowJo 8.8.4	FACS-Auswertung
Lasergene 8	Sequenzauswertung
Mac OS w 10	Betriebssystem
Microsoft Excel 2003	Tabellenkalkulation
Microsoft Word 2003	Textverarbeitung
Mozilla Firefox	Internetrecherche
MxPro	q-PCR-Auswertung
Windows XP	Betriebssystem
Wikipedia	Online-Enzyklopädie

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkultur**

Alle Zellkulturarbeiten wurden steril durchgeführt. Verwendete Medien und Puffer wurden vor ihrer Verwendung auf 37 °C erwärmt. Die Zellkulturen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt in humidifizierter Atmosphäre kultiviert.

#### **2.2.1.1 Kultur der permanenten Zelllinien und NHBE-Zellen**

Für die Zellkultur wurde DMEM für A549- und 293T-Zellen, sowie MEM für MDCK-Zellen, mit 10 % FBS, 2 mM Glutamin und mit Antibiotika (Penizillin/Streptomycin (100 µg und 100 U/ml) und Ciprofloxacin (10 µg/ml)) versetzt. Calu-3-Zellen wurden kultiviert in MEM mit 15 % FBS, 2 mM Glutamin, 1 mM Na-Pyruvat, 0,1 mM nicht-essentiellen Aminosäuren, 1,5 g/l NaHCO<sub>3</sub> und den Antibiotika. VERO-Zellen wurden in Opti PRO SFM kultiviert, dem 2 mM Glutamin und die Antibiotika zugefügt wurden und NHBE-Zellen in BEGM mit allen vom Hersteller mitgelieferten Additiven.

Alle Zelllinien wurden in T75 Zellkulturflaschen mit 10 ml Kulturmedium kultiviert und nach Bedarf umgesetzt. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert, bis sie sich vom Boden lösten. Die Zellsuspension wurde in FBS-haltigem Medium aufgenommen und der gewünschte Anteil in eine neue Zellkulturflasche mit entsprechend vorgelegtem Kulturmedium überführt.

#### **2.2.1.2 Präparation und Haltung humaner Makrophagen**

Vom Deutschen Roten Kreuz, Berlin, bezogene Leukozytenpräparationen (jeweils ca. 80 ml) wurden mit EDTA-Waschpuffer (RPMI 1640 mit 5 % FBS und 0,2 mM EDTA) auf 200 ml aufgefüllt und in acht 50 ml-Röhrchen überführt, in denen 20 ml LSM 1077 (Lymphozytenseparationsmedium) vorgelegt waren. Anschließend wurde bei 800 xg für 30 min bei RT (minimale Beschleunigung und Bremsstärke) zentrifugiert und dann die dem LSM aufliegenden peripheren Blutmonozyten (PBMC) geerntet. Die erhaltene Zellsuspension wurde auf vier 50 ml-Röhrchen verteilt und dreimal mit EDTA-Waschpuffer gewaschen (250 xg, 5 min). Nach dem letzten Zentrifugieren wurden die Zellpellets in jeweils 10 ml EDTA-Waschpuffer aufgenommen, erneut auf ein Ficoll-Kissen gegeben (diesmal 10 ml LSM verdünnt mit 1,4 ml PBS) und bei 800 xg für 30 min zentrifugiert. Die PBMC wurden erneut geerntet, einmal in auf 37 °C temperierten PBS gewaschen und dann in 10 ml PBS aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden je 2 x 10<sup>6</sup>-Zellen in die

Vertiefungen einer 24-Kalottenplatte gegeben. Nach dem Absetzen der Zellen für 2 h bei 37 °C wurden die nicht adhärenen Zellen abgenommen, die adhärenen Zellen mehrfach mit auf 37 °C erwärmten PBS gewaschen und dann in Makrophagenmedium (RPMI 1640 mit 10 % FBS, 4 mM Glutamin und Pen/Strep) für 10 d bei 37 °C inkubiert.

Um zu zeigen, dass die nach der 10-tägigen Inkubationszeit erhaltenen Zellen, die für Makrophagen zu erwartenden Oberflächenmarker aufweisen, wurde ein Teil aller Präparationen durchflusszytometrisch untersucht. Dazu wurden die ausdifferenzierten Ansätze erneut mit PBS gewaschen, die adhärenen Zellen mit einem Zellschaber von den Zellkulturplatten gelöst, in ein 15 ml-Röhrchen überführt, bei 800 xg abzentrifugiert und in FACS-Puffer (PBS mit 0,5 % BSA und 0,02 % NaN<sub>3</sub>) gewaschen. Anschließend wurden jeweils etwa 10<sup>5</sup> Zellen in FACS-Röhrchen überführt, abzentrifugiert und in 50 µl Antikörperlösung (in FACS-Puffer 1:50 verdünnte Antikörper, siehe Tabelle 2-2) resuspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation bei 4 °C und gelegentlichem leichtem Vortexen der Ansätze wurde mit 3 ml FACS-Puffer aufgefüllt, die Zellen abzentrifugiert und in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Analyse der Oberflächenmarker wurde dann zytometrisch zusammen mit entsprechenden Kontrollen in einem FACS-*Calibur*-Gerät durchgeführt und mit der FlowJo-Software ausgewertet. Infektion der Makrophagen erfolgte am nächsten Tag, wie unter 2.2.2.2 beschrieben.

### 2.2.1.3 Kultur der humanen Lungengewebsbiopsien

Die verwendeten Lungengewebsbiopsien wurden von S. Hippenstiel und A. Becher (Charité-Klinikum, Berlin) zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um Stücke humanen Lungengewebes, das verschiedenen Patienten im Rahmen einer Lungendissektion entnommen und auf Abwesenheit tumorhaltigen Gewebes begutachtet wurde. Die Stücke der Lungensektionen, die überwiegend aus alveolären Gewebe bestanden, wurden dann in Scheiben geschnitten, mit einer 8-mm-Gewebestanze in gleich große Stücke geteilt, mehrfach ausgiebig in PBS gewaschen, einzeln in 24-Kalottenplatten über Nacht inkubiert und dann für die durchgeführten Experimente verwendet.

### 2.2.1.4 Transfektion eukaryotischer Zellen

#### **Transfektion von Plasmiden**

Eukaryotische Zellen wurden mittels Lipofektion mit LipofectAMINE2000 transfiziert. Die zu transfizierenden Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in einem Verhältnis von

1:2 umgesetzt. Die benötigte Menge LipofectAMINE2000 (1,5 – 2  $\mu$ l je  $\mu$ g Plasmid-DNA) wurde entsprechend dem Herstellerprotokoll in Opti-MEM verdünnt und 5 min bei RT inkubiert. Die zu transfizierende DNA wurde ebenfalls in Opti-MEM verdünnt, mit der LipofectAMINE2000-Verdünnung vereinigt, gemischt und 20 min bei RT inkubiert, wodurch sich Aggregate der kationischen Lipide mit den Plasmiden ausbilden. Diese Aggregate werden dann endozytotisch von den Zellen aufgenommen (Midoux *et al.*, 2009). Zu transfizierende Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit EDTA-Trypsin abgelöst, in FBS-haltigem Medium aufgenommen und anschließend bei 300 xg für 3 min pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in Transfektionsmedium (jeweiliges Zellkulturmedium ohne Antibiotika) resuspendiert und so in neue Zellkulturgefäße umgesetzt, dass die Zellen nach dem Absetzen den Gefäßboden zu 40 - 70 % bedeckten. Das LipofectAMINE2000-DNA-Gemisch wurde tropfenweise zu den frisch umgesetzten Zellen gegeben. Die Zellen wurden anschließend im Brutschrank inkubiert und das Transfektionsmedium 6 h nach Transfektion durch Kulturmedium ersetzt.

### **Transfektion von *small interfering* (si)RNA**

Für die Transfektion von siRNA wurde das HiPerfect-Reagenz verwendet. Transfiziert wurden 300 ng siRNA mit 12  $\mu$ l HiPerfect in Zellen einer Vertiefung einer 12-Kalottenplatte. Das Reagenz wurde dazu in Opti PRO-Medium mit der siRNA gemischt, 15 min bei RT inkubiert und dann tropfenweise zu den zu transfizierenden A549-Zellen gegeben. Es wurde darauf geachtet, dass die Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion den Zellkulturboden zu maximal 50 % bedeckten. Ein Wechsel des Zellkulturmediums der Transfektionsansätze war bei Verwendung dieses Reagenz nicht notwendig. Die Zellen wurden mit einer spezifisch gegen RIG-I gerichteten siRNA transfiziert oder mit einer Kontroll-siRNA (Tabelle 2-1), die keine 100 %-ige Identität mit einer bekannten zellulären RNA aufweist. Je nach Experiment wurde 36 bis 48 h nach Transfektion mit den Zellen weiter gearbeitet.

## **2.2.2 Arbeiten mit Influenza A Viren**

### **2.2.2.1 Infektion von eukaryotischen Zellen mit Influenza A Viren**

Alle Experimente mit replikationsfähigen H5N1-Viren wurden unter L3-Laborbedingungen durchgeführt. Einen Tag vor der Infektion wurden Zellen der permanenten Zelllinien so umgesetzt, dass zum Zeitpunkt der Infektion 70 - 90 % des Zellkulturgefäßbodens von den

Zellen bedeckt wurde. Gegebenfalls wurde den Zellkulturansätzen 6 h vor der Infektion rekombinantes IFN $\alpha$  (500 IU/ml Zellkulturüberstand) zugesetzt.

Virusverdünnungen wurden in PBS<sup>++</sup> (PBS mit 0,2 % BA, 0,1 g/l MgCl<sub>2</sub>, und 0,2 g/l CaCl<sub>2</sub>) angesetzt. Zu infizierende Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und dann die Virusverdünnung auf die Zellen pipettiert. Das Volumen der Virusverdünnung wurde möglichst klein gewählt, so dass eine hoch konzentrierte Virussuspension knapp den Zellrasen bedeckte. Die Anzahl der verwendeten infektiösen und replikationsfähigen Viruspartikel (pfu = Plaque bildende Einheiten, bestimmt auf MDCK-Zellen) pro Zelle im Infektionsansatz ist im Folgenden als Multiplizität der Infektion [moi] angegeben. Die Zellen wurden für 45 min bei RT mit den Virussuspensionen inkubiert und alle 15 min geschwenkt. Abschließend wurden die Virusverdünnungen abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann in dem entsprechenden Zellkulturmedium kultiviert, dem aber statt 10 % FBS, 0,2 % BA zugefügt waren und das gegebenenfalls mit IFN $\alpha$  (500 IU/ml) versetzt wurde. Alle infizierten Ansätze wurden bei 37 °C inkubiert.

Die HA-Proteine niedrigpathogener Influenza A Viren, die keine multibasische Spaltstelle aufweisen, werden *in vivo* durch Proteasen im Lungensekret aktiviert, die nur bestimmte Lungenepithelzellen sekretieren. A549-Zellen sekretieren diese Proteasen nicht, ebenso wie VERO und MDCK-Zellen. Die verwendeten niedrigpathogenen H3N2-Stämme, Pan/99 und Pan-delNS1, sind daher für eine effiziente Vermehrung in diesen Zellen auf die Zugabe einer Protease angewiesen. Dem Infektionsmedium wurde dazu TPCK-Trypsin zugesetzt. A549-Zellen werden durch das TPCK-Trypsin leicht vom Zellkulturboden abgelöst. Die optimale TPCK-Trypsinkonzentration wurde daher für jede Trypsincharge neu titriert und lag meist bei 0,4  $\mu$ g/ml Kulturmedium. Zu infizierten MDCK- und VERO-Zellen sowie zu den Makrophagen wurde 1  $\mu$ g TPCK-Trypsin je ml Kulturmedium gegeben.

Die erhaltenen Lungengewebsstücke wurden mehrfach in PBS gewaschen und mit  $4 \times 10^5$  pfu der verwendeten Viren in RPMI 1640 mit 0,3 % BA, 2 mM Glutamin für eine Stunde bei RT infiziert. Danach wurde das Inokulum entfernt, die Lungenstücke zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in RPMI 1640 mit 0,3 % BA, Glutamin und Antibiotika inkubiert.

### 2.2.2.2 Virusanzucht im Hühnerei, VERO- und MDCK-Zellen

Stocks der verwendeten Viren wurden entweder in 10 d alten embryonierten Hühnereiern (aviäre H5N1-Isolate), MDCK- (humane H5N1-Isolate) oder VERO-Zellen (rekombinante Viren) angezogen.

Die Eier wurden mit 70 % Ethanol desinfiziert und dann am stumpfen Ende im Bereich der Luftblase eine kleine Öffnung gebohrt, durch welche mit einer Kanüle (0,55 x 25 mm) 1000 pfu der Viren in 100 µl PBS<sup>++</sup> injiziert wurden. Die Öffnung wurde mit Klebstoff verschlossen und die Eier bei 37 °C für 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Eier mindestens 4 h im Kühlschrank gekühlt, so dass sich die Blutgefäße des Embryos verengten, um ein blutfreies Abnehmen der Allantoisflüssigkeit zu erleichtern. Die Eischale wurde dazu im Bereich der Luftblase entfernt und die Eihaut mit einer Pinzette abgezogen. Die Allantoisflüssigkeit wurde dann abpipettiert, zentrifugiert (250 xg, 5 min) und aliquotiert. Da Influenzaviren eine hohe Mutationsrate aufweisen und durch Viruspassagen im Brutei oder in humanen Zellen spezifische Adaptationen auftreten, beziehungsweise selektioniert werden können, wurden nur die aviären H5N1-Isolate auf diese Weise passagiert.

Virusstocks der humanen H5N1-Isolate wurden in MDCK-Zellen angezogen, die dazu mit einer moi von 0,01 - 0,001 infiziert wurden. 24 bis 40 h nach der Infektion wurden die Zellkulturüberstände abgenommen, zentrifugiert und aliquotiert.

Virusstocks der rekombinanten Pan/99- und Pan-delNS1-Viren, sowie der Pan/99 x H5N1-NS-Reassortanten wurden auf VERO-Zellen angezogen. Diese Zellen besitzen keine funktionellen Typ I IFN-Gene, wodurch sich Influenzaviren sehr gut in diesen Zellen vermehren und gegebenenfalls ein Adaptationsdruck auf die NS1-Proteine vermieden wird. VERO-Zellen wurden für die Virusanzucht mit einer moi von 0,01 infiziert und 36 – 60 h nach Infektion die Zellkulturüberstände abgenommen, zentrifugiert und aliquotiert. Sämtliche Virusstocks wurden bei -80 °C gelagert.

### 2.2.2.3 Titerbestimmung von Influenzaviren mittels Plaquetest

Mit Hilfe von Plaquetests kann die Anzahl infektiöser replikationskompetenter Viruspartikel in einer Viruslösung bestimmt werden. Dazu wurden MDCK-Zellen mit sequentiellen 1:10 Verdünnungen der zu testenden Virussuspension infiziert (Abschnitt 2.2.2.1) und die Anzahl der gebildeten Plaques in Abhängigkeit der Verdünnungsstufe

bestimmt. Zusammen mit dem zur Infektion eingesetzten Volumen der Verdünnung kann dann die Konzentration Plaque-bildender Einheiten [pfu/ml] berechnet werden.

Da neu gebildete Influenzaviren in das Zellkulturmedium abgegeben werden, muss deren freie Diffusion unterbunden werden, um eine Plaquebildung in Zellkultur beobachten zu können. Dazu wurden die infizierten MDCK-Zellen mit Avicel-Medium (MEM, versetzt mit 1,25 % Avicel RC-581, 0,2 % BA, 6 mM NaHCO<sub>3</sub> und 0,01 % DEAE-Dextran) überschichtet. Die mikrokristallinen Avicel-Partikel setzen sich auf den infizierten Zellen ab und behindern die freie Diffusion neu gebildeter Viruspartikel, die so nur Zellen in der Nähe der Zelle infizieren können der sie entstammen. Dies führt bei einer ausreichend geringen Infektionsdosis dazu, dass die Nachkommenschaft eines replikationskompetenten Viruspartikels einen abgegrenzten Bereich des Zellrasens infiziert. Diese Bereiche (Plaques) wurden 24 h nach Infektion in den mit PBS gewaschenen, fixierten (4 % Formaldehyd/PBS) und permeabilisierten (0,25 % Triton X-100/PBS) adhären Zellen der einzelnen Ansätze durch NP-Immunfärbung sichtbar gemacht und gezählt. Alternativ wurden 48 h nach Infektion die durch die Virusinfektion entstandenen Löcher im Zellrasen nach dem Waschen, Fixieren und Färben der Zellen mit Kristallviolett (0,1 % in 2 % Ethanol/PBS, 5 min) bestimmt.

#### 2.2.2.4 Herstellung reassortanter Influenza A Viren

Zur Herstellung der reassortanten Influenza A Viren wurden je 0,5 µg der Plasmide pHW2000-Pan/99-PB1, -PB2, -PA, -NP, -HA, -NA, -M und die entsprechenden pHW2000-H5N1-NS-Plasmide (Abschnitt 2.2.3.8) mit 6 µl LipofectAMINE2000 in 293T-Zellen transfiziert. 6 Stunden nach der Transfektion wurde das Transfektionsgemisch abgenommen, durch DMEM (mit 0,2 % BA, statt 10 % BSA und mit 1 µg/ml TPCK-Trypsin) ersetzt und die Zellen für 48 h bei 37 °C inkubiert.

In den pHW2000-Plasmiden befindet sich cDNA der Virussegmente unter Kontrolle eines Polymerase-II- und in entgegengesetzter Richtung unter Kontrolle eines Polymerase-I-Promotors. Dem entsprechend wird von den Plasmiden sowohl die virale mRNA, als auch vRNA transkribiert. Die Expression der viralen Proteine und der vRNA genügt, um die Bildung neuer Influenzaviren zu ermöglichen.

100 µl der virushaltigen Zellkulturüberstände wurden anschließend für eine erste Anzucht der Viren in 10 Tage alte Bruteier injiziert, um genügend Virus für weitere Passagen der Viren auf VERO-Zellen zu generieren. Die Identität der reassortanten Influenza A Viren und

die Abwesenheit von Mutationen im Vergleich zu den ursprünglichen H5N1-NS-Segmenten wurde nach der Passage im Hühnerei und nochmals nach mehreren Passagen auf VERO-Zellen durch Sequenzierung verifiziert.

### **2.2.3 Molekularbiologische Methoden**

#### **2.2.3.1 Reverse Transkription**

In einer reversen Transkriptasereaktion (RT) wird durch eine Reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) von einem RNA-Molekül ein einzelsträngiges DNA-Molekül (cDNA) abgeschrieben. Virale RNA für Sequenzierungen und Klonierungen wurde dazu aus Virusstocklösungen mit dem QIAamp MinElute Virus Spin Kit nach Herstellerangaben (Qiagen) isoliert und mit dem RevertAid MuLV-Reverse Transkriptase-Kit nach Herstellerprotokoll (Fermentas) in cDNA umgeschrieben. Verwendet wurden dazu die in Tabelle 2-1 angegebenen UniA/G-Primer. Die Matrix- und Tubulin-cDNA-Fragmente für die *real time*-PCR-Versuche wurden aus RNA-Präparationen infizierter A549-Zellen (RNeasy-Kit) mit der M-MLV Reversen Transkriptase in 40 µl-Ansätzen entsprechend dem Herstellerprotokoll generiert. Verwendet wurden dazu die auch für die *real time*-Untersuchungen verwendeten (*reverse*-) Rückprimer.

#### **2.2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Mit Hilfe zweier DNA-Oligonukleotide (Primer), die an jeweils einen Strang des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes hybridisieren und einer hitzebeständigen DNA-Polymerase kann durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) ein DNA-Polynukleotid vervielfältigt werden. Durch aufeinander folgende Zyklen von Denaturierung, Anlagerung von Hin- bzw. Rückprimern (*Annealing*) und Kettenverlängerung (*Elongation*) werden die DNA-Abschnitte dabei exponentiell amplifiziert. Verwendet wurden das Expand High Fidelity PCR System entsprechend den Herstellerangaben und die in Tabelle 2.1 angegebenen segmentspezifischen BD-Primer. Richtwert für die Elongationszeit war 1 min je 1000 nt.

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

Durch Agarosegelelektrophorese können DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Ein Vergleich der Bandenintensitäten zwischen dem Größenstandard mit bekannten DNA-Mengen und der interessierenden Bande erlaubt weiterhin eine grobe

Abschätzung der Konzentration der entsprechenden DNA in der Probe. Es wurden 1 - 2 %-ige TBE-Agarosegele verwendet. Vor dem Gießen des Gels wurde Ethidiumbromid (0,3 - 0,5 µg/ml Endkonzentration) zu der aufgekochten TBE-Agarose pipettiert. Die aufzutrennenden Proben wurden mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt und in die Taschen des ausgehärteten Gels pipettiert. Als Größenstandard wurden die Fast Ruler-DNA-Marker „*low range*“ und „*middle range*“ benutzt. Die DNA-Banden wurden anschließend auf einem Transilluminator mit UV-Licht sichtbar gemacht, fotografiert und aus dem Gel geschnitten. Aus Agarosegelen geschnittene DNA wurde dann mit dem QIAEXII Gel Extraction Kit nach den Angaben des Herstellers gereinigt und in 20 - 50 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert.

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

50 µl *E. coli* XL1-blue Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, mit der zu transformierenden Plasmid-DNA (20 - 200 ng) gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Hitzeschock für 60 s bei 42 °C und 2 min Inkubation auf Eis wurden die Ansätze mit 450 µl vorgewärmtem SOC-Medium versetzt und bei 37 °C für 45 min auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurden unterschiedliche Mengen der Bakteriensuspension auf Antibiotika-enthaltenden LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.3.5 Plasmidpräparation

Zu der Präparation von Plasmiden aus Bakterien wurden die QIAspin Plasmid Mini, Midi und Maxi-Kits oder das Invisorb Plasmid Mini-Kit entsprechend den Herstellerprotokollen verwendet. Die präparierte DNA wurde mit ddH<sub>2</sub>O eluiert.

### 2.2.3.6 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration in Wasser gelöster DNA und RNA wurde durch Messung der Absorption ( $\lambda = 260 \text{ nm}$ ) an einem Nanodrop1000-Gerät bestimmt und mit der mitgelieferten Software berechnet.

### 2.2.3.7 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Für die Sequenzierung von DNA wurde das ABI BigDye Terminator 3.1 Kit benutzt. Bei der verwendeten Kettenabbruch-Methode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) werden im Verlauf einer linearen PCR in Anwesenheit Fluorophor-markierter Didesoxyribonukleotide Kettenabbruchfragmente jeder möglichen Nukleotidzahl generiert. Diese werden

anschließend ihrer Nukleotidanzahl entsprechend aufgetrennt und das terminale Didesoxyribonukleotid anhand des unterschiedlichen Fluorophors identifiziert.

Verwendet wurden die in Tabelle 2.1 angegebenen Primer. Die generierten PCR-Produkte der zu sequenzierenden Proben wurden im hausinternen Sequenzierlabor des RKI gereinigt, elektrophoretisch aufgetrennt und die Elektropherogramme mit der Sequencing Analyses 3.7 Software ausgewertet.

### Ansatz

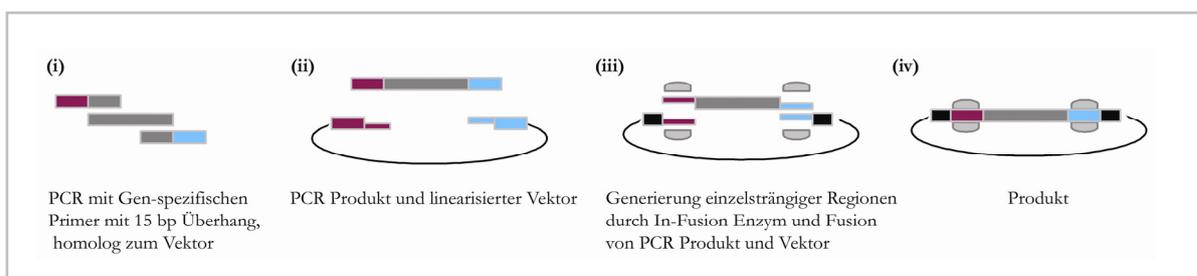
Template	1-3 ng (Fragmentgröße 100-200 Nt) 3-10 ng (Fragmentgröße 200-500 Nt) 10-20 ng (Fragmentgröße 500-1000 Nt) 150-300 ng (Plasmid-DNA)
Primer (10 µM)	1 µl
BigDye 3.1	1 µl (enthält die Polymerase, dNTPs + Fluorophor-markierte ddNTP)
5x Puffer ABI	1,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	Ad 10 µl

### PCR-Programm

Denaturierung	95 °C	2 min	
Denaturierung	95 °C	10 s	
Annealing	50-55 °C	5 s	25 Zyklen
Elongation	60 °C	4 min	
Pause	4 °C	∞	

#### 2.2.3.8 Herstellung von H5N1-NS-Segment-enthaltenden pHW2000-Plasmiden

Für die Darstellung der pHW2000-H5N1-NS-Plasmide wurde das pHW2000-Plasmid durch *BsmB1*-Behandlung linearisiert und mit dem QIAquick PCR Purification Kit gereinigt. Die H5N1-NS-vRNA wurde in einer Reversen Transkriptasereaktion in cDNA transkribiert. Die cDNA wurde mit den BD-Uni-NS-Primern, die zum Plasmid homologe Überhänge von 15 Nukleotiden besitzen, mittels PCR amplifiziert und durch Agarosegelextraktion aufgereinigt. Die mit den H5N1-NS-Segmenten herzustellenden pHW2000-Plasmide wurden dann mit dem In-Fusion PCR Klonierungssystem (Abbildung 2-1) generiert.



**Abbildung 2-1: Schematische Darstellung des BD In-Fusion PCR-Klonierungssystems.** Erläuterungen im Text.

Das generierte DNA-Fragment (Abbildung 2-1i ) mit den entsprechenden Überhängen (30 ng) und 50 ng des linearisierten pHW2000-Vektors wurden gemischt, mit ddH<sub>2</sub>O auf 10 µl aufgefüllt, zu dem lyophilisierten In-Fusion Reaktionsansatz gegeben und 15 min bei 37 °C und 15 min bei 50 °C inkubiert (ii). Das im Reaktionsansatz enthaltene Enzym, eine Pockenvirus DNA-Polymerase mit 3'-5'-Exonukleaseaktivität, generiert Einzelstrangbereiche an den Enden des PCR-Produktes (iii), die anschließend über die homologen Bereiche im Plasmid fusioniert werden (iv). Die Ligation der aneinander gelagerten homologen Bereiche des Insert-Plasmid-Komplexes erfolgt nach Transformation des Reaktionsgemisches in *E. coli* durch eine bakterielle Ligase. Für die Transformation wurden die Reaktionsansätze mit 40 µl TE-Puffer (im Kit enthalten) verdünnt und 2,5 µl der Verdünnungen dann in mitgelieferte kompetente BD Fusion-Blue *E. coli* nach Herstellerangaben transformiert.

Erfahrungsgemäß werden bei Verwendung dieses Kits nur wenige (oft < 10) Klone nach Transformation erhalten, die aber überwiegend das gewünschte Konstrukt enthalten. Die erhaltenen Klone wurden in 2x YT-Medium bei 37 °C vermehrt und aus den Kulturen die Plasmide im kleinen Maßstab aufgereinigt (Abschnitt 2.2.3.5) und sequenziert (Abschnitt 2.2.3.7). Bei nachgewiesener wt-NS-Sequenz wurde ein Teil der entsprechenden, bei 4 °C gelagerten, Bakteriensuspensionen erneut vermehrt und die Plasmide dann per QIASpin Plasmid Maxi Kit aufgereinigt.

### 2.2.3.9 vRNA-Transfektionsexperimente und *real time*-PCR-Versuche

Für die unter Abschnitt 3.5 durchgeführten Untersuchungen zum vRNA-Gehalt in infizierten Zellen, wurde aus infizierten A549-Zellen (moi = 1) mit dem RNeasy Kit die gesamte zelluläre RNA 10 h nach Infektion aufgereinigt und photometrisch auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt. Die im Folgenden als Gesamtzell-RNA-Präparation bezeichnete RNA wurde dann entweder nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase (CIAP), RNase-Verdau oder unbehandelt in frische A549-Zellen transfiziert oder per *real time*-PCR untersucht.

Um die in den Gesamtzell-RNA-Präparationen enthaltene 5'-triphosphorylierte v- und cRNA zu dephosphorylieren, wurden je 10 µg Gesamtzell-RNA mit 5 U CIAP, 20 U RNasin in 20 µl Ansätzen für 3 h bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsansätze und die parallel ohne Enzym mitgeführten Kontrollansätze mit dem RNeasy-Kit aufgereinigt und die Konzentration der Eluate erneut bestimmt. Weiterhin wurden je 2 µg der Gesamtzell-

RNA-Präparationen mit 2 U RNase-III oder 200 U RNase-I in den entsprechenden Puffern in 10 µl Gesamtvolumen für 2 h bei 37 °C behandelt. Enzymbehandelte oder unbehandelte RNA wurde anschließend mit LipofectAMINE2000 in A549-Zellen transfiziert und nach 8 h der IFNβ-Gehalt in den Zellkulturüberständen bestimmt.

Der Gehalt 5'-triphosphorylierter vRNA-Enden wurde per *real time*-PCR-Analyse anhand der Kopienzahl des 5'-Endes der Matrix-vRNA abgeschätzt. Dazu wurde ein entsprechender Bereich der Matrix-vRNA und der Tubulin-mRNA mit den in Tabelle 2-1 angegebenen entsprechenden *reverse*-Primern in einer Reversen Transkriptasereaktion (M-MLV Reverse Transkriptase) nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Die Anzahl der cDNA-Kopien wurde dann mittels TaqMan-Untersuchungen bestimmt.

**Ansätze:** Template + 10x Puffer + 5 mM MgCl<sub>2</sub> + 100 µM je dNTP + 0,5 U Platinum Taq DNA-Polymerase in 25 µl Ansätzen. Für die Bestimmung der Tubulin-cDNA-Anzahl wurden abweichend 4,5 mM MgCl<sub>2</sub> verwendet.

**PCR-Programm:** 95 °C für 5 min und dann 45-mal 95 °C für 15 s und 60 °C für 30 s in einem Stratagene Mx3000P-Gerät.

Neben der M-Segment-cDNA-Anzahl relativ zu dem Tubulin-cDNA-Gehalt wurde auch die Konzentration der M-Segment-cDNA anhand eines Standards bestimmt. Dieser Standard bestand aus sequentiellen 1:10 Verdünnungen eines Plasmids bekannter Konzentration, das ein H5N1-M-Segment enthielt. Des Weiteren wurde analog ein weiterer Standard mit dem M-Segment eines Influenzavirus vom H1-Subtyp mitgeführt. Beide Standards zeigten zueinander kaum Unterschiede im Ergebnis der *real time*-PCR-Versuche und gemittelt über alle Versuche eine Reaktionseffizienz von 95 % an.

### 2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

#### 2.2.4.1 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

In der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Lämmli, 1970) werden Proteine überwiegend anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt. In einer Mini-Protean3-Gießvorrichtung wurde zwischen zwei entfetteten Glasplatten mit einem Abstand von 0,75 mm oder 1,5 mm das Trenngel und nach dessen Polymerisierung das Sammelgel gegossen. Durch einen Kamm im Sammelgel wurden Taschen zur Probenbeladung gebildet. Die Proben wurden mit 6x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei

95 °C inkubiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 – 150 V in vertikalen Laufapparaturen.

Zusammensetzung der SDS-Gele	Trenngel			Sammelgel
	7,5 %	12,5 %	15 %	5 %
30% Acrylamid/Bis (29:1)	2,6 ml	4,1 ml	5,0 ml	0,83 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml			
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)				1,25 ml
H <sub>2</sub> O	4,7 ml	3,2 ml	2,8	
10 % SDS	100 µl			50 µl
10 % APS	100 µl			50 µl
TEMED	6 µl			6 µl

**Tabelle 2-3: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele für die diskontinuierliche denaturierende Gelelektrophorese.**

#### 2.2.4.2 Western Blot

Per SDS-PAGE aufgetrennte Proteinproben wurden aus dem Gel im *semidry*-Blotverfahren auf Nitrozellulose-Membranen übertragen. Das Gel, die Membran und die verwendeten Whatman-Papiere wurden vorher in *semidry*-Blotpuffer äquilibriert. Geblottet wurde für 60 - 90 min (je nach Molekulargewicht der interessierenden Proteine und Dicke des Gels) bei 80 mA pro Gel.

Zur Detektion und Analyse bestimmter Proteinbanden auf der Membran wurde diese 1 h in 3 % fettfreiem Magermilchpulver/TBS-T und dann mit dem primären Antikörper in 0,5 % Magermilchpulver/TBS-T für mindestens 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach mehrfachem Waschen in TBS-T für je 5 min folgte die Inkubation mit sekundären Spezies-spezifischen Antikörpern in 0,5 % Magermilchpulver/TBS-T für 1 h bei RT. Die verwendeten Antikörper und deren Verdünnungen sind in Tabelle 2-2 angegeben. Primäre und sekundäre Antikörper gegen phosphorylierte Proteine und Fluorophor-markierte Sekundärantikörper wurden in 5 % BSA/TBS-T verdünnt. Nach viermaligem Waschen wurde entweder ein durch die an die sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (HRP) erzeugtes Chemolumineszenzsignal erfasst oder die Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper an einem Li-Cor Odyssey Gerät digital detektiert.

#### 2.2.4.3 Multiplex-ELISA und IFNβ-ELISA

Die Konzentrationsbestimmung in das Zellkulturmedium sekretierter Zytokine erfolgte per ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Dabei bindet das zu messende Zytokin an einen an eine feste Matrix (Zellkulturgefäß, bzw. Fluorophor-gekoppelte Partikel in den Multiplex-ELISA) gekoppelten Antikörper und wird im nächsten Schritt von einem weiteren Antikörper gebunden (*Sandwich-ELISA*). Die Menge des so gebildeten Antikörper-Zytokin-Antikörper-Komplexes wurde entweder über die Aktivität von an den Zweitantikörper

gekoppelten Enzymen (IFN $\beta$ -ELISA) bestimmt, oder fluorimetrisch über einen weiteren Fluorophor-markierten Antikörper der den Zweitantikörper bindet (Multiplex-ELISA).

Sämtliche ELISA wurden inklusive aller Standards und Kontrollen gemäß den Herstellervorgaben durchgeführt. Die Messung und Auswertung der Multiplex-ELISA erfolgte auf einer Luminex100-Plattform mit Hilfe der mitgelieferten Software.

#### 2.2.4.4 Reporterstudien

Um die Aktivität bestimmter zellulärer Transkriptionsfaktoren zu untersuchen, wurden Versuche mit dem Dualen Luziferase-Kit (Promega) durchgeführt. Dazu wird ein Plasmid mit einem Luziferasegen (hier aus dem Leuchtkäfer (*Firefly*)) unter der Kontrolle eines möglichst nur von diesem Transkriptionsfaktor abhängigen Promotors, sowie ein weiteres Plasmid, von dem konstitutiv eine andere Luziferase-mRNA (hier aus der Gemeinen Seefeder (*Renilla*)) transkribiert wird, in die zu untersuchenden Zellen kotransfiziert. Die Zellen werden dann je nach Versuch stimuliert. Anhand der konstitutiv exprimierten Luziferase wird eine mögliche unterschiedliche Transfektionseffizienz über verschiedene Ansätze korrigiert und die Expression der Reporter-Luziferase ermöglicht Aussagen zu der Aktivität des entsprechenden Transkriptionsfaktors unter den Versuchsbedingungen. Die Luziferaseexpression wird dabei indirekt über deren Aktivität in entsprechenden Zelllysaten bestimmt.

Um zu untersuchen, ob die Überexpression verschiedener HA-Proteine eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B auslöst, wurden 0,75  $\mu$ g vorhandener pHW2000-Plasmide mit den entsprechenden HA-Segmenten und die Luziferaseplasmide (50 ng pNF- $\kappa$ B-luc und 10 ng pTK-RL-luc) je Vertiefung einer 12-Kalottenplatte in 293T-Zellen kotransfiziert. 24 - 48 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Luziferaseaktivitäten entsprechend dem Herstellerprotokoll bestimmt.

Um zu untersuchen, wie gut die NS1-Proteine die Aktivierung des humanen IFN $\beta$ -Promotors unterdrücken, wurden je 0,75  $\mu$ g der pHW2000-NS-Plasmide mit 50 ng p125-luc und 10 ng pTK-RL-Luc in 293T-Zellen in 12-Kalottenplatten kotransfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit Pan-delNS1 (moi = 1) infiziert und 16 h nach Infektion die Zellen nach dem Herstellerprotokoll lysiert und die Luziferaseaktivitäten bestimmt. Da sich 293T-Zellen leicht vom Zellkulturgefäß lösen, wurden die Zellkulturplatten vor den Versuchen mit poly-D-Lysin behandelt.

### 3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der in Abschnitt 1.4 formulierten Fragestellung anhand von zwei H5N1-Patientenisolaten, A/Hongkong/156/97 und A/Thailand/1 (Kan-1)/2004 (HK/97 und Thai/04) und den drei aviären H5N1-Isolaten A/Chicken/Indonesien/R132/2004, A/Duck/Vietnam/TG24-01/2005 und A/Common Buzzard/Berlin/1/2006 (Ch/Ind, Duck/VN und Buzz/Bln) nachgegangen. Diese wurden vergleichend zu dem saisonalen H3N2-Stamm A/Panama/2007/1999 (Pan/99) untersucht. Da insbesondere die Funktionalität der H5N1-NS1-Proteine untersucht werden sollte, wurde für weitere Vergleiche auch eine NS1-Deletionsmutante des Pan/99-(H3N2)-Stammes, das Pan-delNS1 Virus, mitgeführt.

Zu Beginn wurde die Vermehrungsfähigkeit der verschiedenen Influenza A Virusisolate in humanen Zellen untersucht und die dabei ausgelöste Typ I IFN-Sekretion untersucht (Abschnitt 3.1) und deren Einfluss auf die Vermehrungsfähigkeit der Virusisolate analysiert (Abschnitt 3.2). Es sollte so überprüft werden, wie weit bereits publizierte Ergebnisse zu der Aktivierung des Typ I IFN-Systems durch H5N1-Stämme und deren möglicherweise IFN-insensitive Vermehrung auf die im Folgenden verwendeten humanen Zellkultursysteme und Viren zutreffen. Anschließend wurden beobachtete Unterschiede zwischen den H5N1-Stämmen und zu saisonalen Influenzaviren näher untersucht (Abschnitte 3.3 bis 3.5).

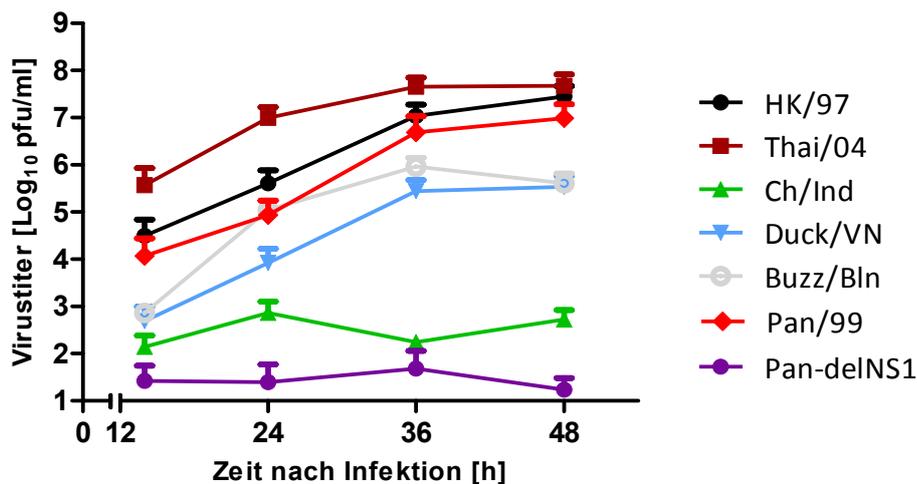
#### **3.1 Vermehrung und Typ I IFN-Induktion der H5N1-Viren in humanen Zellen**

In einem ersten Schritt wurde die Vermehrungsfähigkeit der H5N1-Isolate auf verschiedenen humanen Lungenepithelzelllinien untersucht. Wie in der Einleitung erläutert, stellen Vögel das natürliche Reservoir von Influenza A Viren dar. Die Vermehrungsfähigkeit von Influenza A Viren in humanen Zellen ist abhängig von dem Rezeptorbesatz der zu infizierenden Zellen und Wechselwirkungen zwischen viralen und zellulären Proteinen, die sich deutlich zwischen Vögeln und Menschen unterscheiden könnten. Einige humane Lungenzellen präsentieren  $\alpha$ 2,3- und  $\alpha$ 2,6-verknüpfte Sialinsäurereste. Dies gilt beispielsweise für die im Folgenden verwendeten humanen A549- und Calu-3-Zellen (Cashman *et al.*, 2004; Zeng *et al.*, 2007) und auch für die aus Primaten stammenden VERO-Zellen, wie durch spezifische Färbung von  $\alpha$ 2,6- und  $\alpha$ 2,3-ständigen Sialinsäureresten mit entsprechenden Lektinen in der Arbeitsgruppe gezeigt wurde (V. Weinheimer, persönliche Mitteilung).

Die Vermehrungsfähigkeit der verwendeten H5N1-Isolate ist daher in den verwendeten humanen Zelllinien wahrscheinlich überwiegend von der funktionellen Interaktion viraler und zellulärer Proteine abhängig. Auf Grund speziesspezifischer Unterschiede in zellulären Proteinen können diese Interaktionen beeinträchtigt sein. Des Weiteren replizieren aviäre Influenzaviren bei etwa 42 °C im Darmtrakt von Vögeln, während die humanen Zellkulturen bei 37 °C gehalten werden. Auch dies könnte die Funktionalität einiger viraler Proteine, wie beispielsweise der Polymeraseproteine, einschränken oder verändern (Dalton *et al.*, 2006; Massin *et al.*, 2001). Die Vermehrungsfähigkeit von Influenza A Viren wurde im Folgenden anhand der zu bestimmten Zeiten nach Infektion in dem Zellkulturüberstand befindlichen Viruspartikel untersucht, die als Anzahl Plaque-bildender Einheiten [pfu/ml] auf MDCK-Zellen quantifiziert wurden.

### 3.1.1 Vermehrungsfähigkeit der H5N1-Influenzaviren in A549-Zellen

A549-Zellen stellen die am häufigsten zur Untersuchung von Influenzaviren verwendete humane respiratorische Zelllinie dar. Um die Vermehrungsfähigkeit der verschiedenen Viren zu untersuchen, wurden A549-Zellen mit einer Multiplizität von 0,01 infiziert und über einen Zeitraum von 48 h die Zunahme der im Zellkulturüberstand befindlichen Virusmengen verfolgt. Um eine effiziente Vermehrung des Pan/99 und Pan-delNS1-Stammes zu ermöglichen, wurde TPCK-behandeltes Trypsin zugesetzt. Die ermittelten Vermehrungskurven sind in Abbildung 3-1 dargestellt.

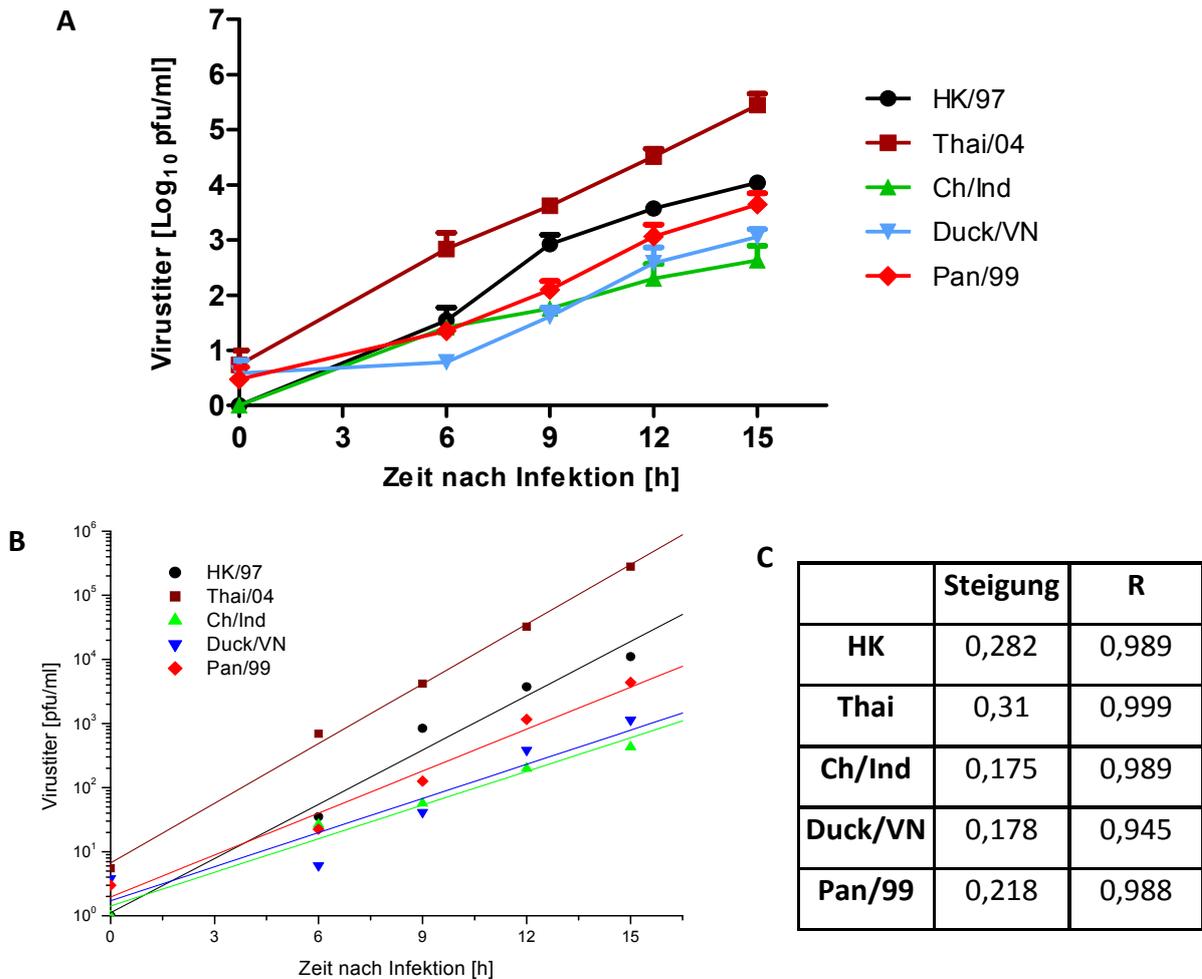


**Abbildung 3-1: Vermehrung der verwendeten H5N1- und H3N2-Virusstämme auf A549-Zellen.** A549-Zellen wurden mit einer Multiplizität von 0,01 pfu je Zelle ( $moi = 0,01$ ) infiziert. Die Konzentration Plaque-bildender Einheiten in den Zellkulturüberständen zu den angegebenen Zeitpunkten wurde auf MDCK-Zellen bestimmt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Mittelwerte (SEM) wieder und zeigen nur den positiven Schwankungsbereich. Gezeigt sind Daten aus mindestens drei Versuchen, die überwiegend in Duplikaten angesetzt wurden.

Es ist zu erkennen, dass sich die humanen H5N1-Isolate zu drei- bis vierfach höheren Titern im Vergleich zu dem saisonalen Pan/99-Stamm vermehrten. Die aus Vögeln isolierten H5N1-Stämme erreichten dagegen nur um mehr als das 10-fache niedrigere Titer als der Pan/99-Stamm. Das Pan-delNS1-Virus zeigte keine Vermehrung auf A549-Zellen. Da sich das Pan-delNS1-Virus vom Pan/99-Stamm nur durch das Fehlen des NS1-Proteins unterscheidet, verdeutlicht deren unterschiedliche Vermehrungsfähigkeit, wie wichtig das NS1-Protein für die Vermehrung von Influenza A Viren ist. Dieses Experiment zeigte auch, dass die humanen H5N1-Stämme in humanen Zellen offensichtlich einen Replikationsvorteil gegenüber den aviären Ch/Ind-, Duck/VN- und Buzz/BlN-Isolaten aufweisen.

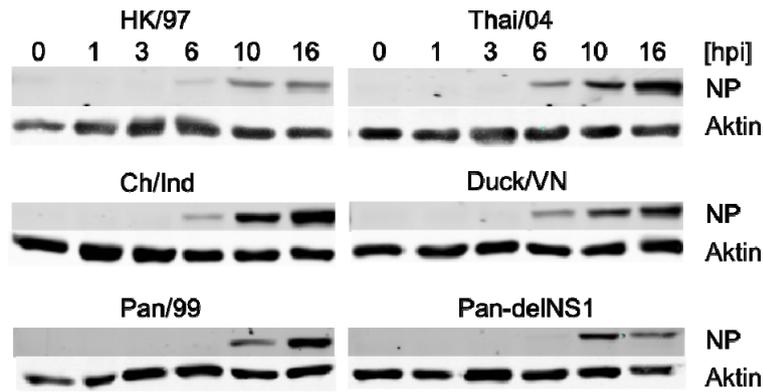
### **3.1.2 Monozyklische Vermehrung der H5N1-Influenzaviren in A549-Zellen**

Die multizyklischen Vermehrungskurven in Abbildung 3-1 zeigten bereits zum frühesten erfassten Zeitpunkt deutliche Unterschiede in den erreichten Titern der einzelnen Virusstämme. Dies weist auf große Unterschiede in den Replikationsgeschwindigkeiten oder aber der Sensitivität gegenüber antiviralen Abwehrreaktionen der untersuchten Stämme hin. Um dieser Beobachtung nachzugehen, wurde die Vermehrung der Viren auch zu frühen Zeitpunkten nach Infektion (monozyklische Vermehrung) untersucht. In Abbildung 3-2A ist eine schnellere Vermehrung der humanen H5N1-Isolate im Vergleich zu dem saisonalen Pan/99-Virus und den getesteten aviären Isolaten deutlich erkennbar. Um dies zu quantifizieren, wurden in Abbildung 3-2B Trendlinien an die Messwerte gelegt und deren Steigungen in Abbildung 3-2C angegeben. Die Steigungen verdeutlichen, dass die Bildung von Tochterviren im Fall der humanen H5N1-Isolate schneller geschieht als bei Pan/99 und den aviären Isolaten. Dies zeigt weiterhin, dass die in Abbildung 3-1 erkennbare geringe Vermehrungsfähigkeit der aviären H5N1-Isolate nicht auf eine unterschiedliche Anzahl primär infizierter Zellen zurückzuführen ist. Würden die einzelnen Stämme ähnlich schnell replizieren, aber durch die aviären H5N1-Isolate initial weniger Zellen infiziert werden, würden die Trendlinien ähnliche Steigungen aufweisen und für die aviären Isolate lediglich zu geringeren Titern verschoben sein.



**Abbildung 3-2: Monozyklische Vermehrung der H5N1- und H3N2-Viren auf A549-Zellen.** In drei unabhängigen Versuchen wurden A549-Zellen mit einer  $\text{moi}$  von 0,01 infiziert. Die Fehlerbalken geben den SEM in positiver Richtung wieder (A). An die zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmten Virustiter in den Zellkulturüberständen wurden lineare Trendlinien angelegt (B) und Steigungen und Bestimmtheitsmaße der linearen Trendlinien angegeben (C).

Weiterhin wurde, anhand des nach Infektion von A549-Zellen neu gebildeten NP-Proteins, per Western Blot untersucht, ob A549-Zellen möglicherweise unterschiedlich gut von den verwendeten Viren infiziert werden. Sollten weniger A549-Zellen durch die aviären H5N1-Stämme im Vergleich zu den anderen Viren infiziert worden sein, würde man einen geringeren NP-Gehalt in den entsprechenden Lysaten infizierter Zellen erwarten. Wie in Abbildung 3-3 zu erkennen ist, weisen mit den aviären H5N1-Isolaten infizierte A549-Zellen keinen geringeren NP-Gehalt im Vergleich zu mit den humanen H5N1-Isolaten und Pan/99 infizierten Zellen auf.



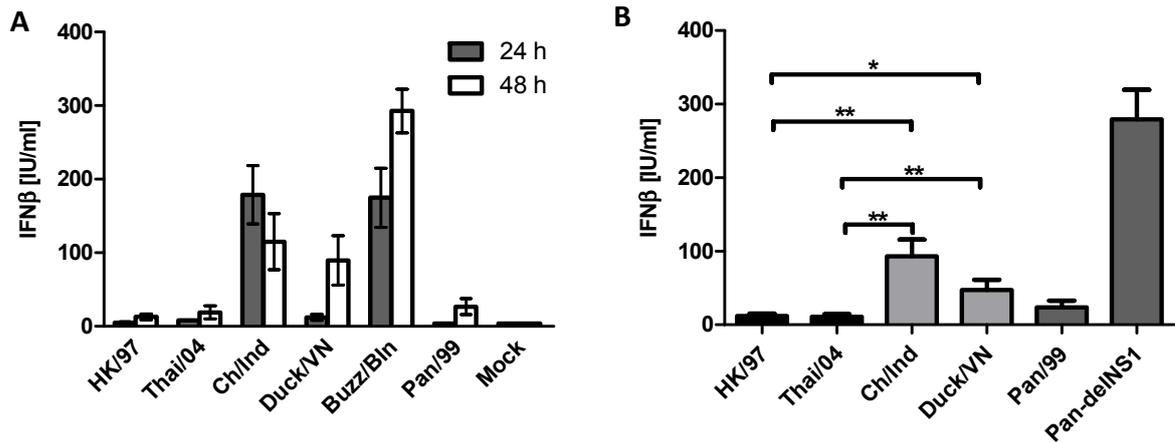
**Abbildung 3-3: NP-Gehalt in mit den angegebenen H5N1- und H3N2-Stämmen infizierten A549-Zellen.** A549-Zellen wurden infiziert ( $moi = 1$ ) und zu den angegebenen Zeiten nach Infektion lysiert [Stunden nach Infektion, hpi]. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis. Zum Vergleich aufgetragener Proteinmengen ist zelluläres Aktin gezeigt. Für die NP-Detektion wurde der in Tabelle 2.2 angegebene monoklonale Primärantikörper verwendet.

Das aviäre Isolat Buzz/Bln wurde in einigen Versuchen, wie beispielsweise in den in Abbildung 3-2 und 3-3 dargestellten, nicht mitgeführt, da es im ursprünglich geplanten Umfang dieser Arbeit nicht enthalten war. Für manche Analysen wurden allerdings Daten zu einem weiteren aviären H5N1-Isolat für eine gesicherte Interpretation als vorteilhaft erachtet. In diesem Fall wurden für das Buzz/Bln-Isolat einige Experimente wiederholt, wobei stets ursprünglich verwendete H5N1-Stämme mitgeführt wurden.

### 3.1.3 IFN $\beta$ -Sekretion Influenza A Virus-infizierter A549-Zellen

Für eine effiziente Replikation von Influenza A Viren ist die NS1-vermittelte Unterdrückung des nicht-adaptiven Immunsystems wesentlich (Garcia-Sastre *et al.*, 1998). In der Fachliteratur finden sich aber für einige H5N1-Viren Hinweise, dass sie das nicht-adaptive Immunsystem stark aktivieren. So wurde gezeigt, dass H5N1-Stämme nach Infektionen humaner Zellen die Typ I IFN-Gene stark aktivieren können (Chan *et al.*, 2005; Cheung *et al.*, 2002), was wesentlich zu einer Aktivierung des nicht-adaptiven Immunsystems beiträgt (Samuel, 2001). Saisonale Influenza A Viren blockieren die Aktivierung der Typ I IFN-Gene, wodurch die Sekretion von Typ I IFN unterdrückt wird.

Um zu untersuchen, wie stark die verfügbaren H5N1-Viren eine Sekretion von Typ I IFN auslösen, wurde die IFN $\beta$ -Konzentration in Zellkulturüberständen infizierter Zellen per ELISA bestimmt (Abbildung 3-4).



**Abbildung 3-4: IFNβ-Konzentration in A549-Zellkulturüberständen nach Infektion mit den H5N1- und H3N2-Stämmen.** Dargestellt sind per ELISA bestimmte IFNβ-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen während multizyklischer Vermehrung (A) 24 und 48 h nach Infektion (moi = 0,01, N ≥ 3, Mittelwerte +/- SEM) und 16 h nach Infektion mit hoher Multiplizität (B; moi = 1, N ≥ 3, Mittelwerte +/- SEM; \*p ≤ 0,05; \*\*p ≤ 0,01).

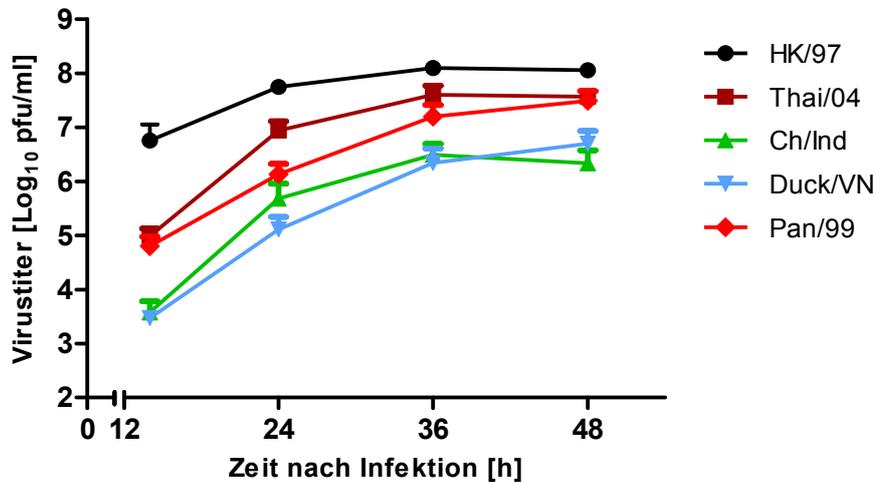
Es zeigte sich, dass die hier getesteten humanen H5N1-Isolate, HK/97 und Thai/04 in A549-Zellen auch unter verschiedenen Infektionsbedingungen nur ähnlich schwach wie das saisonale Pan/99-Virus eine Sekretion von IFNβ auslösten. Mit den aviären H5N1-Isolaten infizierte Zellen sekretierten dagegen deutlich mehr dieses Typ I IFN. Nach Infektion von A549-Zellen mit dem Pan-delNS1-Virus waren äußerst hohe IFNβ-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen nachweisbar (Abbildung 3-4B), da hier die Induktion der Typ I IFN-Gene nicht durch das virale NS1-Protein inhibiert wird (Garcia-Sastre *et al.*, 1998; Kochs *et al.*, 2009).

Während die humanen H5N1-Isolate in den bisher gezeigten Experimenten auf A549-Zellen eine etwas schnellere Vermehrung als das saisonale Pan/99-Virus zeigten und höhere Titer erreichten, wiesen die aviären H5N1-Isolate eine geringe Vermehrungsfähigkeit, eine langsame Replikation und eine starke Aktivierung des humanen Typ I IFN-Systems in A549-Zellen im Vergleich zu Pan/99 auf.

### 3.1.4 Vermehrungsfähigkeit der H5N1-Influenzaviren in Calu-3-Zellen

A549-Zellen sind humane Typ II-Pneumozyten, die aus Tumorzellen isoliert wurden. Um zu untersuchen in wie weit die Ergebnisse der Untersuchungen in A549-Zellen auch auf andere Zelllinien und Lungenepithelzelltypen übertragbar sind, wurden die bisher gezeigten Untersuchungen mit Calu-3-Zellen wiederholt. Calu-3-Zellen sind humane Lungenepithelzellen aus bronchialem Gewebe und sekretieren eine Protease, die eine

Zugabe von TPCK-Trypsin für eine effiziente Vermehrung saisonaler Influenzaviren unnötig macht (Zeng *et al.*, 2007).

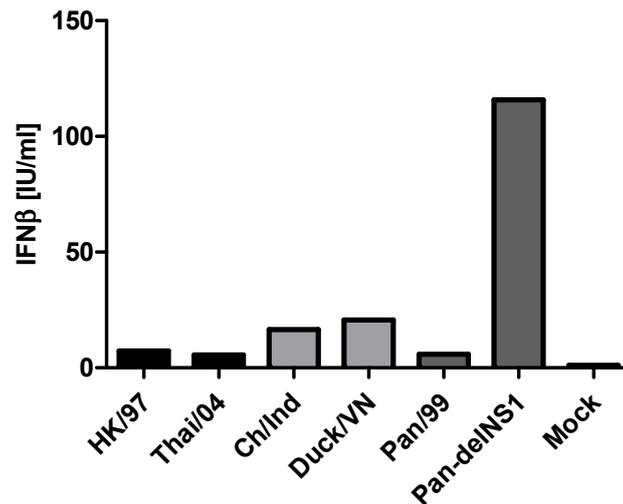


**Abbildung 3-5: Vermehrung der H5N1-Isolate und des Pan/99-Virus auf Calu-3-Zellen.** Dargestellt sind die Virustiter zu den angegebenen Zeitpunkten in den Zellkulturüberständen infizierter Calu-3-Zellen ( $\text{moi} = 0,01$ ,  $N \geq 2$ ). Die erreichten Titer der in der Abbildung angegebenen Virusstämme wurden mittels Plaqueassay auf MDCK-Zellen bestimmt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Mittelwerte (SEM) wieder und zeigen nur den positiven Schwankungsbereich. Gezeigt sind Daten aus zwei, teilweise drei Versuchen, die überwiegend in Duplikaten angesetzt wurden.

In Abbildung 3-5 sind eine bessere Vermehrung der humanen und eine geringere Vermehrung der aviären H5N1-Isolate im Vergleich zu Pan/99 in Calu-3-Zellen zu erkennen, ähnlich der Virusvermehrung in A549-Zellen. Allerdings sind die Unterschiede in den erreichten Titern zwischen den humanen und aviären H5N1-Isolaten etwas geringer als in A549-Zellen. Die aviären H5N1-Isolate vermehrten sich auf Calu-3-Zellen zu mehr als 10-fach (Duck/VN), beziehungsweise 1000-fach (Ch/Ind) höheren Titern im Vergleich zu A549-Zellen. Die Pan-delNS1-Variante vermehrte sich, wie in A549-Zellen, kaum.

### 3.1.5 Typ I IFN-Sekretion Influenza A Virus-infizierter Calu-3-Zellen

Um die in Calu-3-Zellen durch die Infektion mit den Virusstämmen ausgelöste Typ I IFN-Sekretion zu untersuchen, wurden die Zellen mit den verwendeten Virusstämmen infiziert ( $\text{moi} = 1$ ) und 16 h nach Infektion die IFN $\beta$ -Konzentrationen in den Zellkulturüberständen bestimmt (Abbildung 3-6).



**Abbildung 3-6: IFN $\beta$ -Konzentration in Zellkulturüberständen von Calu-3-Zellen nach Infektion mit den H5N1- und H3N2-Stämmen.** Die dargestellten IFN $\beta$ -Konzentrationen in den Zellkulturüberständen wurden 16 h nach Infektion der Calu-3-Zellen (moi = 1) mit den untersuchten Virusstämmen per ELISA bestimmt.

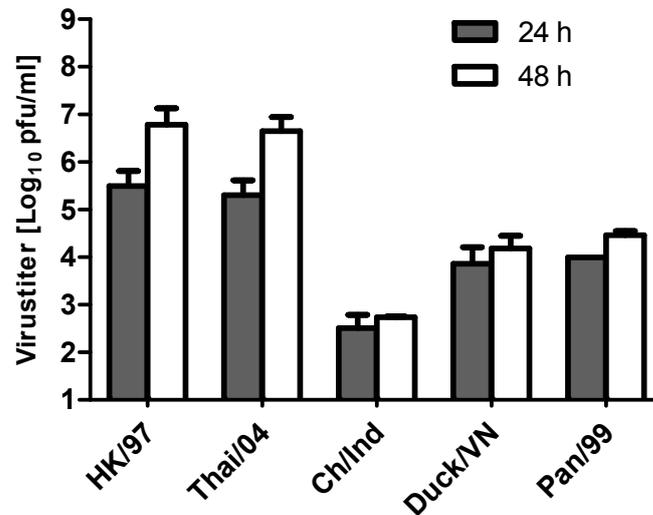
Nach Infektion von Calu-3-Zellen mit den aviären H5N1-Isolaten Ch/Ind und Duck/VN kommt es zu einer stärkeren IFN $\beta$ -Sekretion als nach Infektion mit den humanen H5N1-Isolaten und dem saisonalen Pan/99-Virus. Durch das Pan/99-del-NS1-Virus wurde wiederum die stärkste Sekretion von IFN $\beta$  ausgelöst. Dies entspricht dem Ergebnis auf A549-Zellen (Abbildung 3-4B). Ein Vergleich der jeweils nach Infektion mit den gut IFN-induzierenden Virusstämmen (Pan-delNS1, Ch/Ind und Duck/VN) gemessenen IFN $\beta$ -Konzentrationen zeigt aber auch, dass infizierte Calu-3-Zellen deutlich geringere Mengen an IFN $\beta$  sekretieren als infizierte A549-Zellen. Während die Ursache für diesen zelllinienspezifischen Unterschied unklar ist, könnte dies möglicherweise die bessere Vermehrung der aviären Stämme in Calu-3-Zellen im Vergleich zu der A549-Zelllinie erklären.

### 3.1.6 Virale Vermehrungsfähigkeit in primären humanen Zellen und Lungengewebe

Calu-3- und A549-Zellen sind permanente Zelllinien, die ursprünglich aus Tumorgewebe isoliert wurden. Um experimentelle Daten zu erhalten, die die *in vivo* Situation möglicherweise besser reflektieren, wurden die H5N1-Stämme auch in primären bronchialen Epithelzellen (NHBE) und humanen Lungengewebsbiopsien untersucht.

Die Versuche in NHBE-Zellen (Abbildung 3-7) zeigten eine zu Calu-3- und A549-Zellen ähnliche Vermehrungsfähigkeit der H5N1-Stämme: Die humanen H5N1-Isolate vermehrten sich zu hohen Titern, während die aviären Isolate und insbesondere der Ch/Ind-Stamm

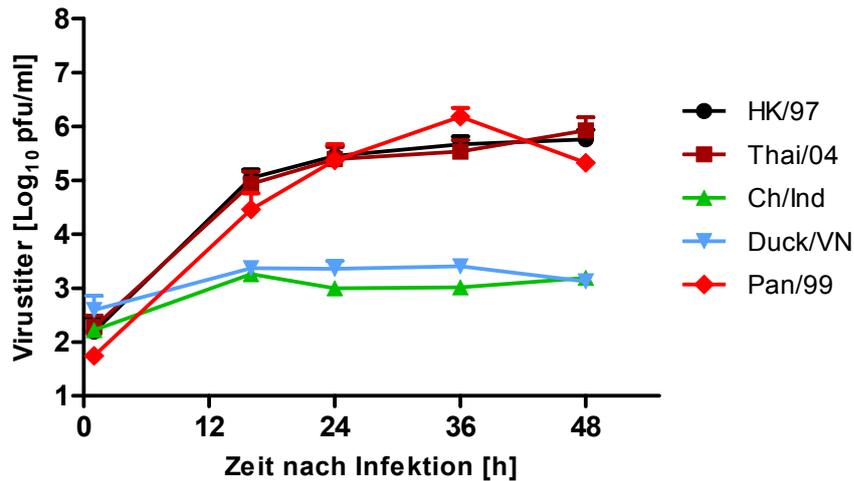
eine deutlich geringere Vermehrungsfähigkeit aufwiesen. Das Pan/99-Virus vermehrte sich in den NHBE-Zellen weniger effizient als in A549- und Calu-3-Zellen.



**Abbildung 3-7: Vermehrung der H5N1-Stämme und des saisonalen H3N2-Stammes auf NHBE-Zellen.** NHBE-Zellen wurden mit einer  $moi$  von 0,01 in Triplikaten infiziert und die Virustiter in den Zellkulturüberständen zu den angegebenen Zeitpunkten per Plaquetest auf MDCK-Zellen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Versuche + SEM.

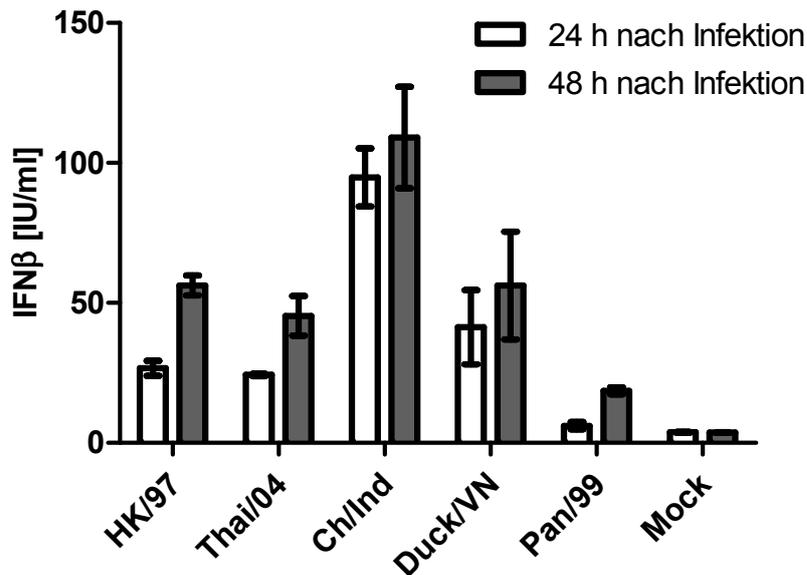
Die Vermehrung der verwendeten Viren und die durch sie ausgelöste IFN $\beta$ -Sekretion wurden auch in humanen Lungengewebsbiopsien untersucht. Die Lungenstücke sollten durch die Anwesenheit verschiedener Zelltypen, inklusive alveolärer Makrophagen und durch ihre komplexe Struktur die Bedingungen im unteren humanen Respirationstrakt deutlich besser reflektieren als homogene Zellkulturen permanenter Zelllinien oder primärer Zellen. Die Lungengewebsbiopsien entstammen Patienten, denen im Rahmen einer Lungendissektion Lungengewebe im Helios-Klinikum Berlin entnommen wurde. Für die Experimente wurden tumorfreie humane Lungenbiopsien verwendet, die von S. Hippenstiel und A. Becher (Charité-Klinikum, Berlin) freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden. Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit V. Weinheimer (RKI, FG 17) generiert.

Für die Untersuchung der Vermehrungsfähigkeit der untersuchten Viren und der durch sie ausgelösten Aktivierung einer Typ I IFN-Antwort wurden möglichst gleich große Lungengewebsstücke zweier Spender in Triplikaten mit jeweils  $4 \times 10^5$  pfu infiziert. Wie in Abbildung 3-8 zu erkennen ist, zeigten die humanen H5N1-Isolate eine ähnlich gute Vermehrungsfähigkeit wie der Pan/99-Stamm. Im Gegensatz dazu vermehrten sich die aviären H5N1-Isolate in den humanen Lungengewebe kaum.



**Abbildung 3-8: Vermehrung der H5N1-Stämme und des saisonalen Pan/99-Stammes in humanen Lungengewebsbiopsien.** Die Biopsien wurden in Scheiben geschnitten und möglichst gleich große Stücke mit einer 8-mm-Gewebestange ausgestanzt. Die so erhaltenen Stücke wurden in Triplikaten mit  $4 \times 10^5$  pfu der verwendeten Viren infiziert. Gezeigt sind Mittelwerte + SEM aus den Mittelwerten der Triplikate zweier Versuche mit Geweben jeweils unterschiedlicher Spender.

Die Infektion der Lungenstücke mit den aviären H5N1-Isolaten führte zu einer deutlich stärkeren Sekretion von IFN $\beta$  im Vergleich zu Pan/99 (Abbildung 3-9).



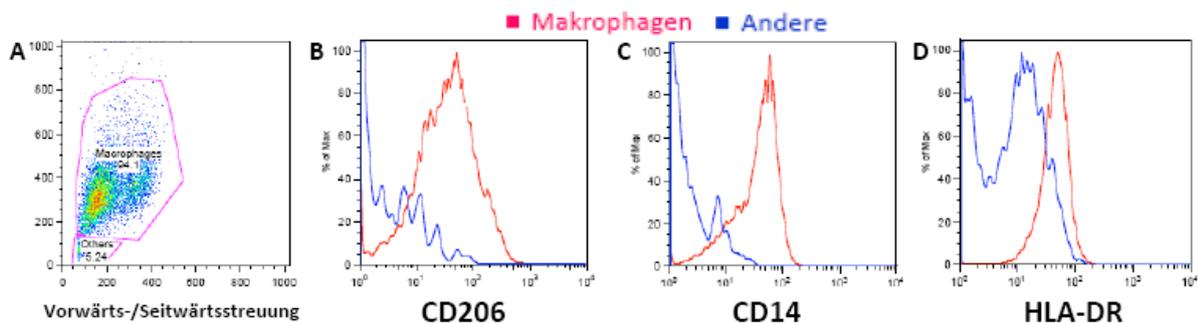
**Abbildung 3-9: Konzentration von IFN $\beta$  in den Zellkulturüberständen infizierter humaner Lungengewebsbiopsien.** Lungengewebsstücke zweier Spender wurden in Triplikaten mit  $4 \times 10^5$  pfu der Virusstämme infiziert und die IFN $\beta$ -Konzentrationen in den Zellkulturüberständen zu den angegebenen Zeitpunkten per ELISA bestimmt (Mittelwerte aus den Mittelwerten der jeweiligen Triplikate +/- SEM).

Auffällig war, dass auch die humanen H5N1-Isolate in den Lungengewebsbiopsien eine deutlich stärkere IFN $\beta$ -Sekretion im Vergleich zu Pan/99 induzierten. Eine stärkere Typ I IFN-Sekretion durch die humanen H5N1-Isolate im Vergleich zu Pan/99 wurde nur in den humanen Lungengewebsbiopsien, nicht aber auf den permanenten Zelllinien (Abbildung 3-4 und Abbildung 3-6) und auch nicht in anfänglichen Versuchen auf den primären NHBE-

Zellen (Daten nicht gezeigt) beobachtet. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Anwesenheit verschiedener Zelltypen in dem komplexeren Lungengewebsbiopsiemodell eine stärkere IFN $\beta$ -Induktion durch die H5N1-Stämme im Vergleich zu dem saisonalen Pan/99-Stamm bedingt.

### 3.1.7 Typ I IFN-Sekretion H5N1-Virus-infizierter humaner Makrophagenpräparationen

Durch die humanen H5N1-Isolate wurde in den Lungengewebsbiopsien eine stärkere Sekretion von IFN $\beta$  im Vergleich zu Pan/99 ausgelöst. Dies könnte aus Stamm-spezifischen Unterschieden resultieren, die in Lungenepithelzellen nicht deutlich werden. So ist bekannt, dass H5N1-Stämme im Vergleich zu saisonalen Influenza A Viren in Makrophagen die Typ I IFN-Gene stark aktivieren können und auch eine starke Sekretion anderer Zytokine auslösen (Cheung *et al.*, 2002). Makrophagen könnten demnach direkt zu den gemessenen IFN $\beta$ -Konzentrationen im Lungenmodell beitragen oder andere Zellen dazu stimulieren, größere Mengen IFN $\beta$  zu sekretieren. Eine durch die H5N1-Stämme in Makrophagen ausgelöste stärkere Immunantwort im Vergleich zu saisonalen Influenzaviren würde sehr wahrscheinlich auch die beobachtete Hyperzytokinämie in H5N1-Infizierten mit erklären können. Daher wurde untersucht, ob infizierte humane Makrophagen nach H5N1-Infektion mehr IFN $\beta$  sekretieren, als nach Infektion mit dem saisonalen H3N2-Stamm und in Abschnitt 3.1.8 auch die Sekretion weiterer Zytokine. Dazu wurden aus humanen Leukozytenpräparationen Monozyten isoliert und zu Makrophagen ausdifferenziert. Die ausdifferenzierten Makrophagenkulturen wurden dann mit spezifischen Antikörpern gefärbt und zytometrisch charakterisiert (Abbildung 3-10).

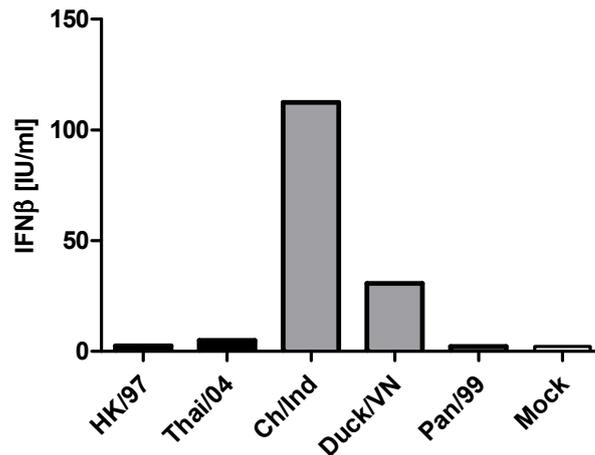


**Abbildung 3-10: FACS-Analyse der ausdifferenzierten Makrophagenkulturen.** Adhärenente Zellen wurden vom Boden der Zellkulturgefäße gelöst, gewaschen und mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern gefärbt. Zur Analyse wurde die Zellpopulation anhand der Größe und Granularität der Zellen in zwei Subpopulationen separiert (A). Die größere Subpopulation (> 90 % der Zellen) wurde als Makrophagenpopulation bezeichnet, die kleine Subpopulation einfach als ‚Andere‘. B-D: Histogramme der Fluoreszenzsignale getrennt nach Subpopulationen. Verwendet wurden Antikörper gegen CD206 (B), CD14 (C) und HLA-DR (D). Dargestellt ist das exemplarische Ergebnis für eine Makrophagenpräparation.

Die nach der Ausdifferenzierung in den Makrophagenpräparationen enthaltenen Zellen erschienen im Lichtmikroskop überwiegend als für Makrophagen typische, große, abgeflachte adhärente Zellen mit ausgeprägten Pseudopodien (Daten nicht gezeigt). Weiterhin enthielten die Kulturen einige kleine, nicht adhärente Zellen. Auf Grund der morphologischen Unterschiede sind diese Populationen durch ihre Lichtbrechungseigenschaften zytometrisch gut unterscheidbar (Abbildung 3-10A). Die großen Zellen in den Zellpopulationen (> 90 % der Gesamtzellpopulation) waren CD206, CD14 und HLA-DR positiv. Der Anteil an kleineren Zellen setzte sich wahrscheinlich aus mehreren Zellpopulationen zusammen, die teilweise CD3, CD56 und HLA-DR-positiv waren. Die Zellen in der Makrophagenpopulation erschienen homogen und zeigten keine positive Färbung von CD3 und CD56 und eine schwache Färbung von CD86 (Daten teilweise nicht gezeigt).

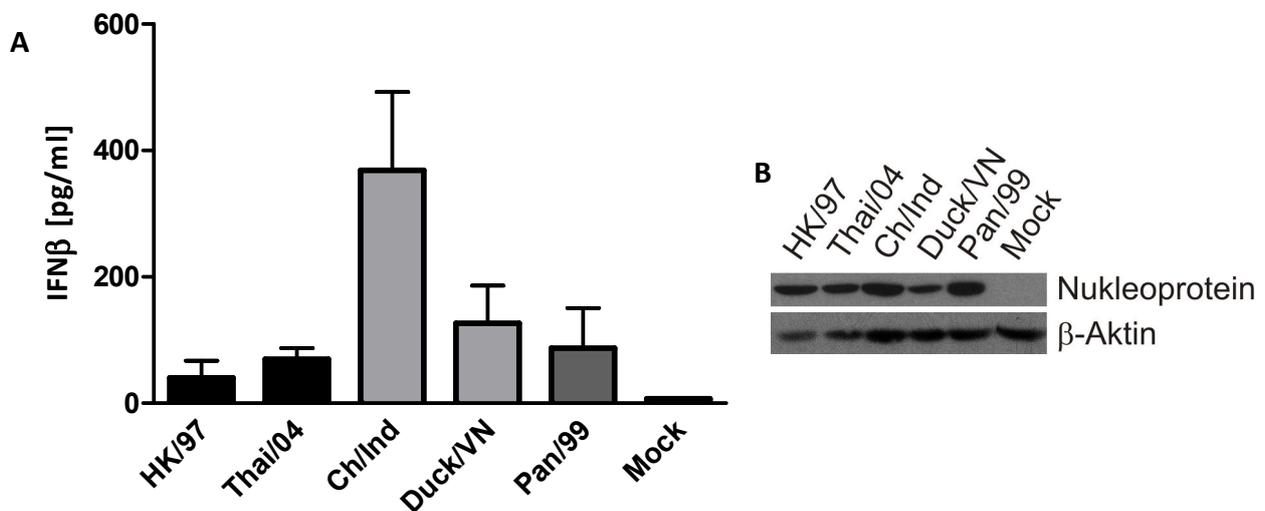
CD206 ist der Makrophagen-Mannoserezeptor, der nur von Makrophagen und einigen dendritischen Zellen exprimiert wird. Dendritische Zellen sind allerdings nicht adhärent und wären bei der Präparation und den nachfolgenden Waschschrritten ausgewaschen worden. CD14 ist ein allgemeiner Marker für monozytäre Zellen und HLA-DR ist eine Untereinheit des MHC-II-Rezeptors, charakteristisch für antigenpräsentierende Zellen. Die Zellen der Makrophagenpopulation erschienen weiterhin schwach CD86 positiv was typisch für monozytäre Zellen ist. Dendritische Zellen zeigen ein deutliches CD86-Signal, wodurch sich dendritische Zellen weiterhin von Makrophagen unterscheiden. CD3 ist ein T-Zellmarker und eine CD56-Expression ist typisch für natürliche Killerzellen. Beide Antikörper färbten nur Zellen in der kleineren Subpopulation an, was auf geringe Anteile nicht ausgewaschener T- und NK-Zellen in den Präparationen hinweist.

Nachdem durch FACS-Analyse gezeigt wurde, dass die ausdifferenzierten Zellpräparationen zu über 90 % aus Makrophagen bestanden, wurden die Zellen mit den verschiedenen H5N1-Isolaten, Pan/99 und Pan-delNS1 infiziert und nach 24 h die IFN $\beta$ -Konzentration in den Zellkulturüberständen und der NP- und NS1-Gehalt in den Lysaten der infizierten Zellen bestimmt. Mit dem verwendeten IFN $\beta$ -ELISA wurde dazu nur der IFN $\beta$ -Gehalt von Zellkulturüberständen einer Makrophagenpräparation bestimmt (Abbildung 3-11).



**Abbildung 3-11: IFNβ-Konzentration in Zellkulturüberständen von Makrophagen, nach Infektion mit den H5N1-Stämmen und Pan/99.** Die IFNβ-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen humaner Makrophagen wurden 24 h nach Infektion (moi = 2, ein Versuch) per ELISA bestimmt.

Das Experiment wurde mit Makrophagenpräparationen von drei weiteren Spendern wiederholt, allerdings wurden die IFNβ-Konzentrationen hier im Rahmen eines Multiplex-ELISA (siehe Abschnitt 3.1.8) bestimmt und sind daher in Abbildung 3-12 in pg/ml angegeben.



**Abbildung 3-12: IFNβ-Konzentrationen in Zellkulturüberständen von Makrophagen, die mit den H5N1-Stämmen und Pan/99 infiziert wurden.** Im Rahmen eines Multiplex-ELISA-Versuches wurden die IFNβ-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen infizierter humaner Makrophagen (moi = 2, 24 h nach Infektion (Mittelwerte +/- SEM, N = 3, jeweils in Triplikaten) gemessen (A). Um die Infektion/Replikation der Viren in humanen Makrophagen zu kontrollieren, wurde der NP-Gehalt in den Makrophagen 24 h nach Infektion per Western Blot untersucht (B, ein exemplarisches Ergebnis).

In den insgesamt vier untersuchten Makrophagenpräparationen (Abbildung 3-11 und 3-12) lösten die humanen H5N1-Isolate eine zu dem Pan/99-Stamm vergleichbar geringe Sekretion von IFNβ aus. Nach Infektion mit den aviären H5N1-Isolaten sekretierten

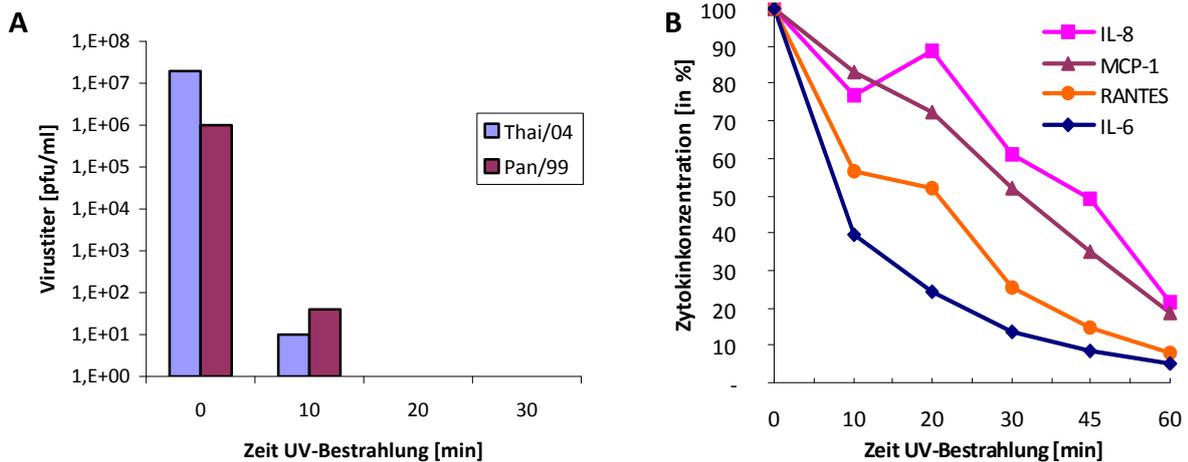
Makrophagen dagegen deutlich mehr IFN $\beta$  als mit den humanen Isolaten infizierte. Diese Ergebnisse sind demnach vergleichbar mit den Befunden auf den Lungenepithelzelllinien. Die Experimente mit den Makrophagen wiesen darauf hin, dass die beobachtete starke IFN $\beta$ -Sekretion in H5N1-infizierten Lungengewebsbiopsien nicht auf eine zu den Epithelzelllinien unterschiedliche Modulation des Typ I IFN-Systems in Makrophagen zurückzuführen ist. Da Makrophagen in den Lungenstücken nachweisbar sind und auch infiziert werden (V. Weinheimer, persönliche Mitteilung), könnten sie die IFN-Antwort anderer Zellen beispielsweise durch zytokinvermittelte Stimuli verstärken. Andererseits, könnten auch Zytokine, die neben IFN $\beta$  von Epithelzellen sekretiert werden, in anderen Zelltypen die IFN $\beta$ -Sekretion verstärken. Daher wurden im folgenden Abschnitt die Konzentrationen weiterer von Lungenepithelzellen und Makrophagen sekretierter Zytokine bestimmt. Sollte sich zeigen, dass sowohl die humanen als auch die aviären H5N1-Stämme in dem einen oder anderen Zelltyp die Sekretion bestimmter Zytokine stärker stimulieren als der saisonale H3N2-Stamm, könnte dies ein Erklärungsansatz für die höhere Pathogenität der H5N1-Stämme sein.

### **3.1.8 Untersuchung der Zytokinsekretion Influenza A Virus-infizierter Zellen**

Wie in der Einleitung beschrieben, wurden insbesondere im Serum von Patienten mit fatalen H5N1-Infektionen höhere Zytokinkonzentrationen gefunden, als bei Menschen mit saisonaler Influenza. Dies betraf insbesondere die Zytokine IP-10, MCP-1, MIG, IL-6, IL-8, IL-10 und IFN $\gamma$  (de Jong *et al.*, 2006). Manche Forscher sehen Lungenepithelzellen als ‚Sentinel‘ des nicht-adaptiven Immunsystems, die die folgende Immunantwort durch die Sekretion bestimmter Zytokine prägen (Hippenstiel *et al.*, 2006). Neben Lungenepithelzellen könnten auch spezialisierte Immunzellen des nicht-adaptiven Immunsystems (beispielsweise Makrophagen oder dendritische Zellen) Quelle der als Antwort auf H5N1-Infektionen stark sekretierten Zytokine sein (Aldridge *et al.*, 2009; Cheung *et al.*, 2002; Sandbulte *et al.*, 2008).

Im Folgenden wurde der Frage nachgegangen, ob Lungenepithelzellen als Antwort auf eine Infektion mit den verschiedenen Influenzaviren, qualitativ und/oder quantitativ unterschiedliche Zytokine sekretieren. Dazu wurde ein auf fluoreszierenden Partikeln basierender Multiplex-ELISA verwendet, der es erlaubt die Konzentrationen mehrerer Zytokine in einer Probe Zellkulturüberstand simultan zu bestimmen. Diese Messungen waren nicht in einer Laborumgebung der biologischen Sicherheitsstufe 3 durchführbar. Es

war daher zuvor nötig Protokolle für die Virus-Inaktivierung in den Zellkulturüberständen zu etablieren. Durch die Inaktivierung durfte aber auch die Messung der Zytokinkonzentrationen nicht gestört werden. Deshalb wurden Zellkulturüberstände von infizierten Zellen mit ultraviolettem Licht für bis zu 60 Minuten bestrahlt (Stratagene *CrossLinker*, max. Intensitätseinstellung) und die Konzentration replikationskompetenter Viruspartikel per Plaqueassay auf MDCK-Zellen analysiert (Abbildung 3-13A). Nach 10 Minuten UV-Bestrahlung waren nur noch wenige infektiöse Viruspartikel nachweisbar. Daher wurde anschließend getestet, ob die Überstände nach 15 Minuten UV-Bestrahlung noch infektiös für Bruteier sind. Dieser Test ist sensitiver als ein Plaqueassay und zeigte keine replikationskompetenten Viruspartikel an (Daten nicht gezeigt). Da durch UV-Bestrahlung auch Proteine denaturiert werden, wurde einmalig die Abnahme der Konzentrationen einiger Zytokine in Abhängigkeit von der Einwirkdauer des UV-Lichts bestimmt (Abbildung 3-13B).



**Abbildung 3-13: Abnahme infektiöser Viruspartikel und der per Multiplex-ELISA messbaren Zytokinkonzentration durch UV-Bestrahlung.** In einem BIO-LINK CrossLinker (Vilber Lourmat) wurden jeweils 500 µl Zellkulturüberstand bei maximaler Intensität für die angegebene Dauer bestrahlt (Wellenlänge 254 nm, etwa 14 cm Abstand zur Lichtquelle). Anschließend wurde der Gehalt replikationskompetenter Viruspartikel per Plaqueassay (A) oder die Konzentration verschiedener Zytokine mittels Multiplex-ELISA (B) untersucht.

Eine Bestrahlungsdauer von 15 min genügte, um die Viren in einem 500 µl-Volumen in einer 12-Kalottenplatte ohne Deckel zu inaktivieren. Wie in Abbildung 3-13B zu erkennen, kommt es durch eine 15-minütige Bestrahlung allerdings zu einer Abnahme der nachweisbaren Zytokinkonzentrationen um 20 - 70 %. Die in den folgenden Experimenten ermittelten Zytokinkonzentrationen können demnach deutlich geringer sein, als die Konzentrationen, die während den Infektionen tatsächlich in den Zellkulturüberständen auftraten. Während dies einen Vergleich mit Literaturdaten stark erschwert, ist die

Abnahme der messbaren Zytokinkonzentrationen für den Vergleich der sekretierten Zytokinmengen nach Infektion mit den verschiedenen Viren eher vernachlässigbar.

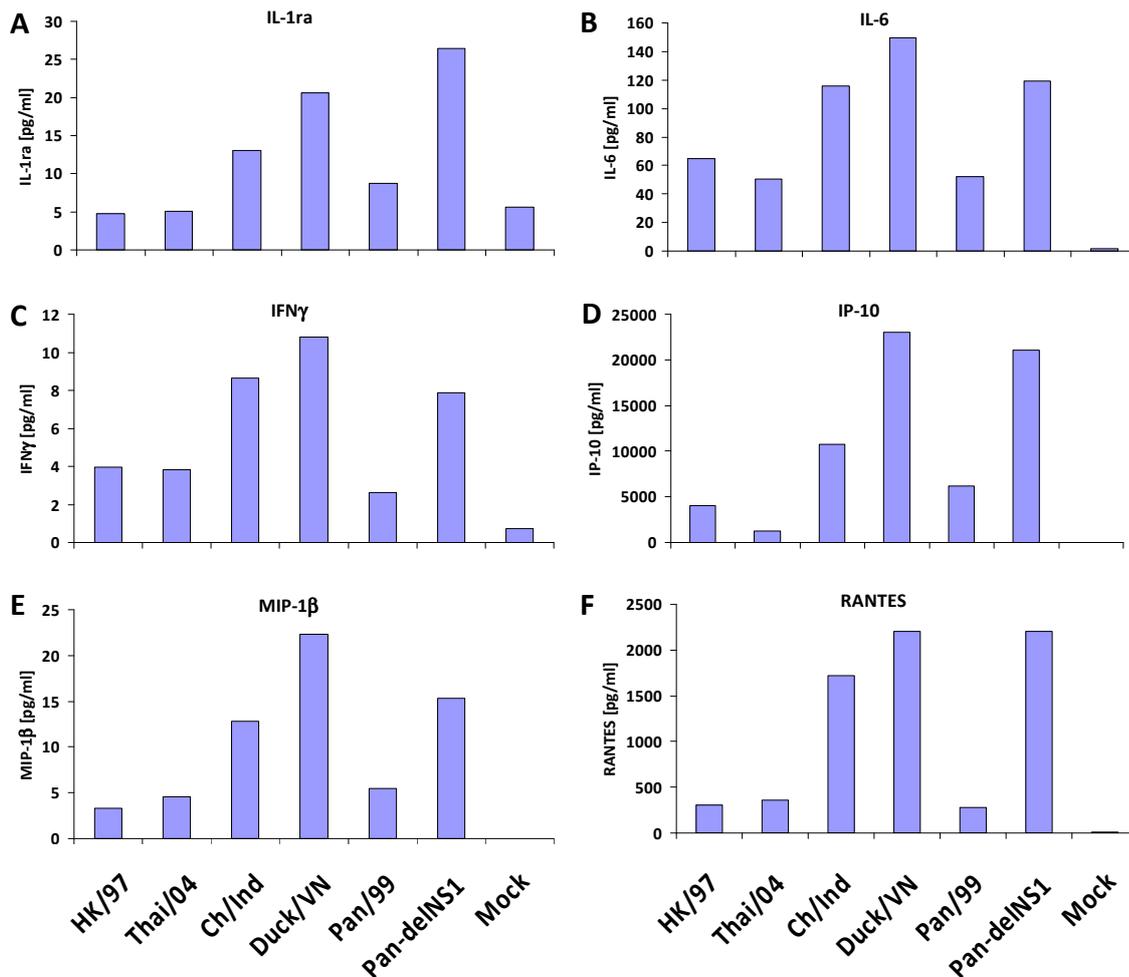
Um möglichst vollständig die von A549-Zellen sekretierten Zytokine zu bestimmen, wurden die zu der Zeit umfangreichsten Multiplex-ELISA-Kits (BioRad) verwendet und die Konzentrationen von 50 Zytokinen bestimmt. In den UV-inaktivierten Zellkulturüberständen von A549-Zellen waren nach Infektion, mit den H5N1-Stämmen, Pan/99 und Pan-delNS1 (moi = 1, 16 h nach Infektion) folgende Analyten messbar:

- IL-1ra, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-12(p70), IL-15, IL-17 (Interleukine)
- GM-SCF, SDF-1 $\alpha$ , G-CSF, SCF, FGF, VEGF (Wachstumsfaktoren)
- IFN $\gamma$ , IFN- $\alpha$ 2 (Interferone)
- TNF $\alpha$
- ICAM-1, VCAM-1, Gro-1 $\alpha$ , IP-10, MIP-1 $\beta$ , SDF-1 $\alpha$ , RANTES, MIF, MIG, VEGF (Chemokine und an der Immunzellbewegung beteiligte Analyte)

Für viele der anderen Analyte wurden keine auswertbaren Messwerte erhalten, da deren Konzentrationen unter oder im Bereich der Nachweisgrenze ( $\leq 1-2$  pg/ml) lagen. Für einige relevante Analyte sind die erhaltenen Daten in Abbildung 3-14 beispielsweise gezeigt.

Diese Konzentrationsbestimmung einer Vielzahl sekretierter Zytokine zeigte, dass kein Zytokin nach Infektion mit den humanen H5N1-Isolaten von A549-Zellen stärker sekretiert wurde als nach Infektion mit Pan/99 (Abbildung 3-14, Daten teilweise nicht gezeigt). Die Zytokine IP-10, MIG, IL-6 und IFN $\gamma$ , die in Seren von Patienten mit H5N1-Infektionen in hohen Konzentrationen nachgewiesen wurden (de Jong *et al.*, 2006), wurden von A549-Zellen nur nach Infektion mit den aviären H5N1-Isolaten und Pan-delNS1 stark sekretiert, nicht aber von Pan/99- oder mit den humanen H5N1-Isolaten infizierten Zellen. Dies gilt auch für IL-1ra, FGF, MIP-1 $\beta$ , RANTES und MIF. Für MCP-1 und IL-8 wurden keine auswertbaren Messwerte erhalten und IL-10 scheint von A549-Zellen nicht sekretiert zu werden. Auch sämtliche weiteren durchgeführten Multiplex-ELISA-Messungen (Daten nicht gezeigt) zeigten, dass die humanen H5N1-Isolate und Pan/99 eine vergleichbar geringe Zytokinantwort in A549-Zellen auslösen. Lediglich die aviären H5N1-Isolate und Pan-delNS1 lösten in A549-Zellen stark die Sekretion einiger Zytokine aus.

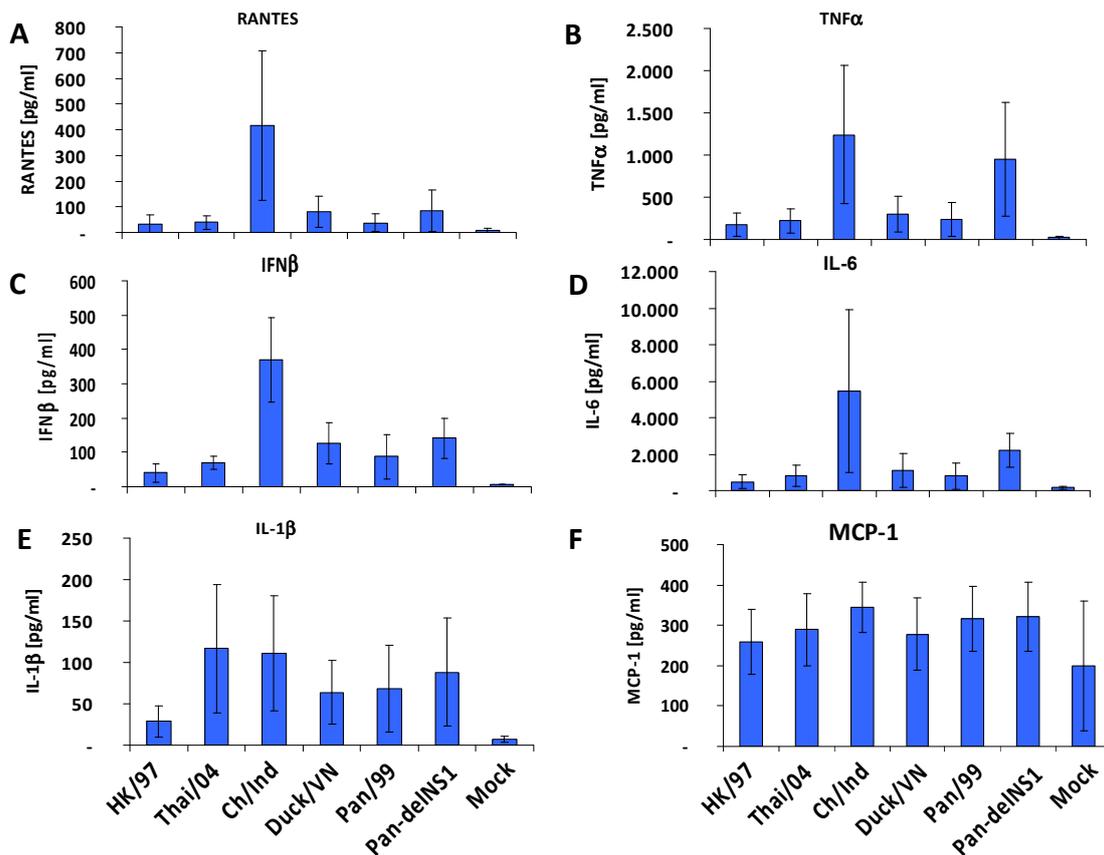
## Ergebnisse



**Abbildung 3-14: Zytokinkonzentrationen in Zellkulturüberständen von A549-Zellen nach Infektion mit den H5N1- und H3N2-Stämmen.** Die dargestellten Zytokinkonzentrationen (A-F) wurden per Multiplex-ELISA in den Zellkulturüberständen infizierter A549-Zellen (moi = 1, 16 h nach Infektion) bestimmt. Sämtliche Proben wurden dazu 15 min UV-inaktiviert. Dargestellt ist das Ergebnis eines Versuchs.

Am Beispiel der A549-Zelllinie wurden demnach keine Unterschiede in der Zytokinsekretion von Pan/99- und mit den humanen H5N1-Isolaten infizierten Lungenepithelzellen beobachtet. Im Gegensatz dazu lösten die humanen H5N1-Stämme in den Lungengewebsbiopsien aber eine stärkere IFN $\beta$ -Sekretion im Vergleich zu Pan/99 aus (Abbildung 3-9). In den Lungengewebsbiopsien sind wahrscheinlich nicht die Quelle der gemessenen höheren IFN $\beta$ -Konzentrationen (Abbildung 3-12) könnten aber möglicherweise andere Zytokine verstärkt sekretieren. Deshalb wurden die Konzentrationen an TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, Mip-1 $\beta$ , IP-10, RANTES, IFN $\beta$  und MCP-1 in den Überständen infizierter Makrophagenpräparationen bestimmt. Die analysierten Zellkulturüberstände stammten von Makrophagenpräparationen dreier Spender, die mit einer Multiplizität von 2 für 24 h in Triplikaten infiziert wurden (Abschnitt 3.1.7). Es zeigte sich, dass lediglich Makrophagen, die mit Pan-deINS1 beziehungsweise mit den aviären

H5N1-Isolaten infiziert wurden, verschiedene Zytokine in höheren Konzentrationen sekretierten, als mit Pan/99-infizierte (Abbildung 3-15). Die gemessenen Zytokinkonzentrationen, die von infizierten Makrophagen sekretiert wurden, wiesen teilweise große, wahrscheinlich spenderabhängige, Unterschiede auf. Die Vermutung, dass die humanen H5N1-Isolate Makrophagen zu einer stärkeren Zytokinsekretion im Vergleich zu Pan/99 stimulieren könnten, wurde für die gemessenen Analyte aber nicht bestätigt.



**Abbildung 3-15: Zytokinkonzentrationen in den Zellkulturüberständen humaner Makrophagen nach Infektion mit den verwendeten H5N1- und H3N2-Stämmen.** Die dargestellten Zytokinkonzentrationen wurden in den UV-inaktivierten Zellkulturüberständen infizierter humaner Makrophagen per Multiplex-ELISA bestimmt (moi = 2, 24 h nach Infektion; Mittelwerte +/- SEM, N = 3, jeweils in Triplikaten).

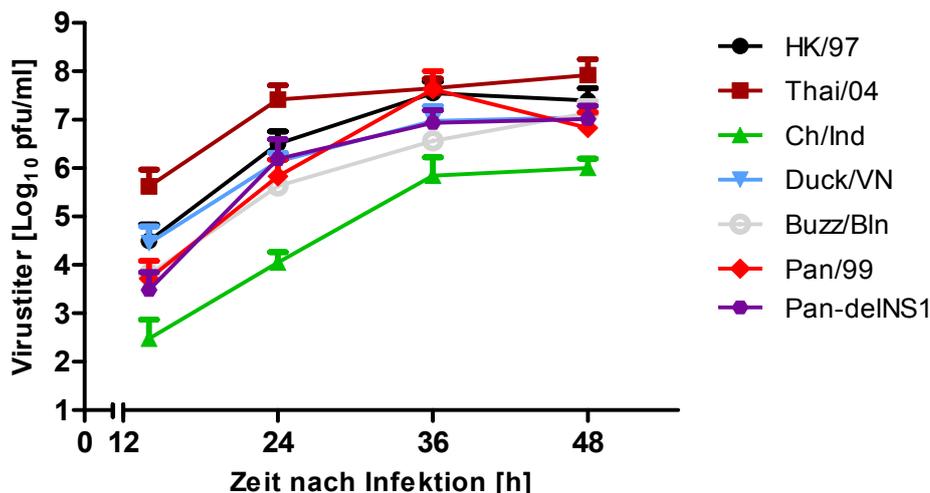
Anhand der gemessenen Zytokinkonzentrationen, die von Lungenepithelzellen und Makrophagen als Reaktion auf die Infektion mit den verschiedenen Viren sekretiert wurden, kann die im Vergleich zu Pan/99 stärkere Sekretion von IFNβ in H5N1-infizierten Lungengewebsbiopsien nicht erklärt werden. Die bestimmten Zytokinprofile lieferten keinen Hinweis, wie es zu der Hyperzytokinämie in H5N1-Infizierten kommt, es sei denn, man postuliert, dass die H5N1-Infektionen durch Virusstämme verursacht werden, die den hier untersuchten aviären Isolaten sehr ähnlich sind. Dann wäre aber keine effiziente Vermehrung dieser Viren im Menschen zu erwarten, was nur schwer mit der beobachteten hohen Viruslast in H5N1-Infizierten vereinbar ist.

### 3.2 Das Typ I IFN-System reduziert die Vermehrung der H5N1-Isolate

Die Versuche zu der Vermehrungsfähigkeit und der Typ I IFN-Induktion durch die H5N1-Stämme zeigten, dass sich die humanen H5N1-Isolate in humanen Lungenepithelzellen und -geweben vergleichbar effizient vermehrten wie ein saisonales H3N2-Virus. Im Gegensatz dazu zeigten die aviären H5N1-Isolate eine geringe Vermehrungsfähigkeit in humanen Zellen. Die humanen H5N1-Isolate lösten in den Lungenepithelzelllinien und Makrophagen nur eine geringe IFN $\beta$ -Sekretion aus, während aviäre Isolate eine starke IFN $\beta$ -Sekretion induzierten. Es ist bekannt, dass Typ I IFN die Vermehrung saisonaler Influenzaviren inhibieren können (Isaacs & Lindenmann, 1957), während einige H5N1-Stämme möglicherweise eine Typ I IFN-insensitive Vermehrung zeigen (Seo *et al.*, 2002). Im Folgenden wurde daher der Einfluss von Typ I IFN auf die Vermehrung der verschiedenen Viren untersucht.

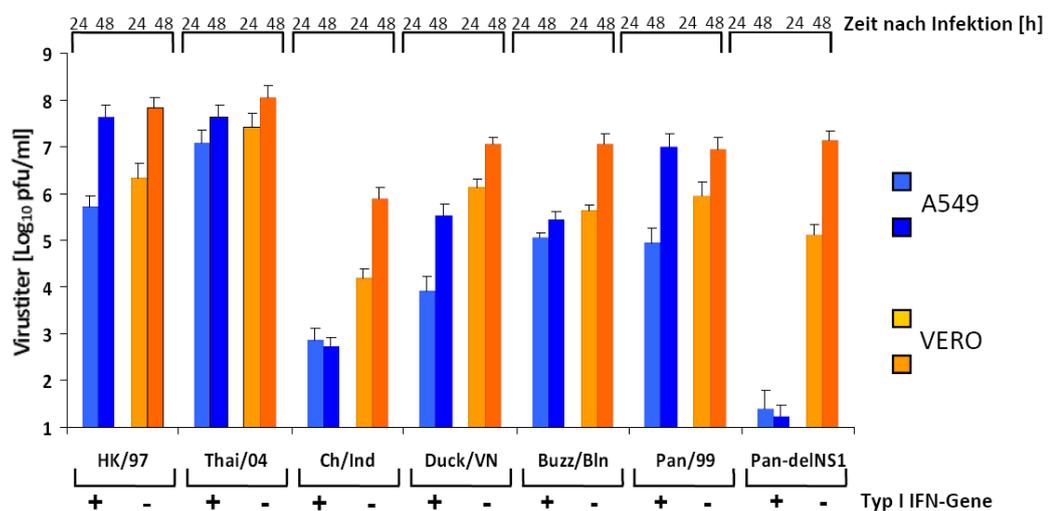
#### 3.2.1 Vermehrung der H5N1-Viren in Typ I IFN-defizienten VERO-Zellen

Zu diesem Zweck wurde die Vermehrung der H5N1-Stämme in VERO-Zellen untersucht. Diese Nierentumorzellen einer Afrikanischen Grünen Meerkatze exprimieren auf Grund einer genetischen Deletion keine Typ I IFN. Durch die Untersuchungen sollte sich zeigen, ob die durch die aviären H5N1-Isolate ausgelöste starke Typ I IFN-Sekretion deren geringe Vermehrungsfähigkeit in humanen Lungenepithelzellen bedingt.



**Abbildung 3-16: Vermehrung der H5N1- und H3N2-Viren auf VERO-Zellen.** VERO Zellen wurden mit einer  $moi$  von 0,01 infiziert und zu Pan/99- und Pan-delNS1-infizierten Ansätzen wurde TPCK-Trypsin gegeben (1  $\mu$ g/ml). Gezeigt sind die Mittelwerte der per Plaquesassay bestimmten Virustiter in den Zellkulturüberständen zu den angegebenen Zeitpunkten aus drei Versuchen + SEM.

Die Vermehrung der getesteten Viren auf den IFN-inkompetenten VERO-Zellen ist in Abbildung 3-16 gezeigt. Die Pan-delNS1-Mutante vermehrte sich auf diesen Zellen vergleichbar effizient wie das Pan/99 wt-Virus. Die zuvor auf den Lungenepithelzellen beobachtete starke Attenuation dieser Mutante demonstriert anschaulich wie deutlich das Typ I IFN-System die Vermehrung saisonaler Influenzaviren unterdrücken kann und wie wichtig das NS1-Protein für deren Vermehrung auf Typ I IFN-kompetenten Zellen ist (Garcia-Sastre *et al.*, 1998). Auch die aviären H5N1-Isolate, die auf A549-Zellen eine starke Sekretion von Typ I IFN auslösten, vermehrten sich auf den VERO-Zellen zu deutlich höheren Titern.



**Abbildung 3-17: Vergleich der 24 und 48 h nach Infektion erreichten Titer auf A549- und VERO-Zellen.** Dargestellt sind die entsprechenden Virustiter aus den in Abbildung 3-1 und Abbildung 3-16 gezeigten Ergebnissen.

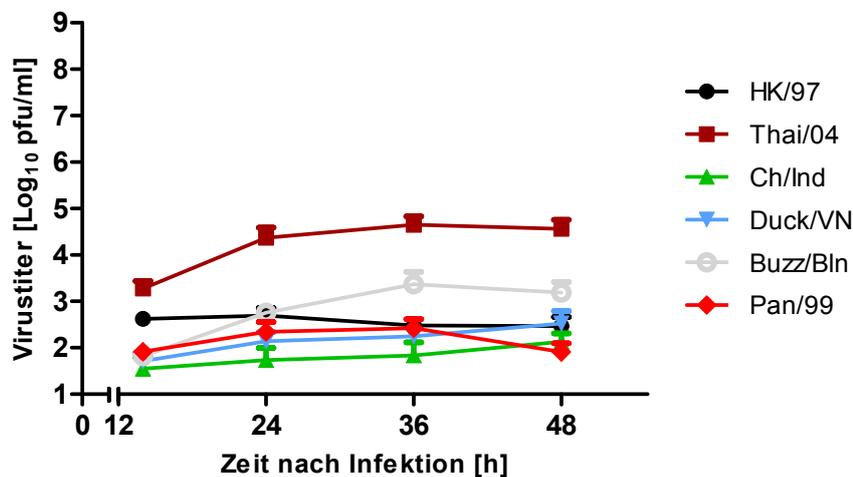
Ein Vergleich der Titer zu denen sich die verschiedenen Viren auf A549- und VERO-Zellen vermehrten (Abbildung 3-17) zeigt, dass insbesondere die auf A549-Zellen stark Typ I IFN-induzierenden Stämme auf VERO-Zellen deutlich höhere Titer erreichen. Auffällig dabei ist, dass die auf VERO-Zellen erreichten Titer der Duck/VN- und Buzz/Bln-Isolate zwar an die Titer des saisonalen Pan/99-Stammes heranreichen, nicht aber an die Titer der humanen H5N1-Isolate. Die humanen Isolate scheinen dementsprechend auch auf VERO-Zellen einen Replikationsvorteil gegenüber den anderen Stämmen aufzuweisen, der Typ I IFN-unabhängig zu sein scheint.

### 3.2.2 Vermehrung der H5N1-Viren in Typ I IFN-vorbehandelten Zellen

Die Vermehrung der aviären H5N1-Isolate schien durch die Abwesenheit funktioneller Typ I IFN-Gene in den VERO-Zellen begünstigt. Allerdings könnten auch andere bisher nicht

identifizierte zelllinienspezifische Unterschiede zwischen den VERO-Zellen und den Lungenepithelzelllinien zu der besseren Vermehrungsfähigkeit der aviären H5N1-Isolate auf den VERO-Zellen beitragen (Hayman *et al.*, 2007).

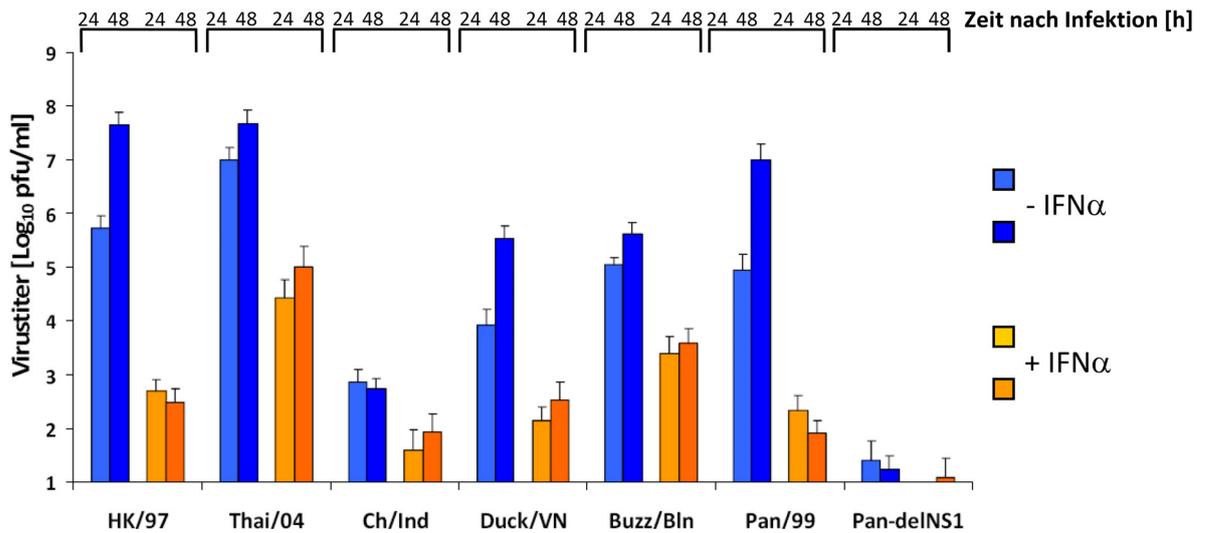
Um zu überprüfen, ob die Vermehrungsfähigkeit der H5N1-Stämme tatsächlich Typ I IFN-sensitiv ist und um gegebenenfalls Hinweise auf eine unterschiedliche IFN-Sensitivität der verschiedenen Stämme zu erhalten, wurde deren Vermehrungsfähigkeit in den drei bisher getesteten Zelllinien in Gegenwart eines Typ I IFN untersucht. Ein rekombinantes humanes IFN $\alpha$ -Hybrid wurde dazu 6 h vor Infektion dem Zellkulturmedium zugesetzt (500 IU/ml) und die Konzentration des Typ I IFN-Analogons wurde auch nach der Infektion in den Zellkulturüberständen konstant gehalten.



**Abbildung 3-18: Virusvermehrung auf A549-Zellen in Gegenwart von IFN $\alpha$ .** Dem Kulturmedium von A549-Zellen wurde ein rekombinantes humanes IFN $\alpha$  (500 IU/ml) 6 h vor Infektion hinzugefügt und auch nach Infektion ( $moi = 0,01$ ) wurde das Kulturmedium mit IFN $\alpha$  versetzt. Die zu den angegebenen Zeitpunkten erreichten Virustiter wurden mittels Plaquesassay auf MDCK-Zellen bestimmt (Mittelwerte + SEM, N = 3).

Wie in Abbildung 3-18 deutlich wird, vermehrten sich alle getesteten Viren in den IFN $\alpha$ -stimulierten A549-Zellen nur zu sehr geringen Titern. Ein direkter Vergleich der von den verschiedenen Viren nach 24 und 48 h auf A549-Zellen mit und ohne IFN $\alpha$ -Stimulation erreichten Titer ist in Abbildung 3-19 gezeigt. Eine stark verringerte Vermehrung (um 1-5 Log-Stufen) aller untersuchten Influenzaviren in A549-Zellen bei Anwesenheit größerer Typ I IFN-Mengen wird dabei deutlich. Der durch Typ I IFN in den Zellen induzierte antivirale Status unterdrückt demnach auch die Vermehrung der H5N1-Stämme.

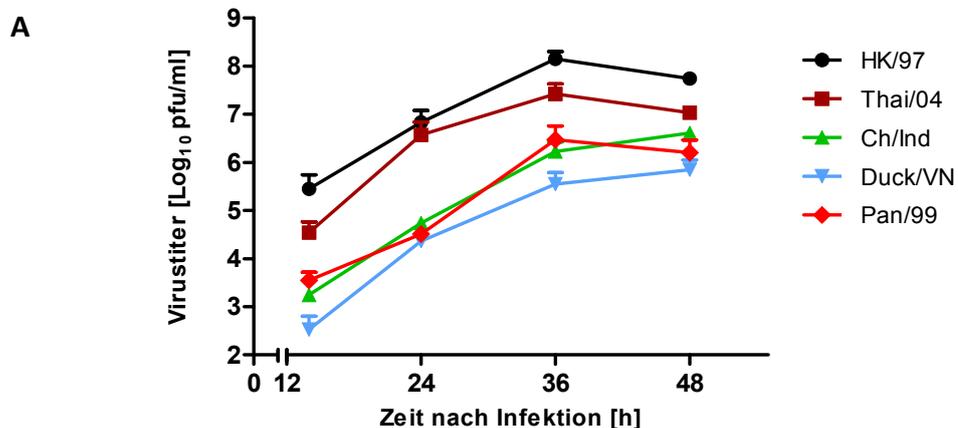
## Ergebnisse



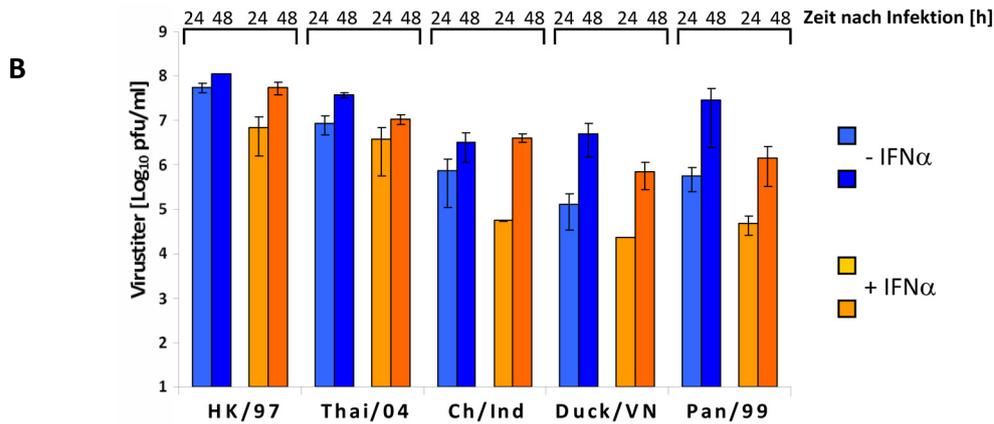
**Abbildung 3-19: Vergleich der auf A549-Zellen mit und ohne IFN $\alpha$ -Behandlung erreichten Titer.** Dargestellt sind die entsprechenden Virustiter 24 und 48 h nach Infektion aus den in Abbildung 3-1 und Abbildung 3-18 gezeigten Ergebnissen.

Ein genauer Vergleich der Typ I IFN-Sensitivität der verschiedenen Viren ist auf Grund ihrer sehr unterschiedlichen Vermehrungsfähigkeit und Typ I IFN-Induktion auf unstimulierten Zellen schwierig. Das Thai/04-Isolat erreicht in Anwesenheit des Typ I IFN-Analogons die höchsten Titer, während die erreichten Titer des Pan/99- und des HK/97-Stammes im Vergleich zu den auf unstimulierten A549-Zellen erreichten Titern am deutlichsten reduziert waren.

In IFN $\alpha$ -stimulierten Calu-3-Zellen (Abbildung 3-20) vermehrten sich die H5N1-Isolate in 48 h zu bis zu 10-fach geringeren Titern im Vergleich zu unbehandelten Zellen, während der erreichte Titer des Pan/99-Stammes 15-fach verringert war. Die Vermehrung aller Stämme in Calu-3-Zellen wurde durch eine IFN-Behandlung deutlich weniger stark unterdrückt als in A549-Zellen.

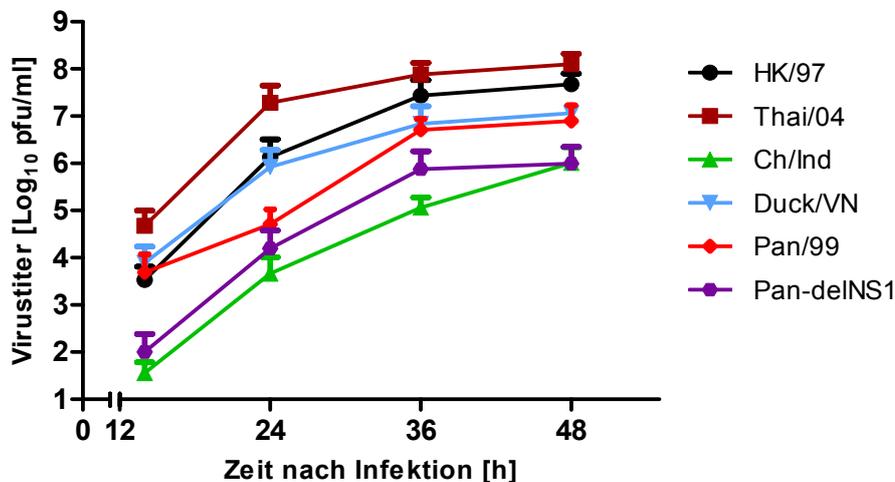


## Ergebnisse



**Abbildung 3-20: Vermehrung der H5N1-Stämme und von Pan/99 auf IFN-stimulierten Calu-3-Zellen.** Dem Kulturmedium von Calu-3-Zellen wurde ein rekombinantes humanes IFN $\alpha$  (500 IU/ml) 6 h vor Infektion hinzugefügt und auch nach der Infektion ( $\text{moi} = 0,01$ ) wurde das Kulturmedium mit dem IFN $\alpha$  versetzt. Die zu den angegebenen Zeitpunkten erreichten Virustiter wurden mittels Plaqueassay auf MDCK-Zellen bestimmt (Mittelwerte + SEM,  $N \geq 2$ ) (A). Vergleich der auf Calu-3-Zellen mit und ohne IFN $\alpha$ -Behandlung erreichten Titer nach 24 und 48 h (B).

Da laut Herstellerangaben das Typ I IFN-Analogon an die Typ I IFN-Rezeptoren von menschlichen Zellen, aber auch an die Rezeptoren von Maus und Ratte bindet und daher deutlich unspezifischer als die natürlich vorkommenden Interferone ist, wurde auch versucht, VERO-Zellen mit dem IFN $\alpha$  zu stimulieren (Abbildung 3-21).



**Abbildung 3-21 Vermehrung der H5N1- und H3N2-Viren auf IFN-stimulierten VERO-Zellen.** Dem Kulturmedium der VERO-Zellen wurde das rekombinante IFN $\alpha$  (500 IU/ml) 6 h vor Infektion hinzugefügt und auch nach der Infektion ( $\text{moi} = 0,01$ ) wurde das Kulturmedium mit IFN $\alpha$  versetzt. Die zu den angegebenen Zeitpunkten erreichten Virustiter wurden mittels Plaqueassay auf MDCK-Zellen bestimmt (Mittelwerte + SEM,  $N \geq 2$ ).

Im Unterschied zu den Lungenepithelzelllinien vermehrten sich alle Virusstämme auf IFN $\alpha$ -stimulierten VERO-Zellen ähnlich effizient wie auf nicht vorbehandelten VERO-Zellen. Lediglich die Geschwindigkeit der Virusvermehrung schien durch die IFN $\alpha$ -Stimulation leicht verringert. Die maximalen Titer der schnell replizierenden humanen H5N1-Isolate und Pan/99 wurden in Gegenwart von IFN $\alpha$  zwischen 36 und 48 h erreicht, während diese

Viren auf unstimulierten VERO-Zellen ihre maximalen Titer bereits vor dem 36 h-Wert erreichten (Abbildung 3-16).

Ob VERO-Zellen, die als Primatenzelllinie humanen Zellen evolutionär näher sind als Mäuse- oder Rattenzellen tatsächlich mit diesem IFN-Analogen stimulierbar sind, blieb unklar. RIG-I, dessen Expression gut Typ I IFN-stimulierbar ist, war in den VERO-Zellen auch nach Stimulation mit dem IFN $\alpha$  in einem Western Blot nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Dies deutet auf eine schlechte Stimulierbarkeit der VERO-Zellen mit diesem Typ I IFN hin, könnte aber auch durch eine geringe Affinität des verwendeten Antikörpers gegen das RIG-I-Protein der Primatenzellen erklärt werden, da dieser gegen humanes RIG-I gerichtet ist. VERO-Zellen sind grundsätzlich Typ I IFN-stimulierbar, allerdings zeigen auch andere rekombinante  $\alpha$ -IFNs in diesen Zellen eine deutlich geringere Fähigkeit als ‚natürliche‘ Typ I IFNs, die Replikation von Viren zu unterdrücken (Dahl *et al.*, 2004).

Die in Abbildung 3-16 bis 3-21 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Vermehrung der H5N1-Stämme sowohl auf A549- als auch auf Calu-3-Zellen in Anwesenheit von Typ I IFN verringert war. Die Vermehrung der getesteten H5N1-Stämme in humanen Zellen ist demnach Typ I IFN sensitiv. Signifikante Unterschiede in der Typ I IFN-Sensitivität zwischen den H5N1-Stämmen und Pan/99 wurden nicht beobachtet, auch wenn die Vermehrungsfähigkeit des Pan/99-H3N2-Stammes in Gegenwart von Typ I IFN etwas deutlicher reduziert schien als die des Thai/04-Stammes.

### **3.3 Die Aktivierung des Typ I IFN-Systems durch die H5N1-Isolate**

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass

- die humanen H5N1-Isolate in humanen Zellen kaum Unterschiede gegenüber Pan/99 in ihrer Vermehrungsfähigkeit, Typ I IFN-Induktion und in der Typ I IFN-Sensitivität ihrer Vermehrungsfähigkeit aufweisen.
- die aviären H5N1-Isolate sich in humanen Zellen im Vergleich zu den anderen getesteten wt-Stämmen zu geringeren Titern vermehren und eine starke Sekretion von IFN $\beta$  und anderen Zytokinen auslösen.
- die geringe Vermehrungsfähigkeit der aviären H5N1-Isolate zumindest teilweise auf die durch sie verursachte starke Sekretion von Typ I IFN zurückzuführen ist.

Die humanen H5N1-Isolate scheinen offenkundig also die Fähigkeit zu besitzen, die Aktivierung des humanen Typ I IFN-Systems zu vermeiden oder zu unterdrücken, während

den aviären Isolaten diese Eigenschaft fehlt. Im Folgenden wurde versucht, Unterschiede in den Aminosäuresequenzen der H5N1-Virusproteine zu identifizieren, die die Unterschiede zwischen den humanen und aviären Isolaten erklären könnten und untersucht, über welche Signalwege die H5N1-Isolate das humane Typ I IFN-System aktivieren.

### 3.3.1 Analyse der Primärstruktur der viralen Proteine

Um der Ursache für die beobachteten Unterschiede in der Vermehrungsfähigkeit und IFN-Induktion zwischen den humanen und aviären H5N1-Isolaten nachzugehen, wurden die untersuchten Virusstämme (mit Unterstützung von A. Zöhner) sequenziert und die Primärstrukturen aller viralen Proteine (mit Ausnahme der Nukleoproteine) miteinander verglichen. In Tabelle 3-1 ist ein Überblick und Vergleich der Aminosäurepositionen dargestellt, die bereits als wichtig für die Pathogenese von H5N1-Stämmen in Säugerzellen identifiziert wurden.

	Aminosäurepositionen im HA 1									NA
	86	124	138	156	212	226	227	228	263	Stalk-del.
A/HongKong/156/1997	A	N	L	A	E	Q	S	G	T	+
A/Thailand/1 Kan-1/2004	V	S	Q	T	R	Q	S	G	T	+
A/chicken/Indonesia/R132/2006	A	D	L	A	K	Q	S	G	A	+
A/duck/VietNam/TG24-01/2005	V	S	Q	T	R	Q	S	G	T	+
A/Bussard/Berlin/1/2006	A	D	Q	A	K	Q	S	G	T	+
A/Panama/2007/1999	A	-	R	K	N	V	S	S	S	-

	Aminosäurepositionen im NS1										NS2	
	42	del 80-84	92	103	106	149	127	189	195	228	31	56
A/HongKong/156/1997	S	-	E	L	I	A	D	D	S	P	M	H
A/Thailand/1 Kan-1/2004	S	+	D (87)	F	M	A	V	D	T	S	M	H
A/chicken/Indonesia/R132/2006	S	+	D (87)	F	M	A	T	D	S	S	M	H
A/duck/VietNam/TG24-01/2005	S	+	D (87)	F	M	A	T	D	T	S	M	H
A/Bussard/Berlin/1/2006	S	+	D (87)	F	M	A	T	D	S	S	M	H
A/Panama/2007/1999	S	-	D	F	M	A	N	D	S	S	M	H

	PB1	PB1-F2	Aminosäurepositionen im PB2						M	PA	
	317	66	318	355	627	701	702	168	127	336	
A/HongKong/156/1997	I	N	R	K	E	D	K	T	V	L	
A/Thailand/1 Kan-1/2004	M	N	R	R	E	N	K	T	V	L	
A/chicken/Indonesia/R132/2006	M	N	R	R	E	D	K	I	V	L	
A/duck/VietNam/TG24-01/2005	M	N	R	R	E	D	K	I	V	L	
A/Bussard/Berlin/1/2006	M	N	R	R	K	D	K	I	V	L	
A/Panama/2007/1999	M	N	R	R	K	D	R	T	V	L	

**Tabelle 3-1: Übersicht über Aminosäurepositionen die als wichtig für die Pathogenität von H5N1-Stämmen in Säugern identifiziert wurden**, nach (Lycett *et al.*, 2009). Aminosäuren, die in pathogeneren H5N1-Viren gefunden werden, sind fett markiert. Für die Sequenz der PB2-Proteine von HK/97 und Thai/04 wurde teilweise auf publizierte Daten zurückgegriffen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>) Weiterhin sind in rot die Aminosäurepositionen gezeigt, in denen sich alle aviären Isolate von den humanen H5N1-Isolaten unterscheiden. Das NP-Segment wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht sequenziert. Die gesamten Sequenzierungsdaten finden sich im Anhang.

Identifiziert wurden diese Aminosäurepositionen durch einen Vergleich der Eigenschaften verschiedener Virusisolate, die dann auf genomische Unterschiede zurückgeführt wurden, oder durch revers-genetische Studien (Chen *et al.*, 2007b; Jackson *et al.*, 2008; Jiao *et al.*, 2008; Le *et al.*, 2009; Matrosovich *et al.*, 1999; Obenauer *et al.*, 2006; Seo *et al.*, 2002; 66

Subbarao & Shaw, 2000; Wu *et al.*, 2008). Weiterhin sind sämtliche Aminosäurepositionen rot hervorgehoben, in denen sich alle untersuchten aviären H5N1-Isolate von den humanen H5N1-Isolaten unterscheiden. Zu dem ist ein Vergleich mit dem Pan/99-Stamm gezeigt, für den auf bereits in der Arbeitsgruppe generierte Sequenzdaten zurückgegriffen wurde (Anton, 2010).

Die Aminosäuresequenzen der untersuchten humanen H5N1-Stämme unterscheiden sich gemeinsam nur in den Aminosäuren an Position 168 im Matrixprotein und 127 im NS1-Protein von den drei hier untersuchten aviären H5N1-Isolaten. In den Aminosäurepositionen, die mit einer erhöhten Pathogenität assoziiert wurden, finden sich dagegen keine Unterschiede, die eindeutig die humanen H5N1-Isolate von den aviären Isolaten abgrenzen würden.

Aminosäure 127 im NS1-Protein befindet sich in einem Bereich der als wichtig für die Bindung der zellulären Proteinkinase R beschrieben ist (Min *et al.*, 2007). Die durch Autophosphorylierung aktivierte PKR phosphoryliert eIF2 $\alpha$  und bewirkt so einen Stopp der zellulären Proteinbiosynthese. Es ist bekannt, dass die Interaktion von NS1 mit PKR wichtig ist, um diesen PKR-vermittelten Stopp der Proteinbiosynthese zu unterdrücken (Galabru & Hovanessian, 1987; Nallagatla *et al.*, 2007; Samuel, 1979). Für PKR ist des Weiteren eine modulatorische Funktion auf NF- $\kappa$ B beschrieben, die durch Wechselwirkung von PKR mit IKK $\beta$  vermittelt wird und zu der Aktivierung der I- $\kappa$ B-Kinase führt (Chu *et al.*, 1999). NF- $\kappa$ B spielt eine wichtige Rolle bei der Induktion verschiedener Zytokine und stimuliert auch den IFN $\beta$ -Promotor. Es ist daher möglich, dass das NS1-Protein auch über PKR einen modulatorischen Einfluss auf die Aktivierung des Typ I IFN-Systems ausübt und/oder die nicht-adaptive Immunantwort moduliert (McAllister & Samuel, 2009). Die Aktivierung von PKR durch die im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit untersuchten H5N1-Stämme ist in Abschnitt 3.3.2 beschrieben.

Der Aminosäureaustausch I168T im Matrixprotein ist eine nicht-synonyme Mutation, die die Hydrophobizität dieser Position verändert. In der Fachliteratur wurde diese Aminosäureposition bisher mit keiner Funktionalität assoziiert. Ein Vergleich mit den vollständigen M1-Proteinsequenzen in der Influenzadatenbank des NCBI zeigte, dass etwa 30 % der 172 aviären und etwa 50 % der humanen H5N1-Isolate 168T aufweisen. Es handelt sich daher wahrscheinlich nicht um eine wichtige/essentielle speziesspezifische Adaptation.

Die Duck/VN- und Thai/04-Isolate werden beide in Clade 1 eingeordnet und zeigen zueinander kaum Unterschiede in den in Tabelle 3-1 aufgeführten Pathogenitäts-assoziierten Aminosäurepositionen. Da der Duck/VN-Stamm im Vergleich zu den anderen aviären Isolaten Buzz/Blu und Ch/Ind eine schwächere Sekretion von IFN $\beta$  in humanen Zellen auslöst, wurde auch nur nach spezifischen Unterschieden von Ch/Ind und Buzz/Blu im Vergleich zu den humanen H5N1-Isolaten gesucht. Diese beiden aviären H5N1-Isolate unterscheiden sich gemeinsam von den humanen H5N1-Isolaten in den Aminosäurepositionen 124 und 212 in den HA-Proteinen (Tabelle 3-1) sowie an den Positionen 653 in den PA- und 363 und 435 in den NA-Proteinen. Die Influenzavirus HA-Proteine können während ihrer Prozessierung im Endoplasmatischen Retikulum eine ER-Überladungs-Antwort (*ER-overload response*) auslösen, was zu einer verstärkten NF- $\kappa$ B-Aktivierung führen kann (Pahl & Baeuerle, 1995) und so die Sekretion von IFN $\beta$  verstärken könnte. Eine Überexpression verschiedener HA-Proteine (von H5-, H3- und H1-Subtypen) zeigte allerdings keinen aktivierenden Einfluss auf ein NF- $\kappa$ B-Reporterkonstrukt in 293T-Zellen (Daten nicht gezeigt).

Die Aminosäuren an Position 124 und 212 im HA-Protein liegen in antigenen Bereichen und unterscheiden sich zwischen den H5N1-Isolaten wahrscheinlich auf Grund antigener Drift (Wu *et al.*, 2008). Auch die Aminosäurepositionen 363 und 435 im NA-Protein liegen in der extrazellulären Kopfreion und die entsprechenden Aminosäuren (in den beiden aviären Isolaten Glycin, bzw. Serin statt Glutamin, bzw. Glycin) kommen häufig in aviären und humanen H5N1-Isolaten vor. Die Möglichkeit, dass diese Aminosäurepositionen in den HA- und NA-Proteinen einen Einfluss auf die Menge an sekretierten IFN $\beta$  ausüben könnten, erschien daher äußerst unwahrscheinlich und wurde nicht weiter verfolgt.

Die Aminosäureposition 653 im PA-Protein (in den beiden aviären Isolaten Serin statt Prolin) liegt in einem  $\alpha$ -helikalen Bereich der wichtig für die Interaktion mit PB1 ist. Es ist bekannt, dass beispielsweise die Mutationen E656A und G657A diese Interaktion stark behindern, was die Transkription und Replikation von Influenzaviren erheblich reduzieren kann (He *et al.*, 2008; Regan *et al.*, 2006). Einem möglichen Einfluss der Polymerasekomplexe auf das Potential der Viren, die Sekretion von IFN $\beta$  auszulösen, wird in Abschnitt 3.5 nachgegangen.

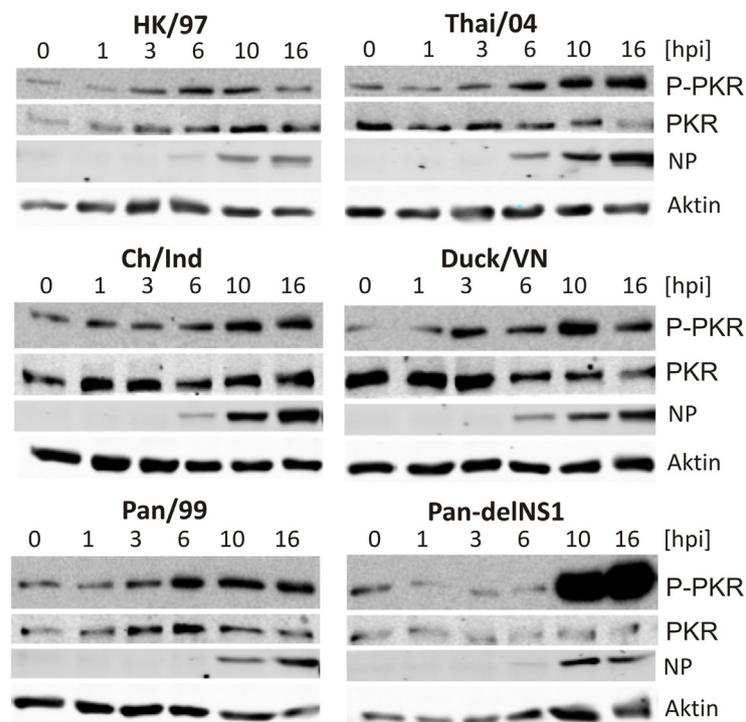
Weitere Aminosäurepositionen in denen sich die analysierten aviären Influenzavirusproteine gemeinsam von den Proteinen der humanen H5N1-Isolate

unterscheiden, fanden sich nicht. Die unterschiedlichen Eigenschaften der humanen und aviären H5N1-Isolate resultieren demnach wahrscheinlich aus einem Zusammenspiel individueller Unterschiede, die auch in verschiedenen Gensegmenten lokalisiert sein können.

### 3.3.2 Aktivierung von PKR durch die untersuchten Influenza A Viren

Die Aktivierung von PKR erfolgt durch Autophosphorylierung nach RNA-abhängiger PKR-Dimerisierung und wird durch das NS1-Protein inhibiert (Hatada *et al.*, 1999; Min *et al.*, 2007; Nallagatla *et al.*, 2007; Tan & Katze, 1998). Alle in der hier vorliegenden Arbeit untersuchten aviären Isolate unterscheiden sich von den humanen H5N1-Isolaten in der im NS1-Protein identifizierten PKR-Bindedomäne an Aminosäureposition 127 (Tabelle 3-1).

Es wäre daher möglich, dass es während der Infektion humaner Zellen mit den aviären H5N1-Isolaten zu einer stärkeren Aktivierung von PKR kommt, wodurch sich die geringe Vermehrungsfähigkeit dieser Viren erklären ließe. Um dies zu untersuchen, wurde der Gehalt an phosphoryliertem (antiviral aktivem) PKR zu verschiedenen Zeiten nach Infektion von A549-Zellen per Western Blot analysiert (Abbildung 3-22).

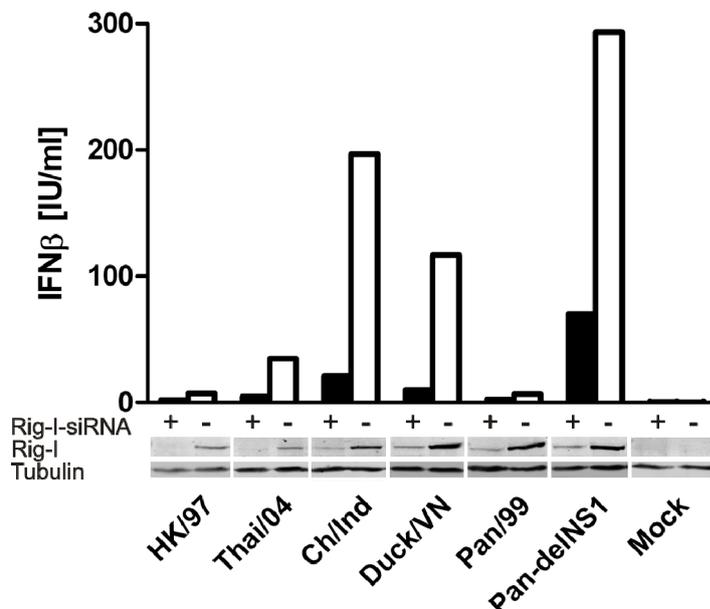


**Abbildung 3-22: Gehalt an phosphoryliertem PKR (P-PKR) in infizierten A549-Zellen.** Mit den angegebenen Virusstämmen infizierte A549-Zellen ( $\text{moi} = 1$ ) wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion lysiert und der Gehalt an phosphorylierten (P-PKR) und nicht phosphorylierten PKR per Western Blot untersucht. Zur Infektionskontrolle ist der Gehalt an viralem NP und als Ladekontrolle zelluläres Aktin gezeigt.

Wie zu erkennen ist, führte die Infektion mit dem Pan-delNS1-Stamm zu einer starken PKR-Phosphorylierung (P-PKR). Im Unterschied dazu war der Gehalt an phosphoryliertem PKR in den wt-Virus-infizierten A549-Zellen gering und zeigte kaum Unterschiede zwischen den humanen und aviären H5N1-Isolaten und Pan/99. Daraus ist zu schlussfolgern, dass die NS1-Proteine der aviären und humanen Isolate die Aktivierung von PKR vermutlich vergleichbar effizient unterdrücken.

### 3.3.3 Die H5N1-Isolate aktivieren RIG-I abhängig das humane Typ I IFN-System

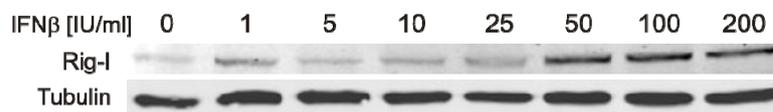
Es ist bekannt, dass nach Infektion mit saisonalen Influenza A Viren die Typ I IFN-Gene RIG-I-abhängig aktiviert werden können. Das RIG-I-Protein bindet im Zytoplasma der infizierten Zellen an 5'-triphosphorylierte RNA, wie beispielsweise die vRNA und cRNA von Influenzaviren (Hornung *et al.*, 2006; Pichlmair *et al.*, 2006). Durch die dann folgende Interaktion zwischen RIG-I und MAVS wird ein Signalweg aktiviert, der zu der Aktivierung von IRF-3 und NF- $\kappa$ B führt, die dann die Transkription der Typ I IFN-Gene stimulieren. Da die aviären H5N1-Stämme in humanen Zellen eine sehr starke IFN $\beta$ -Sekretion auslösten, wurde im Folgenden untersucht, ob dies allein RIG-I-abhängig erfolgt (Opitz *et al.*, 2007), oder ob diese Isolate möglicherweise auch andere Typ I IFN-induzierenden Signalwege aktivieren.



**Abbildung 3-23: Die IFN $\beta$ -Sekretion infizierter A549-Zellen ist bei verringerter RIG-I-Expression reduziert.** Mit einer RIG-I-spezifischen (ausgefüllte Balken) oder einer Kontroll-siRNA (weiße Balken) transfizierte A549-Zellen wurden 36 h nach Transfektion mit den verschiedenen Virusstämmen (moi = 1) infiziert. 16 h nach Infektion wurde die IFN $\beta$ -Konzentrationen in den Zellkulturüberständen per ELISA bestimmt. Der RIG-I-Gehalt in den transfizierten und infizierten Zellen wurde per Western Blot untersucht (obere Banden). Der Tubulingehalt in den Lysaten ist zum Vergleich der aufgetragenen Proteinmengen ebenfalls gezeigt (untere Banden). Dargestellt ist ein exemplarisches Ergebnis zweier unabhängiger Versuche.

Dazu wurden A549-Zellen mit einer RIG-I-spezifischen siRNA transfiziert, oder mit einer siRNA, die keine 100 %-ige Identität zu einer humanen mRNA-Sequenz aufweist (Kontroll-siRNA) und 36 - 48 h später mit den untersuchten H5N1-Stämmen infiziert. 16 h nach Infektion wurden die IFN $\beta$ -Konzentrationen in den Zellkulturüberständen per ELISA bestimmt und die siRNA-vermittelte Expressionsinhibition von RIG-I per Western Blot untersucht (Abbildung 3-23). Es zeigte sich, dass mit der RIG-I-spezifischen siRNA transfizierte Zellen deutlich (80 - 90 %) weniger IFN $\beta$  nach einer Infektion sekretieren als die Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen. Eine Quantifizierung der Western Blot-Daten ergab eine durch die spezifische siRNA um 80 - 90 % reduzierte Expression von RIG-I im Vergleich zu den Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen.

Typ I IFN können schon in geringen Mengen die RIG-I-Expression stark stimulieren (Abbildung 3-24). Die in Abbildung 3-23 erkennbaren Unterschiede in der RIG-I-Expression zwischen den mit den verschiedenen Viren isolierten Zellen, könnten daher auf deren unterschiedlich starke IFN-Induktion zurückgeführt werden. Die selbst bei geringer IFN-Induktion doch deutlich stärkere RIG-I-Expression in Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen nach Infektion mit Pan/99 im Vergleich zu den humanen H5N1-Isolaten (Abbildung 3-23), kann so allerdings nicht erklärt werden und wird am Ende der Arbeit diskutiert.



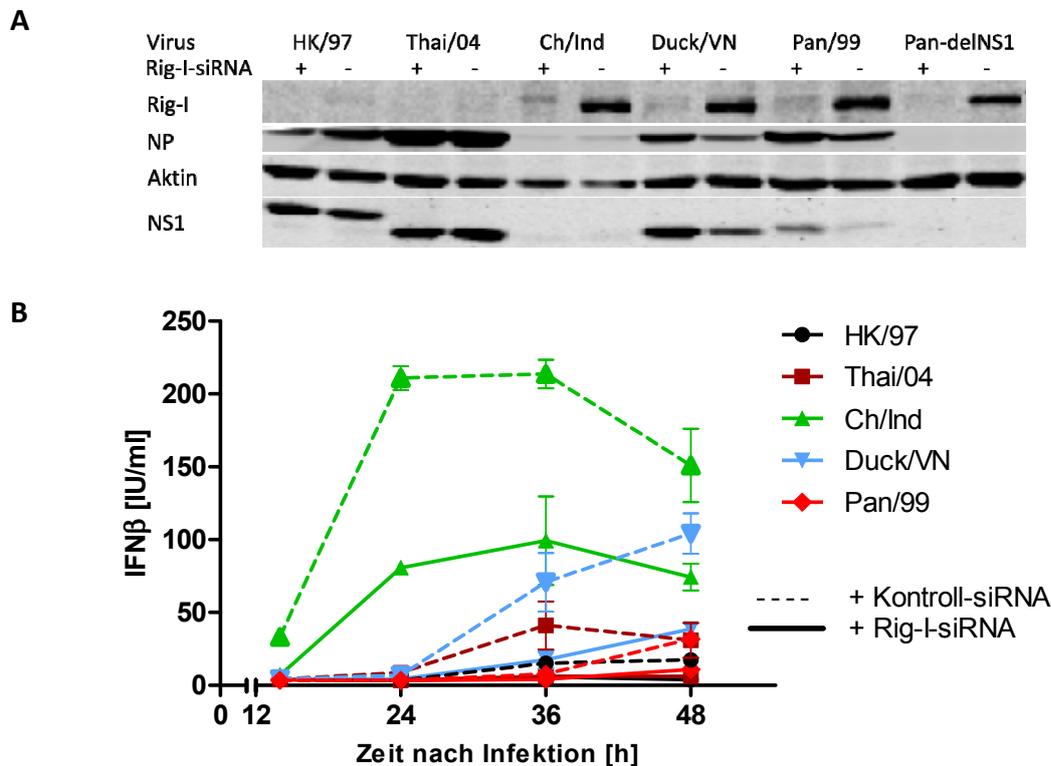
**Abbildung 3-24: Die RIG-I-Expression wird durch Typ I IFN stimuliert.** A549-Zellen wurden durch Zugabe der angegebenen Konzentrationen (IU/ml) des Typ I IFN-Analogons zum Zellkulturmedium über Nacht stimuliert und anschließend die RIG-I-Expression mittels Western Blot untersucht.

Diese Analyse, sowie die im Folgenden dargestellten siRNA-Experimente zeigen, dass die IFN $\beta$ -Sekretion von A549-Zellen nach Infektion mit den untersuchten Influenza A Viren von der RIG-I-Expression abhängig ist. Auch im Fall der aviären H5N1-Stämme leisten daher RIG-I-unabhängige Signalwege offensichtlich keinen wesentlichen Beitrag zu der Aktivierung des Typ I IFN-Systems in den humanen Lungeneithelzellen.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass alle verwendeten Stämme die Sekretion von Typ I IFN RIG-I-vermittelt auslösen, wurde anschließend untersucht, ob die Vermehrungsfähigkeit der verschiedenen Stämme bei reduzierter RIG-I-Expression erhöht ist. Um dies zu untersuchen wurden A549-Zellen mit den im vorangegangenen Experiment

verwendeten siRNAs transfiziert, anschließend mit einer Multiplizität von 0,01 infiziert und die Virusvermehrung und die IFN $\beta$ -Konzentration in den Zellkulturüberständen über eine Dauer von 48 h untersucht.

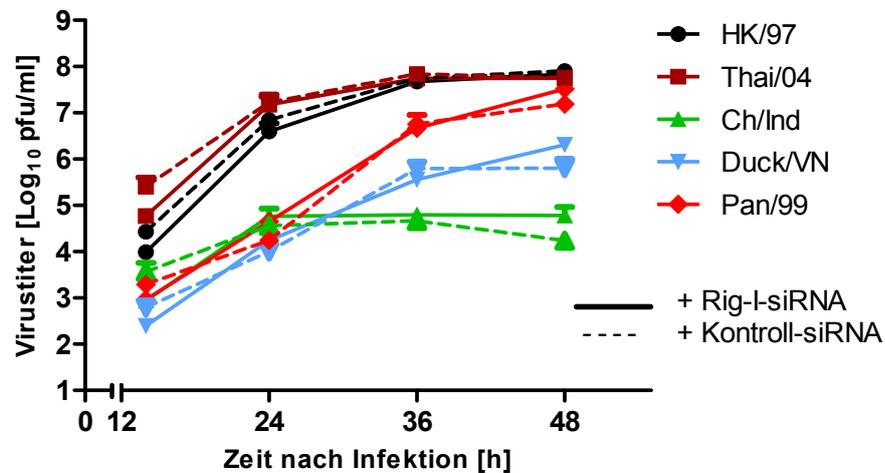
Wie in Abbildung 3-25 gezeigt, führte die Transfektion der RIG-I-siRNA auch über die längere Dauer des Experimentes zu einer sehr effizienten Inhibition der RIG-I-Expression. Es ist weiterhin zu erkennen, dass die Stämme HK/97 und Thai/04, im Unterschied zu Pan/99, wiederum die Expression von RIG-I in Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen nur sehr schwach stimulierten.



**Abbildung 3-25: RIG-I-Expression und IFN $\beta$ -Sekretion siRNA-transfizierter A549-Zellen nach H5N1- und H3N2-Infektion.** Mit einer RIG-I-spezifischen oder Kontroll-siRNA transfizierte A549-Zellen wurden 36 h nach Transfektion infiziert (moi = 0,01), 48 h nach Infektion lysiert und der RIG-I-Gehalt sowie die Expression viraler Proteine (NP und NS1) per Western Blot analysiert (A). Die IFN $\beta$ -Konzentration in den Zellkulturüberständen 14, 24, 36 und 48 h nach Infektion wurden per ELISA bestimmt (B).

In Abbildung 3-25A ist eindeutig eine effiziente Inhibition der RIG-I-Expression durch die RIG-I-spezifische siRNA zu erkennen. Auch die im Zellkulturmedium akkumulierenden IFN $\beta$ -Mengen waren unter diesen Bedingungen deutlich reduziert. Interessanterweise war in diesen Kulturen jedoch kaum ein Einfluss auf die Vermehrungsfähigkeit der untersuchten Virusstämme zu erkennen (Abbildung 3-26). Die erreichten Virustiter in den Zellkulturüberständen von RIG-I-siRNA-transfizierten Zellen unterschieden sich kaum von den erreichten Titern in den Kontroll-siRNA-transfizierten Ansätzen. Es zeigte sich

allerdings nach 48 h ein teilweise höherer NP- und NS1-Gehalt in den Lysaten der infizierten RIG-I-siRNA-transfizierten Zellen.



**Abbildung 3-26: Einfluss einer siRNA-vermittelten Expressionsinhibition von RIG-I auf die Vermehrungsfähigkeit der H5N1-Isolate und Pan/99 in A549-Zellen.** Neben den in Abbildung 3-25 gezeigten Daten wurde auch die Vermehrung der H5N1-Stämme sowie des saisonalen H3N2-Stammes in den mit einer RIG-I-spezifischen siRNA oder mit einer Kontroll-siRNA transfizierten A549-Zellen untersucht. Dazu wurden die Virustiter in den entsprechenden Zellkulturüberständen zu den angegebenen Zeitpunkten mittels Plaqueassay auf MDCK-Zellen bestimmt.

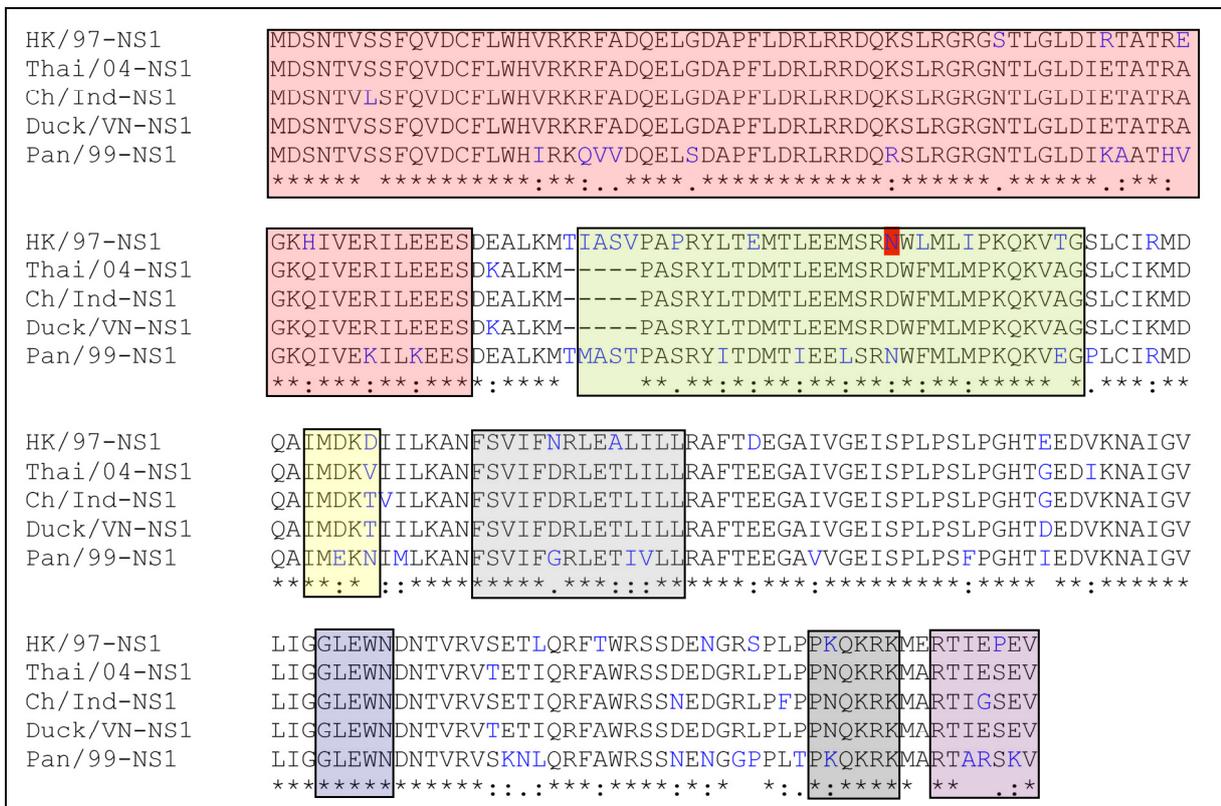
Es ist möglich, dass das Typ I IFN-System erst ab einer bestimmten Typ I IFN-Konzentration einen antiviralen Zustand auslöst. Dafür spricht, dass Typ I IFN auch von nicht infizierten Zellen konstitutiv auf niedrigem Niveau exprimiert werden, was für die schnelle Amplifikation der IFN-Sekretion nach Virusinfektion wichtig ist (Takaoka & Yanai, 2006). Auch der mit zunehmender Typ I IFN-Stimulation sprunghafte Anstieg der RIG-I-Expression in Abbildung 3-24 weist darauf hin. Um über eine Verringerung der Rig-I-Expression zu zeigen, dass Typ I IFN die Vermehrung der H5N1-Stämme inhibieren können, muss die siRNA-vermittelte Reduktion der RIG-I-Expression wahrscheinlich noch vollständiger sein.

### 3.4 Funktionalität der H5N1-NS1-Proteine in humanen Zellen

Die bisher dargestellten Experimente zeigten, dass auch H5N1-Influenzaviren das Typ I IFN-System über den RIG-I-abhängigen Signalweg aktivierten. Daraus kann man schließen, dass die beobachtete starke IFN $\beta$ -Induktion durch die aviären H5N1-Isolate in einer stärkeren Stimulation des RIG-I-Signalweges oder aber in einer eingeschränkten Fähigkeit der aviären NS1-Proteine diesen Rezeptor zu inhibieren, begründet sein könnte. Dem Letzteren wurde im Folgenden nachgegangen.

### 3.4.1 Primärstrukturvergleich der verschiedenen NS1-Proteine

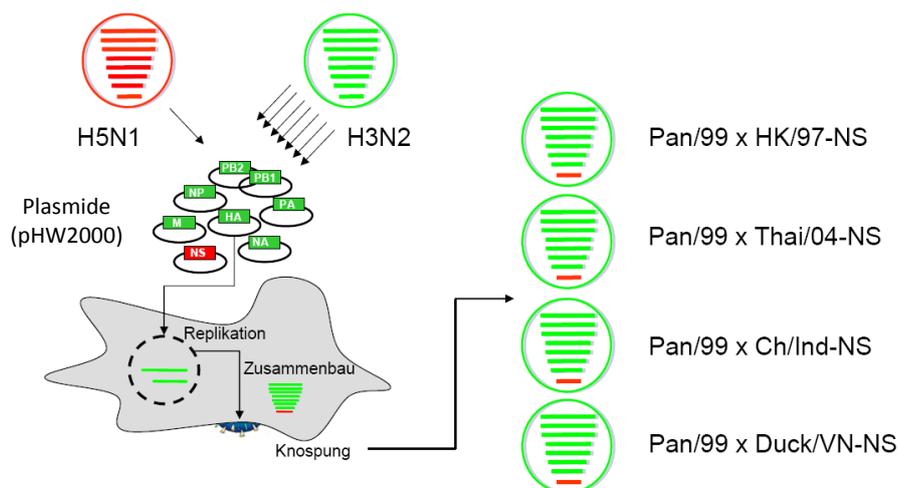
In Abbildung 3-27 ist ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der NS1-Proteine der verwendeten Virusstämme gezeigt. Neben den einzelnen blau markierten Unterschieden in der Primärstruktur dieser Proteine sind die bekannten funktionellen Domänen verschiedenfarbig unterlegt. In diesen funktionellen Bereichen finden sich keine weiteren auffälligen Sequenzunterschiede in den verschiedenen NS1-Proteinen, die eindeutig auf eine unterschiedliche Funktionalität der aviären und humanen H5N1-NS1-Proteine hinweisen würden.



**Abbildung 3-27: Primärstrukturvergleich der H5N1- und Pan/99-NS1-Proteine.** Die aus Sequenzdaten abgeleiteten Aminosäuresequenzen der NS1-Proteine wurden gegenübergestellt [T-COFFEE Version\_5.05: <http://www.tcoffee.org>] und Unterschiede zwischen den Sequenzen durch blaue Buchstaben hervorgehoben. Die rote Markierung kennzeichnet in der NS1-Aminosäuresequenz des hier verwendeten HK/97-Stammes einen Unterschied (N101D) zu den veröffentlichten HK/97-NS1-Sequenzen. Farblich unterlegt sind funktionelle Bereiche des NS1-Proteins. Rot markiert ist die N-terminale RNA-Bindungsdomäne der NS1-Proteine (AS 1-73) die auch ein Kernimportsignal enthält (AS 34-38). Die Deletion der AS 80-84 ist typisch für die H5N1-Stämme ab 2003 und fällt in einen Bereich der für die Wechselwirkung einiger NS1-Proteine mit eIF4G essentiell ist (AS 81-113, grün). Die Aminosäuren 123-127 sollen die NS1-Bindung an PKR vermitteln (gelb) und der Bereich über die Aminosäuren 134-147 stellt ein Kernexportsignal (grau) dar. Die identifizierte Bindungsstelle für CPSF30 (blau, AS 184-188) erscheint hoch konserviert in den verwendeten Stämmen. Dunkelgrau gekennzeichnet findet sich das zweite Kernlokalisierungssignal in den NS1-Proteinen und daran anschließend die PABII-Bindedomäne (AS 223-230) die auch das C-terminale PDZ-Ligandenmotiv enthält (AS 227-230, lila). Des Weiteren wurden bereits zwei SH3- (AS 164-167 und 213-216) und eine SH2-Bindedomäne (AS 89-93) in den Aminosäuresequenzen identifiziert. Die SH2- und die erste SH3-Domäne wurden als wichtig für die Wechselwirkung von NS1 mit der p85 $\beta$ -Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) identifiziert.

### 3.4.2 Herstellung und Analyse von Pan/99 x H5N1-NS-Reassortanten

In den bisher dargestellten Versuchen wurde für das Pan-delNS1-Virus die geringste Vermehrungsfähigkeit und die stärkste IFN $\beta$ -Induktion im Vergleich zu den anderen untersuchten Viren beobachtet. Die humanen H5N1-Isolate sowie das saisonale H3N2-Virus vermehrten sich am effizientesten und lösten nur die Sekretion geringer IFN $\beta$ -Mengen aus. Da für die aviären H5N1-Isolate im Vergleich zu Pan-delNS1 und den humanen Influenzavirusisolaten eine intermediäre Vermehrung und IFN $\beta$ -Induktion beobachtbar war, wurde angenommen, dass die aviären NS1-Proteine eine eingeschränkte Funktionalität in humanen Zellen aufweisen. Aus dem Primärstrukturvergleich der H5N1-NS1-Proteine konnten keine funktionellen Unterschiede vorausgesagt werden, weshalb die Funktionalität der NS1-Proteine vergleichend näher untersucht werden musste. Zu diesem Zweck wurden reassortante Viren hergestellt, die das NS-Segment der verschiedenen H5N1-Isolate im Hintergrund des Pan/99-Stammes trugen. Die in Abbildung 3-28 dargestellten Viren unterscheiden sich von dem verwendeten rekombinanten Pan/99-Stamm nur in ihrem NS-Segment und daher sollten Unterschiede zwischen diesen Viren allein auf die NS-Proteine zurückzuführen sein. Da die NS-Segmente der Influenza A Viren sowohl NS1 als auch NS2/NEP kodieren, werden während der Infektion mit diesen Viren sowohl das H5N1-NS1- und -NS2-Protein exprimiert. Die Reassortanten wurden in dem Pan/99-Hintergrund hergestellt, da ein entsprechender Plasmidsatz bereits vorlag und das Pan/99-wt-Virus sowie das Pan-delNS1-Virus hier bereits näher charakterisiert wurden.



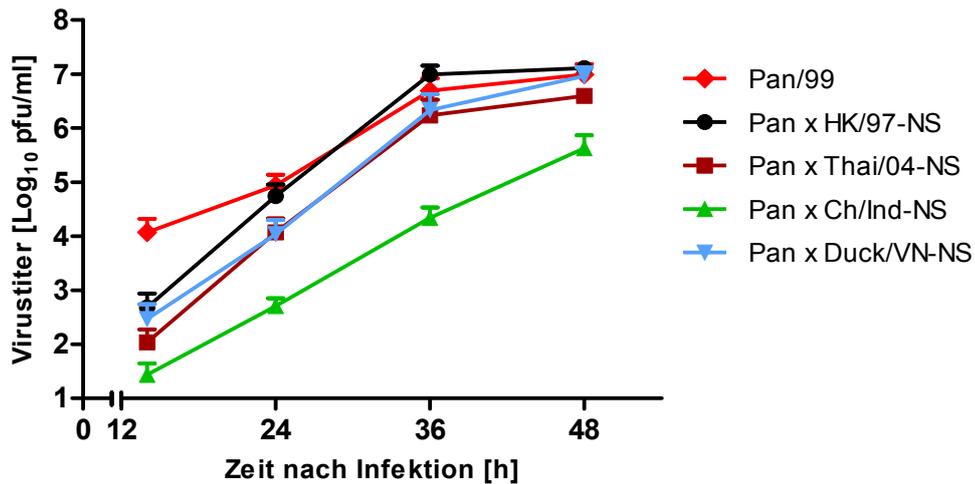
**Abbildung 3-28: Schematische Darstellung der Generierung der verwendeten reassortanten Viren.** Durch Transfektion von 293T-Zellen mit pHW2000-Plasmiden, die die Segmente 1-7 des Pan/99-Stammes (grün) enthalten und eigens dafür generierter pHW2000-Plasmide mit den NS-Segmenten der H5N1-Stämme (rot), wurden die im Folgenden verwendeten rekombinanten Viren hergestellt. Diese Reassortanten tragen im Pan/99-Hintergrund die H5N1-NS-Segmente (rechts).

### **3.4.3 Vermehrungsfähigkeit reassortanter Pan/99 x H5N1-NS-Viren**

Mit Hilfe der dargestellten Virusreassortanten kann unter anderem untersucht werden, wie effizient die H5N1-NS-Proteine die Vermehrungsfähigkeit des Pan/99-Hintergrundes unterstützen und wie gut sie die RIG-I-vermittelte Sekretion von Typ I IFN unterdrücken können. Es war zu erwarten, dass die reassortanten Viren je nach Funktionalität der H5N1-NS-Proteine in humanen Zellen eher Charakteristika wie das Pan/99-wt-Virus (effiziente Vermehrung, geringe IFN $\beta$ -Sekretion infizierter Zellen) oder wie die Pan-delNS1-Variante zeigen. Dazu wurde im Folgenden die Vermehrungsfähigkeit der reassortanten Viren in den verschiedenen Lungenepithelzelllinien, VERO-Zellen und den Lungengewebsbiopsien untersucht. Mögliche Unterschiede in der Funktionalität der H5N1-NS1-Proteine die Aktivierung und/oder die Wirkung einer nicht-adaptiven Immunantwort zu unterdrücken, sollten durch die parallel durchgeführte Bestimmung der sekretierten IFN $\beta$ -Konzentrationen offensichtlich werden. Die Arbeit, die über eine Typ I IFN-insensitive Vermehrungsfähigkeit einiger H5N1-Stämme berichtete, zeigte auch, dass diese Fähigkeit mit dem NS-Segment transferierbar ist (Seo *et al.*, 2002). Daher wurde die Vermehrung der reassortanten Viren ebenfalls auf IFN-stimulierten Zellen untersucht, um die NS-Proteine diesbezüglich vergleichen zu können.

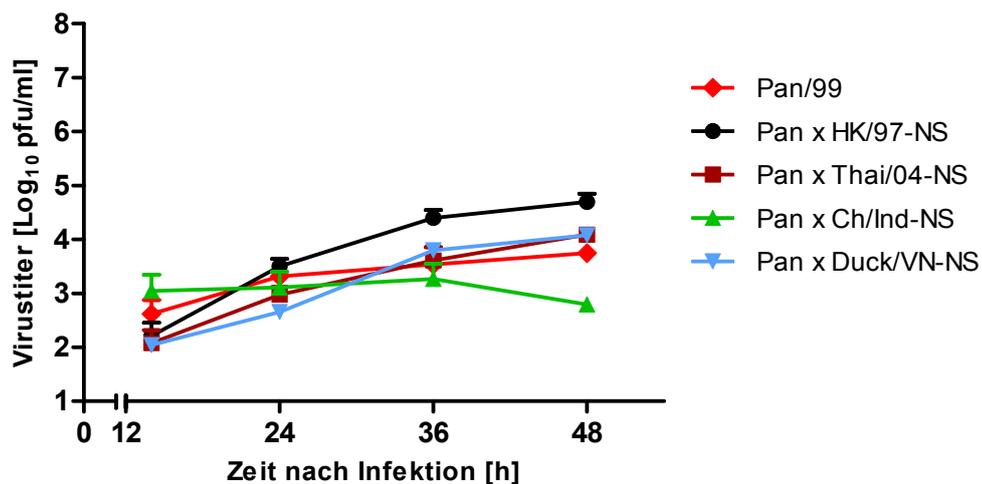
#### **3.4.3.1 Vermehrung der reassortanten Viren in A549-Zellen**

Die Vermehrungsfähigkeit der reassortanten Viren in A549-Zellen war überwiegend mit der des Pan/99-Stammes vergleichbar (Abbildung 3-29). Nur die Reassortante, die das Ch/Ind-NS-Segment enthält, vermehrte sich weniger effizient und erreichte nach 48 h einen Titer, der etwa 1,5 Größenordnungen unter dem des Pan/99-wt-Virus lag. Im Vergleich zu den wt-H5N1-Stämmen (Abbildung 3-1) erreichten die Reassortanten mit den aviären H5N1-NS-Segmenten interessanterweise deutlich höhere Titer in A549-Zellen (Abbildung 3-29). Dementsprechend komplementierten die eingefügten H5N1-NS-Gensegmente die Vermehrung des Pan/99-Virus in A549-Zellen effizient. Dies deutet darauf hin, dass die Nichtstrukturproteine der parentalen aviären H5N1-Isolate nicht ursächlich verantwortlich für deren geringe Vermehrungsfähigkeit in humanen Zellen sind.



**Abbildung 3-29 Vermehrung der reassortanten Pan/99 x H5N1-NS1-Viren in A549-Zellen.** A549-Zellen wurden mit den reassortanten Viren infiziert ( $moi = 0,01$ ) und die Virustiter im Zellkulturüberstand zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion bestimmt (Mittelwerte + SEM,  $N \geq 2$ ).

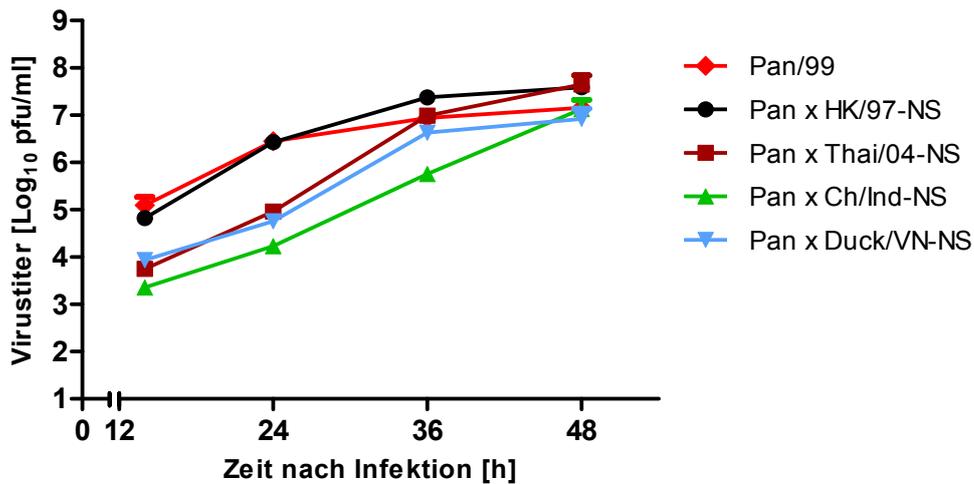
Die Vermehrungskurven der reassortanten Viren auf A549-Zellen, die mit dem rekombinanten IFN $\alpha$  stimuliert wurden, zeigten klar eine Typ I IFN-sensitive Vermehrungsfähigkeit der untersuchten Viren (Abbildung 3-30). Die durch die verschiedenen reassortanten Viren in Gegenwart von Typ I IFN erreichten Titer zeigten dabei kaum Unterschiede zueinander. Die auf Typ I IFN-stimulierten A549-Zellen beobachtete leicht bessere Vermehrungsfähigkeit des Thai/04-Isolates im Vergleich zu HK/97 und Pan/99 ließ sich für die entsprechende Reassortante nicht beobachten und somit nicht auf das NS1-Protein zurückführen.



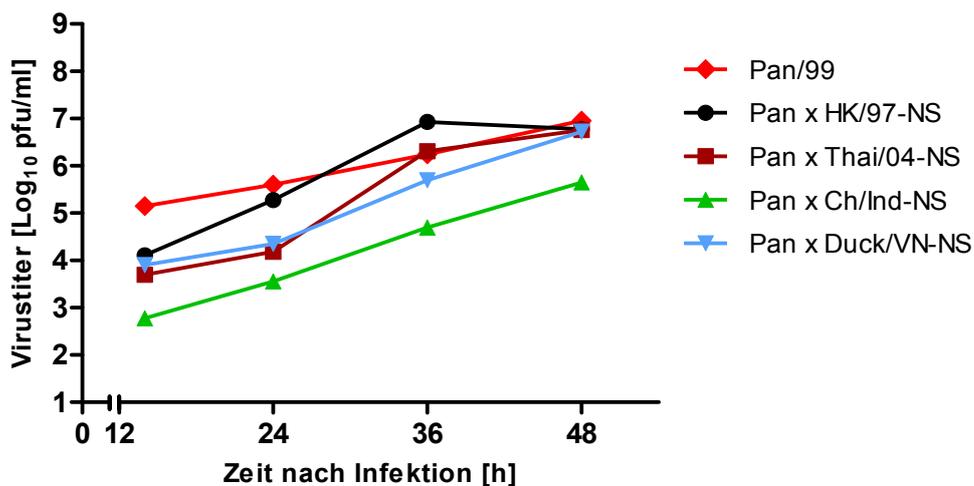
**Abbildung 3-30: Vermehrung der Pan/99 x H5N1-NS1-Viren auf IFN $\alpha$  stimulierten A549-Zellen.** Analog zu vorausgegangenen Experimenten wurden A549-Zellen mit dem rekombinanten IFN $\alpha$  (500 IU/ml) stimuliert und die Virusvermehrung in Anwesenheit des Typ I IFN-Analogons anhand der Virustiter in den Zellkulturüberständen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion untersucht. Gezeigt sind die Mittelwerte + SEM zweier unabhängiger Experimente.

3.4.3.2 Vermehrung der reassortanten Viren in Calu-3-Zellen

Die reassortanten Viren vermehrten sich in Calu-3-Zellen zu Titern die nach 48 h dem des Pan/99-Stammes entsprachen (Abbildung 3-31). Die Vermehrung der Reassortante mit dem Ch/Ind-NS-Segment war dabei im Vergleich zu den anderen Viren etwas verzögert. Auf Typ I IFN-stimulierten Calu-3-Zellen zeigte sich eine leicht geringere Vermehrungsfähigkeit aller verwendeten Viren im Vergleich zu unstimulierten Zellen (Abbildung 3-32).



**Abbildung 3-31: Vermehrung der Pan/99 x H5N1-NS1-Viren in Calu-3-Zellen.** Calu-3-Zellen wurden mit den angegebenen Virusstämmen infiziert (moi = 0,01) und die Virustiter zu den angegebenen Zeitpunkten im Zellkulturüberstand mittels Plaqueassay auf MDCK-Zellen bestimmt (Mittelwerte + SEM, N ≥ 2).

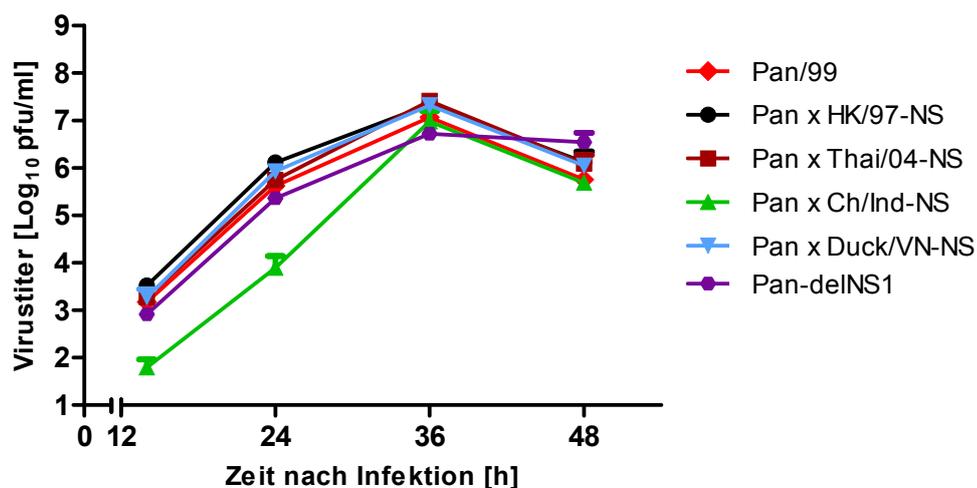


**Abbildung 3-32: Vermehrung der Pan/99 x H5N1-NS1-Viren in IFNα-stimulierten Calu-3-Zellen.** Calu-3-Zellen wurden, wie in Abbildung 3-20 beschrieben, mit dem Typ I IFN-Analagon stimuliert, mit den Virusstämmen infiziert (moi = 0,01) und die in Gegenwart des IFN-Analogons zu den angegebenen Zeitpunkten erreichten Virustiter in den Zellkulturüberständen bestimmt (Mittelwerte + SEM, N = 1).

Die Vermehrung der Pan/99 x Ch/Ind-NS-Reassortante schien auf IFN $\alpha$ -stimulierten Calu-3-Zellen am stärksten reduziert. Eine geringere Typ I IFN-Sensitivität der Vermehrungsfähigkeit der Reassortanten mit den H5N1-NS-Segmenten im Vergleich zu Pan/99 wurde auch auf Calu-3-Zellen nicht deutlich. Wie bereits bei der Untersuchung der wt-Viren festgestellt, führte die Stimulation von Calu-3-Zellen mit dem rekombinanten IFN $\alpha$  im Vergleich zu A549-Zellen zu einer deutlich geringeren Reduktion der viralen Vermehrungsfähigkeit.

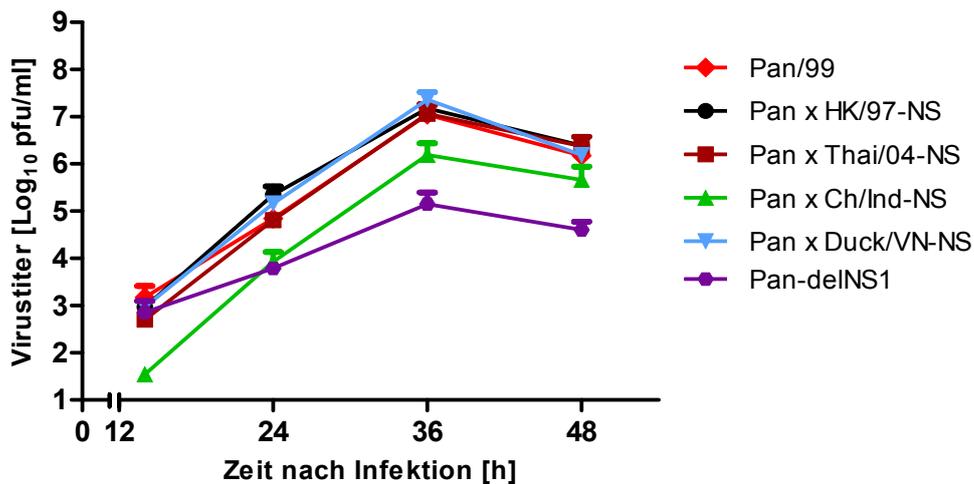
### 3.4.3.3 Vermehrung der reassortanten Viren in VERO-Zellen

Die geringere Vermehrungsfähigkeit Pan/99-Reassortante mit dem Ch/Ind-NS-Segment könnte auf eine stärkere Aktivierung des Typ I IFN-Systems in A549- und Calu-3-Zellen zurückzuführen sein. Deshalb wurde die Vermehrung der reassortanten Viren auch auf VERO-Zellen untersucht. Die NS-Reassortanten zeigten im Vergleich zu dem Pan/99-Stamm auf VERO-Zellen eine nahezu identische Vermehrung (Abbildung 3-33). Die Vermehrung der Reassortante mit dem Ch/Ind-NS-Segment schien leicht verzögert zu sein, doch alle Stämme erreichten etwa 36 h nach Infektion ähnliche maximale Titer. In mit der Pan-delNS1-Variante infizierten Zellen wird kein NS1-Protein exprimiert. Die sehr ähnliche Vermehrung aller rekombinanten Viren auf VERO-Zellen, die keine funktionellen Typ I IFN-Gene besitzen, deutet darauf hin, dass die NS1-Proteine in diesen Zellen kaum die Vermehrungsfähigkeit der Viren beeinflussen. Möglicherweise ist demnach die verzögerte Vermehrung der Ch/Ind-NS-Reassortante auf dessen NS2-Protein zurückzuführen.



**Abbildung 3-33: Vermehrung der Pan/99 x H5N1-NS1-Viren auf VERO-Zellen.** VERO-Zellen wurden mit den Virusstämmen infiziert (moi = 0,01) und die erreichten Virustiter in den Zellkulturüberständen dieser Zellen, die keine funktionellen Typ I IFN-Gene besitzen, zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt (Mittelwerte + SEM, N = 2).

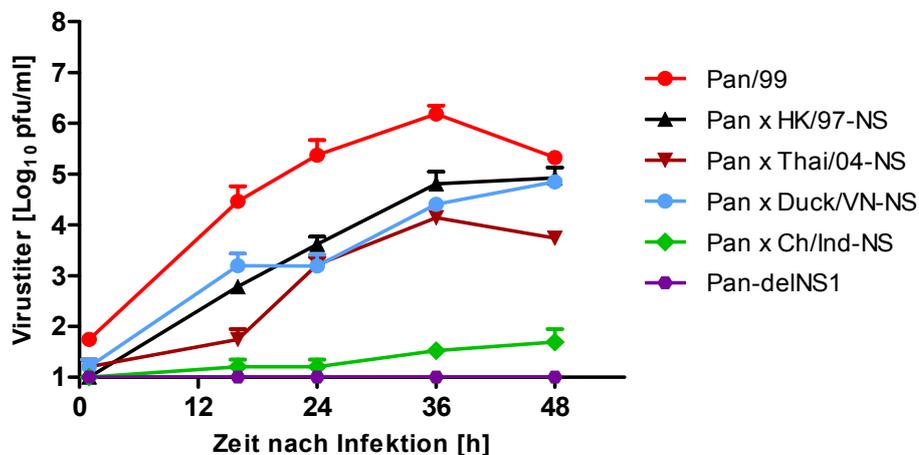
Die Stimulation der VERO-Zellen mit dem Typ I IFN-Analogen hatte kaum einen Einfluss auf die Vermehrung der meisten Virusstämme (Abbildung 3-34). Nur die Vermehrung der Ch/Ind-NS-Reassortante und des Pan-deINS1-Stammes waren in Anwesenheit des rekombinanten IFN $\alpha$  verringert. Neben der möglicherweise durch das Ch/Ind-NS2-Protein verursachten Reduktion der Vermehrungsgeschwindigkeit, könnte dies darauf hindeuten, dass das Ch/Ind-NS1-Protein etwas weniger gut einen möglichen antiviralen Effekt des IFN $\alpha$ -Analogons in diesen Zellen antagonisiert als die NS1-Proteine der anderen Stämme.



**Abbildung 3-34: Vermehrung der Pan/99 x H5N1-NS1-Viren in Typ I IFN-stimulierten VERO-Zellen.** VERO-Zellen wurden mit 1000 IU/ml des Typ I IFN-Analogons stimuliert, mit den Virusstämmen infiziert ( $moi = 0,01$ ) und die in Gegenwart des IFN-Analogons erreichten Virustiter in den Zellkulturüberständen zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt (Mittelwerte der Duplikate eines Versuchs + SEM).

#### 3.4.3.4 Vermehrung der reassortanten Viren in humanen Lungengeweben

In humanen Lungengewebsbiopsien zeigten die reassortanten Viren unerwartet große Unterschiede in ihrer Vermehrungsfähigkeit (Abbildung 3-35).

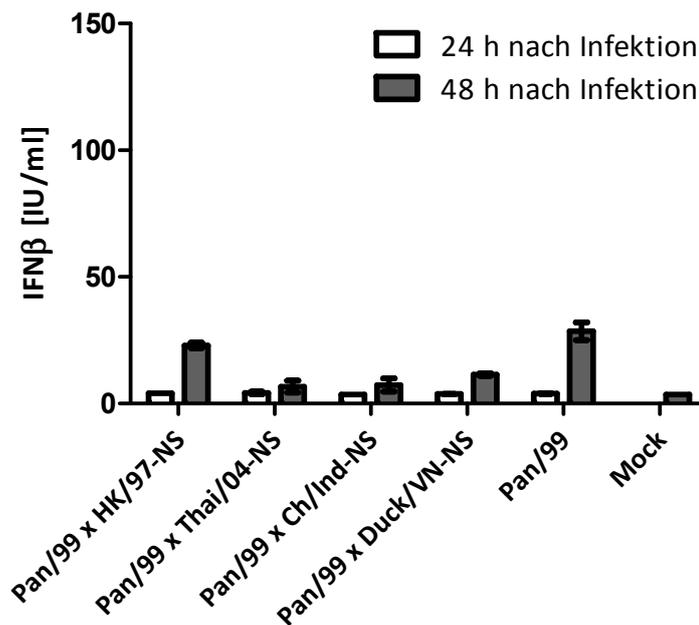


**Abbildung 3-35: Vermehrung der reassortanten Pan/99 x H5N1-NS1-Viren in humanen Lungengeweben.** Stücke humaner Lungengewebe wurden mit jeweils  $4 \times 10^5$  pfu infiziert und die viralen Titer in den Zellkulturüberständen zu den angegebenen Zeitpunkten auf MDCK-Zellen bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM zweier Versuche in Triplikaten mit Geweben unterschiedlicher Spender.

Die Pan/99-Reassortante mit dem Ch/Ind-NS-Segment vermehrte sich kaum und auch die anderen H5N1-NS-Reassortanten replizierten zu teilweise deutlich geringeren Titern als Pan/99. Die H5N1-NS-Proteine offenbarten in den humanen Lungengewebsbiopsien eine eingeschränkte Funktionalität, die auf den verwendeten Zelllinien nicht deutlich wurde. Möglicherweise verursachen die reassortanten Viren ähnlich wie die wt-H5N1-Stämme in den Lungenstücken eine stärkere Aktivierung des Typ I IFN-Systems. Die daraus resultierende ausgeprägtere nicht-adaptive Immunantwort könnte dann zu der geringeren Vermehrung der Reassortanten führen. Dem wurde im Folgenden nachgegangen.

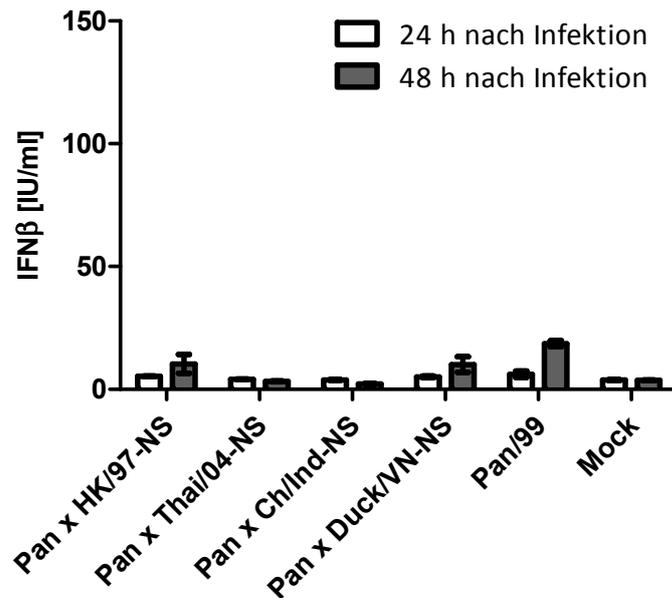
#### 3.4.4 IFN $\beta$ -Sekretion von mit den H5N1-NS-Reassortanten infizierten Zellen

Um die Funktionalität der H5N1-NS1-Proteine im Hinblick auf die Inhibition der Aktivierung des humanen Typ I IFN-Systems zu untersuchen, wurde der IFN $\beta$ -Gehalt in den Zellkulturüberständen von infizierten A549-Zellen und Lungengewebe 24 und 48 h nach Infektion bestimmt (Abbildung 3-36).



**Abbildung 3-36: IFN $\beta$ -Konzentrationen in A549-Zellkulturüberständen nach Infektion mit den Pan/99 x H5N1-NS1-Viren.** A549-Zellen wurden mit den reassortanten Viren infiziert (moi = 0,01) und die Konzentration von IFN $\beta$  in den Zellkulturüberständen zu den angegebenen Zeitpunkten per ELISA untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte zweier unabhängiger Experimente +/- SEM.

Wie in Abbildung 3-36 und in Abbildung 3-37 zu erkennen ist, wurde nach Infektion mit den reassortanten Viren nur wenig IFN $\beta$  von den A549-Zellen und humanen Lungengewebsstücken in das Zellkulturmedium sekretiert.



**Abbildung 3-37: IFN $\beta$ -Konzentration in Zellkulturüberständen von Lungengewebsbiopsien, die mit den Pan/99 x H5N1-NS1-Viren infiziert wurden.** Stücke humaner Lungengewebe wurden mit jeweils  $4 \times 10^5$  pfu infiziert und die IFN $\beta$ -Konzentrationen in den Zellkulturüberständen zu den angegebenen Zeitpunkten mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM zweier Versuche in Triplikaten mit Geweben unterschiedlicher Spender.

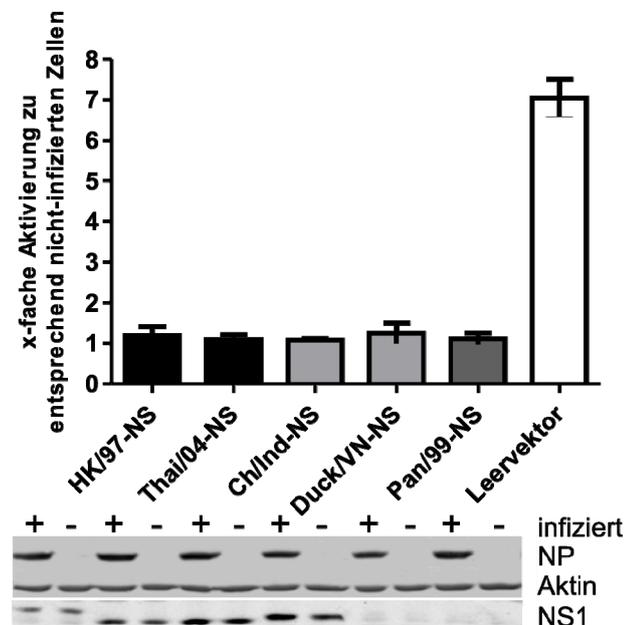
Die aviären H5N1-Isolate aktivieren das humane Typ I IFN-System stärker als die humanen H5N1-Isolate und Pan/99, wie die IFN $\beta$ -Konzentrationen in den Zellkulturüberständen infizierter A549-Zellen und humaner Lungengewebsbiopsien zeigten (Abbildung 3-4 und Abbildung 3-9). Die hohe IFN $\beta$ -Konzentration in A549-Zellkulturüberständen nach Infektion mit der Pan-delNS1-Variante (Abbildung 3-4B) belegt, dass auch das Pan/99-Virus das humane Typ I IFN-System stark aktiviert. Bei der Replikation des wt-Pan/99-Virus wird diese Aktivierung jedoch durch das NS1-Protein unterdrückt. Da die Infektion mit den H5N1-NS-Reassortanten zu keiner verstärkten IFN $\beta$ -Sekretion führte, ist zu vermuten, dass auch die H5N1-NS1-Proteine in der Lage sind, die Aktivierung des humanen Typ I IFN-Systems effizient zu unterdrücken.

Die geringere Vermehrung der reassortanten Viren in den Lungengewebsbiopsien im Vergleich zu Pan/99 (Abbildung 3-35) ist, wie die geringen IFN-Konzentrationen in Abbildung 3-37 zeigen, interessanterweise nicht auf eine verstärkte Typ I IFN-Sekretion zurückzuführen. Da sich die reassortanten Viren nur durch die H5N1-NS-Segmente vom Pan/99-wt-Virus unterscheiden, deutet dies auf andere, bisher unbekanntes vom NS1- oder NS2-Protein abhängige Ursachen hin.

Aus der Vermehrungsfähigkeit der NS-Reassortanten und deren Aktivierung des humanen Typ I IFN-Systems im Vergleich zu Pan/99 und dem Pan-delNS1-Stamm lässt sich schließen, dass die H5N1-NS1-Proteine die Vermehrung des Pan/99-Hintergrundes gut komplementieren und wahrscheinlich ebenso effizient wie das Pan/99-NS1-Protein in der Lage sind, eine Aktivierung des Typ I IFN-Systems in humanen Zellen zu unterdrücken.

### 3.4.5 Inhibition der Aktivierung des humanen IFN $\beta$ -Promotors durch die NS1-Proteine

Die verschiedenen H5N1-NS1-Proteine schienen ähnlich gut die Aktivierung des humanen Typ I IFN-Systems zu unterdrücken. Um diese Beobachtung in einem unabhängigen zweiten Ansatz zu untersuchen, wurde ein Reporteragen-Versuch durchgeführt. Dazu wurden die H5N1-NS1-Proteine in 293T-Zellen durch Transfektion der auch für die Herstellung der reassortanten Viren verwendeten pHW2000-NS-Plasmide exprimiert. Gleichzeitig wurden ein *Firefly*-Luziferase exprimierendes Reporterkonstrukt unter Kontrolle des humanen IFN $\beta$ -Promotors und ein konstitutiv *Renilla*-Luziferase exprimierendes Plasmid kotransfiziert. In diesen nun das NS1-Protein exprimierenden 293T-Zellen wurde anschließend der IFN $\beta$ -Promotor durch Infektion mit der Pan-delNS1-Mutante stimuliert.



**Abbildung 3-38: Die H5N1-NS1-Proteine unterdrücken die Aktivierung des humanen IFN $\beta$ -Promotors.** 293T-Zellen wurden mit den pHW2000-NS-Plasmiden, p125-Luc und pRL-TK-Luc kotransfiziert und 30 h später mit Pan-delNS1 (moi = 1) für 16 h infiziert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der Luziferasen in den Lysaten bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte dreier unabhängiger Versuche in Triplikaten +/- Standardabweichung (SD), x-fach zu jeweils entsprechend transfizierten aber nicht infizierten Zellen. Weiterhin wurde mittels Western Blot die Expression der NS1-Proteine untersucht und es ist die NP-Expression in den Pan-delNS1-infizierten Zellen gezeigt sowie Aktin zum Vergleich der aufgetragenen Proteinmengen.

In Abhängigkeit von der Fähigkeit der verschiedenen NS1-Proteine, die Aktivierung und/oder die Expression der *Firefly*-Luziferase unter Kontrolle des humanen IFN $\beta$ -Promotors zu inhibieren, sollten eventuelle funktionelle Unterschiede zwischen den NS1-Proteinen detektiert werden (Abbildung 3-38). Es zeigte sich, dass alle hier untersuchten NS1-Proteine vergleichbar gut die Aktivierung des IFN $\beta$ -Promotors und/oder die Expression der *Firefly*-Luziferase nach Pan-delNS1-Infektion unterdrückten. Die schwache Pan/99-NS1-Bande in Abbildung 3-38 ist nicht auf eine geringe Expression des Pan/99-NS1-Proteins zurückzuführen, sondern auf die bekannte geringe Affinität des für den Western Blot verwendeten Antikörpers zu diesem NS1-Protein.

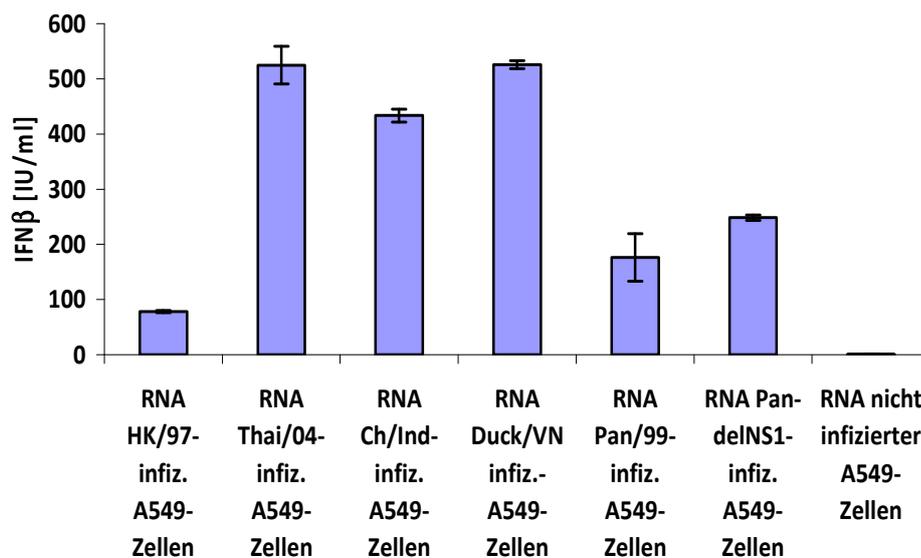
### **3.5 Mögliche Ursachen für die starke Aktivierung des RIG-I-Signalweges durch die aviären H5N1-Isolate**

Die in Abschnitt 3.4 dargestellten Versuche zeigten, dass das Pan/99- und die H5N1-NS1-Proteine vergleichbar effizient in humanen Zellen die Induktion einer Typ I IFN-Antwort unterdrücken. Weitere Analysen ergaben, dass die aviären H5N1-Stämme RIG-I-vermittelt eine starke Sekretion von IFN $\beta$  in humanen Zellen auslösen (Abschnitt 3.3.3). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass während der Infektion mit den aviären H5N1-Isolaten eine so starke Aktivierung des RIG-I-Signalweges erfolgen muss, dass sie nur unvollständig von den NS1-Proteinen unterdrückt werden kann. RIG-I wird während Influenzavirusinfektionen durch 5'-PPP-RNA aktiviert (Hornung *et al.*, 2006; Pichlmair *et al.*, 2006). Aus den bisherigen Ergebnissen lässt sich also die Hypothese ableiten, dass während der Infektion mit den aviären H5N1-Stämmen mehr 5'-PPP-RNA im Zytoplasma infizierter Zellen für RIG-I zugänglich ist.

Es ist bekannt, dass die Polymeraseproteine von Influenzaviren einem starken Adaptationsdruck im Verlauf zoonotischer Influenzavirusinfektionen unterliegen (Lycett *et al.*, 2009; Salomon *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2009; Subbarao *et al.*, 1993). Neben ihrer temperaturabhängigen katalytischen Funktion müssen die viralen Polymeraseproteine auch mit verschiedenen zellulären und viralen Proteinen wechselwirken. Es ist möglich, dass bei der Replikation der aviären H5N1-Isolate mehr cRNA oder vRNA gebildet wird (Bradel-Tretheway *et al.*, 2008). Auch könnte unvollständige c- und vRNA von den aviären Viren in humanen Zellen gebildet werden, möglicherweise in Form so genannter *defective interfering* (DI)-RNA (Davis *et al.*, 1980). Eine einzelne Mutation in den PA-Proteinen (R638A) kann schon dazu führen, dass DIRNA verstärkt gebildet wird (Fodor *et al.*, 2003).

Auch die in Abschnitt 3.3.1 beschriebenen Besonderheiten der Ch/Ind und Buzz/Bln-PA-Proteine könnten zu der Bildung von mehr 5'-PPP-RNA führen, wodurch der RIG-I-Signalweg stärker aktiviert und eine höhere IFN $\beta$ -Sekretion ausgelöst werden könnte. Unabhängig davon, ob mehr vollständige oder verkürzte RNA durch eine erhöhte oder veränderte Aktivität der aviären Polymerasen gebildet wird, könnte dies eine starke Aktivierung der Typ I IFN-Gene auslösen und so die Vermehrungsfähigkeit dieser Viren, beispielsweise PKR oder RNaseL abhängig, verringern.

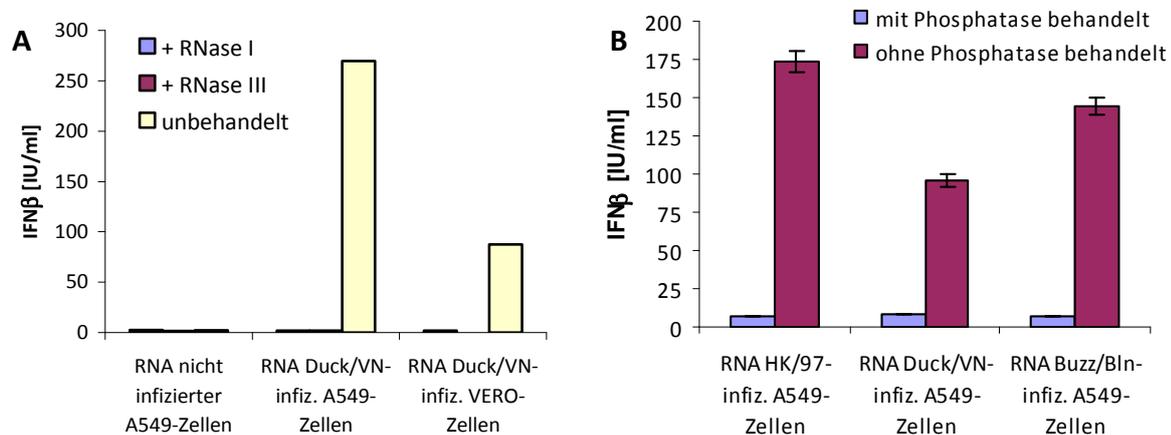
Um zu untersuchen ob Unterschiede in dem Gehalt 5'-PPP-RNA-Spezies zu der beobachteten stärkeren Stimulation des RIG-I-Signalweges durch die aviären H5N1-Isolate führen, wurden A549-Zellen mit einer Multiplizität von 1 für 10 h infiziert und anschließend die Gesamtzell-RNA der infizierten Zellen isoliert. 1  $\mu$ g der isolierten RNA wurde dann in A549-Zellen transfiziert und 8 h nach Transfektion die IFN $\beta$ -Konzentration in den Zellkulturüberständen der transfizierten Zellen bestimmt (Abbildung 3-39).



**Abbildung 3-39: A549-Zellen sekretieren IFN $\beta$  nach Transfektion von RNA aus infizierten A549-Zellen.** 1  $\mu$ g der aus infizierten A549-Zellen (moi = 1, 8 h nach Infektion) isolierten RNA wurde in unbehandelte A549-Zellen transfiziert und 8 h nach Transfektion die IFN $\beta$ -Konzentration in den Zellkulturüberständen per ELISA bestimmt (Mittelwerte eines Versuchs in Duplikaten +/- SD).

Diese Messung sollte klären, ob tatsächlich Unterschiede in dem RNA-Gehalt der infizierten Zellen Ursache für die unterschiedlichen Mengen an sekretiertem IFN $\beta$  sind. Das in Abbildung 3-39 dargestellte Ergebnis zeigt, dass die RNAs aus infizierten Zellen eine sehr starke IFN $\beta$ -Sekretion in A549-Zellen auslösten, RNA aus nicht infizierten Zellen dagegen nicht. 1  $\mu$ g der RNA-Präparationen transfiziert in  $1 \times 10^6$  A549-Zellen führte teilweise zu der Sekretion sehr hoher IFN $\beta$ -Konzentrationen. Die RNA aus Thai/04- und den aviären H5N1-

Isolaten infizierten Zellen löste eine deutlich stärkere IFN $\beta$ -Sekretion aus als RNA, die aus HK/97 und Pan/99, bzw. Pan-delINS1-infizierten Zellen isoliert wurde. Überraschend war, dass die aus Thai/04-infizierten Zellen isolierte RNA eine ähnlich hohe IFN $\beta$ -Sekretion auslöste, wie die RNA-Präparationen aus mit den aviären H5N1-Isolaten infizierten Zellen. Kontrollversuche zeigten, dass die Fähigkeit der RNA-Präparationen eine IFN $\beta$ -Sekretion auszulösen durch Behandlung mit RNase-I und -III, sowie durch Dephosphorylierung der RNA um mehr als 95 % reduziert wird (Abbildung 3-40). Weder Proteine, noch in den infizierten A549-Zellen exprimierte Typ I IFN-mRNA tragen demnach bedeutsam zu der Aktivierung des Typ I IFN-Systems nach Transfektion der Gesamtzell-RNA bei. Bereits mehrfach gezeigt wurde, dass eine Triphosphatgruppe am 5'- RNA-Ende essentiell für die Aktivierung von Rig-I ist (Hornung *et al.*, 2006; Rehwinkel *et al.*, 2010; Schlee *et al.*, 2009).



**Abbildung 3-40: 5'-PPP-RNA induziert die Sekretion von IFN $\beta$  in A549-Zellen.** RNA wurde aus infizierten oder nicht infizierten Zellen isoliert und mit den angegebenen Enzymen wie unter Material und Methoden beschrieben, behandelt. RNase-behandelte RNA-Präparationen wurden direkt wieder in A549-Zellen transfiziert, während die Phosphatase-behandelten Ansätze per RNeasy-Kit aufgereinigt wurden und gleiche Konzentrationen in A549-Zellen transfiziert wurden. 8 h nach Transfektion wurde die IFN $\beta$ -Konzentration in den Zellkulturüberständen mittels ELISA bestimmt.

Dies deutet darauf hin, dass während der Replikation einiger H5N1-Isolate in A549-Zellen tatsächlich deutlich mehr 5'-PPP-RNA gebildet wird, als bei der Replikation des HK/97-Isolates und des saisonalen Pan/99-Stammes. Eine eindeutige Aussage, ob die stärkere Aktivierung des humanen Typ I IFN-Systems durch die aviären H5N1-Stämme durch quantitative Unterschiede in den viralen RNA-Replikationsprodukten oder -intermediaten verursacht wird, kann nur durch deren Quantifizierung getroffen werden. Mögliche Unterschiede in den gebildeten 5'-PPP-RNA-Spezies (c-RNA, vRNA oder DIRNA) müssen bei der Quantifizierung berücksichtigt werden und machen mehrere umfangreiche *real time*-PCR-Versuche notwendig.

## 4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, H5N1-Influenza A Viren im Vergleich zu saisonalen Stämmen hinsichtlich mechanistischer Unterschiede in der virusvermittelten Induktion und Blockade des Typ I IFN-Systems zu untersuchen.

Motiviert wurden diese Untersuchungen durch Publikationen, die zeigten, dass H5N1-Influenzaviren die Transkription der Typ I IFN- und anderer Zytokingene in humanen Zellen stärker aktivieren als saisonale Virusstämme (Chan *et al.*, 2005; Cheung *et al.*, 2002). Weiterhin verlaufen Infektionen durch die 1997 und kontinuierlich seit 2003 in Südostasien direkt auf den Menschen übertragenen hochpathogenen aviären H5N1 Influenza A Viren zu etwa 60 % fatal (WHO, 2010a) und deren Pathogenität wurde mit hohen Zytokinkonzentrationen im Serum Infizierter und einer hohen Viruslast assoziiert (de Jong *et al.*, 2006). Diese Befunde sind erstaunlich, denn Influenza A Viren, die im Menschen zirkulieren und die saisonalen Grippewellen auslösen, verursachen nur selten fatale Infektionen im Menschen. Auch sind diese saisonalen Stämme darauf angewiesen, die Aktivierung der Typ I IFN-Gene zu unterdrücken, denn durch die Expression und Sekretion der Typ I IFN kommt es zu der Expression antiviral wirksamer Proteine, die ihre Replikation unterdrücken. Interessanterweise zeigten Experimente von Seo *et al.* aber, dass die Vermehrung der asiatischen H5N1-Stämme nicht durch Typ I IFN verringert wird. Diese H5N1-Stämme schienen daher bemerkenswerte Unterschiede zu saisonalen Influenza A Viren aufzuweisen. Die Charakterisierung der zugrunde liegenden Mechanismen erschien viel versprechend, um neue Erkenntnisse über das nicht-adaptive Immunsystem und dessen Modulation durch Influenzaviren zu gewinnen und um die hohe Pathogenität der H5N1-Stämme zu erklären.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde dazu die Vermehrungsfähigkeit der H5N1-Stämme in humanen Zellen untersucht, die von den infizierten Zellen sekretierten Mengen IFN $\beta$  und anderer Zytokine bestimmt und mögliche Mechanismen zu der starken Aktivierung des Typ I IFN-Systems analysiert. Dafür wurden zwei H5N1-Patientenisolate (humane H5N1-Isolate HK/97 und Thai/04) und drei H5N1-Isolate aus Vögeln (aviäre Isolate Ch/Ind, Duck/VN und Buzz/Blu) untersucht. Der Vergleich aviärer und humaner H5N1-Isolate sollte zeigen, ob die publizierten Eigenschaften der H5N1-Patientenisolate in aviären H5N1-Stämmen konserviert sind, was zu der Abschätzung des pandemischen Potentials dieser Stämme

beitragen könnte. Die Eigenschaften dieser fünf H5N1-Stämme wurden weiterhin mit einem humanpathogenen saisonalen H3N2-Stamm (Pan/99) verglichen.

Im Vergleich zu Pan/99 zeigte sich in den durchgeführten Experimenten eine vergleichbar gute Vermehrungsfähigkeit der humanen H5N1-Isolate in humanen Lungenepithelzellen. Auch lösten diese H5N1-Isolate nur vergleichbar gering die Sekretion von IFN $\beta$  und anderen Zytokinen in humanen Lungenepithelzellen und Makrophagen aus. Im Unterschied zu Pan/99 und den humanen H5N1-Isolaten zeigten die aviären H5N1-Isolate nur eine geringe Vermehrungsfähigkeit in humanen Zellen und induzierten eine starke IFN $\beta$ -Sekretion. Die Vermehrung aller H5N1-Stämme wurde durch Typ I IFN drastisch verringert, wie Experimente mit IFN-behandelten Zellen zeigten. In Zellen, die keine funktionellen Typ I IFN-Gene besitzen, vermehrten sich die aviären H5N1-Isolate deutlich effizienter und erreichten ähnlichere Titer zu den anderen untersuchten Influenzaviren. Die stark von den aviären H5N1-Isolaten ausgelöste Typ I IFN-Sekretion scheint demnach auch deren geringe Vermehrungsfähigkeit in humanen Zellen mit zu bedingen (Punkt 1 der Fragestellung, Abschnitt 1.4).

Die humanen H5N1-Isolate zeigten kaum Unterschiede zu dem saisonalen H3N2-Stamm, während sich die aviären H5N1-Isolate in humanen Zellen wenig effizient vermehrten und stark die Sekretion von IFN $\beta$  und anderen Zytokinen auslösten. Erworbene Adaptationen an humane Zellen, die den aviären Isolaten fehlen, könnten eine mögliche Erklärung für die bessere Vermehrung der humanen H5N1-Isolate sein. Um diese zu identifizieren wurden die Stämme sequenziert (Anhang, Tabelle 3-1) und nach Aminosäurepositionen in den viralen Proteinen gesucht, die die aviären H5N1-Isolate von den humanen Isolaten abgrenzen. Die wenigen Aminosäurepositionen in den viralen Proteinen in denen sich alle untersuchten humanen H5N1-Stämme von den aviären unterscheiden, konnten aber nicht mit deren unterschiedlicher Vermehrung und Aktivierung des Typ I IFN-Systems assoziiert werden (Abschnitt 3.3.1 und 3.3.2). Die unterschiedliche Vermehrungsfähigkeit und Typ I IFN-Induktion der aviären und humanen H5N1-Isolate muss daher aus Kombinationen stammspezifischer Unterschiede resultieren, die nicht über die untersuchten Stämme konserviert sind. Die geringe Vermehrungsfähigkeit der aviären H5N1-Stämme ging einher mit einer beobachteten starken Typ I IFN-Induktion. Wie sich herausstellte, lösen in humanen Zellen auch H5N1-Stämme die Sekretion von IFN $\beta$  in Abhängigkeit von RIG-I aus (Punkt 2 der Fragestellung).

Da das NS1-Protein der wichtigste virale Modulator des nicht-adaptiven Immunsystems und essentiell zur Unterdrückung der Sekretion von Typ I IFN ist, wurde insbesondere die Funktionalität der H5N1-NS1-Proteine in humanen Zellen untersucht. Sämtliche H5N1-NS1-Proteine unterdrückten interessanterweise vergleichbar effizient die Aktivierung des humanen IFN $\beta$ -Promotors und reassortante Pan/99-Viren mit den H5N1-NS-Segmenten vermehrten sich effizient und lösten nur eine geringe IFN $\beta$ -Sekretion aus. Eine in humanen Zellen eingeschränkte Funktionalität der H5N1-NS1-Proteine, die RIG-I-vermittelte Aktivierung der Typ I IFN-Gene zu unterdrücken, liegt demnach nicht vor (Fragestellung, Punkt 3).

Die experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit lassen folgende Schlussfolgerungen zu:

- 1.) Humane und aviäre H5N1-Isolate unterscheiden sich deutlich in ihrer Vermehrungsfähigkeit und lösen unterschiedlich stark die Sekretion von Typ I IFN aus. Die Vermehrung aller untersuchten H5N1-Viren kann durch das humane Typ I IFN-System inhibiert werden.
- 2.) Die Aktivierung der Typ I IFN-Gene wird auch bei H5N1-Infektionen von RIG-I vermittelt. Sämtliche H5N1-NS1-Proteine zeigen aber keine eingeschränkte Funktionalität hinsichtlich der Unterdrückung einer Typ I IFN-Antwort in humanen Zellen.
- 3.) Humane H5N1-Isolate lösen keine stärkere Zytokinsekretion als ein saisonales Influenzavirus in humanen Lungenepithelzellen und Makrophagen aus. Möglicherweise ist eine Untersuchung komplexer Zellkulturmodelle (wie beispielsweise Lungenbiopsien) notwendig, um eine Hyperzytokinämie in H5N1-Infizierten nachzuvollziehen.
- 4.) Veränderungen in den viralen Polymerasekomplexen und/oder anderen viralen Proteinen als dem NS1-Protein sind von wesentlicher Bedeutung für die Vermeidung einer Typ I IFN-Antwort und bei der Adaptation an humane Zellen.

### **4.1 Vermehrungsfähigkeit und Typ I IFN-Induktion der H5N1-Stämme in humanen Zellen**

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich humane und aviäre H5N1-Isolate deutlich in ihrer Vermehrungsfähigkeit in humanen Zellen unterscheiden. Bei der Übertragung von H5N1-Influenzaviren von Vögeln auf den Menschen treten die Viren von ihrem natürlichen Reservoir auf einen neuen Wirt über (Zoonose). Während einige Viren streng

speziesspezifisch sind, weisen andere ein breites Wirtsspektrum auf. So infizieren beispielsweise Variola- und Polioviren nur Mensch und Affe, Influenza A Viren und Newcastle Disease Viren (NDV, Genus Morbillivirus) Vogel- und Säugerspezies und einige Viren, wie Arboviren und einige Togaviren, sogar Säuger und Insekten. Viele Viren weisen dabei ein natürliches Reservoir auf in dem sie häufig wenig oder apathogen sind. Dies erlaubt es ihnen, in diesen Wirten zu persistieren oder, wie Influenzaviren im Vögeln, schnell eine hohe Nachkommenschaft zu produzieren, die dann auf neue Wirte übertragbar ist. Eine schwere Symptomatik kann dabei dazu führen, dass der infizierte Wirt von Artgenossen gemieden wird und auch ein schneller Tod des Wirtes trägt oft nicht zu der Verbreitung der Virusnachkommenschaft bei. Die Übertragung eines Virus von einer Spezies auf eine andere (Zoonose) ist eher selten und häufig mit schweren und schwersten Symptomen verbunden, beispielsweise Infektionen von *Alphavirinae* (*Togaviridae*) im Menschen (Weiss, 2002). Übertragungen aviärer Influenzaviren auf den Menschen sind nur vereinzelt beschrieben (Tabelle 4.1) und berücksichtigt man die weite Verbreitung von H5N1-Stämmen im asiatischen Nutzgeflügel und die räumliche Nähe von Mensch und beispielsweise Haushuhn in diesen Gebieten, sind humane H5N1-Infektionen auch ein eher seltenes Ereignis (Abdel-Ghafar *et al.*, 2008; Vong *et al.*, 2009).

Humane Infektionen mit aviären Influenzaviren			
Jahr	Ort	Subtyp	Infektionen/Tote
1996, 2003	UK, NL	H7N7	90/1
1997	HK	H5N1	18/6
1999, 2003, 2007	HK/China	H9N2	9/0
2002, 2003, 2007	USA, UK	H7N2	6/0
2003 - 2010	verbreitet	H5N1	≈500/60%
2004	Canada	H7N3	2/0

**Tabelle 4-1** Dokumentierte direkte Übertragungen von aviären Influenzaviren auf den Menschen, nach (Maines *et al.*, 2008).

Wie bei Gelbfieber, Rabies und anderen Viren führen zoonotische Infektionen oft nicht zu einer weiteren Verbreitung in der neu infizierten Spezies. Auch H5N1-Infektionen im Menschen verlaufen mit schweren Symptomen, die häufig zum Tod des Infizierten führen und ohne dass es zu einer weiteren Transmission in der menschlichen Population kommt. Für eine weitere Verbreitung ist es essentiell, dass es zu der Bildung einer ausreichenden Nachkommenschaft kommt (produktive Infektion), die gut zwischen Individuen der neu

infizierten Spezies übertragbar ist. Produktive Infektionen können einerseits durch die Immunabwehr des Wirtes verhindert werden, andererseits muss die Virusnachkommenschaft auch so ausgeschieden werden, dass sie neue Wirte erreicht und in der Lage sein, entsprechende Zellen zu infizieren. Im Unterschied zu den hier untersuchten humanen H5N1-Isolaten, die sich genomisch kaum von den aviären H5N1-Stämmen unterscheiden, ist aus Zellkulturexperimenten bekannt, dass aviäre Influenzaviren sich in humanen Zellen nur wenig effizient vermehren (Hayman *et al.*, 2007; Hayman *et al.*, 2006). Als Ursache für die geringe Vermehrungsfähigkeit aviärer Influenzaviren in humanen Zellen wurden die Rezeptorspezifität der aviären HA-Proteine und eine durch diese Viren verstärkt ausgelöste Typ I IFN-Sekretion identifiziert sowie eine fehlende Adaptation der viralen Polymeraseproteine diskutiert (Connor *et al.*, 1994; Couceiro *et al.*, 1993; Gabriel *et al.*, 2007; Gabriel *et al.*, 2005; Hayman *et al.*, 2007; Hayman *et al.*, 2006; Rogers & Paulson, 1983; Subbarao *et al.*, 1993). Bei H5N1-Infektionen in Menschen und anderen Säugern wurde aber eine hohe Viruslast bei H5N1-Infektionen beobachtet (Baskin *et al.*, 2009; de Jong *et al.*, 2006; Maines *et al.*, 2005). Dies wirft die Frage auf, warum die humanen H5N1-Isolate im Menschen eine gute Vermehrungsfähigkeit zeigen und welchen Einfluss das nicht-adaptive Immunsystem auf die Vermehrung der H5N1-Stämme hat.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten humanen H5N1-Isolate vermehrten sich in den durchgeführten Zellkulturexperimenten vergleichbar effizient, wie der saisonale H3N2-Stamm. Die effiziente Vermehrung einiger H5N1-Stämme in den durchgeführten Experimenten ist gut erklärbar, da die verwendeten A549-, Calu-3 und VERO-Zellen auch  $\alpha$ 2,3-verknüpfte Sialinsäurereste präsentieren, über die aviäre Influenzaviren Zellen infizieren (persönliche Mitteilung, V. Weinheimer und (Cashman *et al.*, 2004; Zeng *et al.*, 2007)). Daher ist der Einfluss einer eventuell unterschiedlichen Rezeptorpräferenz auf die Vermehrung der verschiedenen Viren in den durchgeführten Experimenten vermutlich gering. Dementsprechend fanden sich im Rahmen dieser Arbeit weder in der monozyklischen Vermehrung (Abbildung 3-2) noch in dem viralen Proteingehalt infizierter Zellen (Abbildung 3-3) Hinweise darauf, dass die verwendeten Zelllinien schlechter von den aviären H5N1-Isolaten als von Pan/99 infiziert werden. Neuere Untersuchungen des Rezeptorbesatzes in humanen Lungen zeigen ebenfalls das Vorhandensein dieser Rezeptoren (Shinya *et al.*, 2006), was erklärt, warum die H5N1-Stämme auch Menschen

produktiv infizieren können. Die  $\alpha$ 2,3-gebundenen Sialinsäurereste werden aber insbesondere im tieferen menschlichen Respirationstrakt exprimiert, was zu der geringen Transmissibilität der H5N1-Stämme zwischen Menschen beitragen könnte (Shinya *et al.*, 2006).

Die bisher diskutierten Ergebnisse zeigen, dass sich H5N1-Stämme durchaus effizient in humanen Zellen vermehren können. Warum vermehrten sich aber die aviären H5N1-Isolate nicht ebenso effizient wie die Patientenisolate? Neben dem Rezeptorbesatz müssen andere zelluläre oder virale Faktoren die geringe Vermehrungsfähigkeit der aviären H5N1-Isolate in humanen Zellen bedingen. Die Bestimmung der IFN $\beta$ -Konzentrationen in den Zellkulturüberständen infizierter Zellen (Abbildung 3-4, Abbildung 3-6 und Abbildung 3-12) zeigte, dass die Infektion mit den aviären H5N1-Isolaten eine starke Sekretion von IFN $\beta$  in den humanen Lungenepithelzellen und Makrophagen auslöst. Im Unterschied dazu sekretierten Zellen die mit Pan/99 oder mit den humanen H5N1-Isolaten infiziert wurden nur wenig dieses Typ I IFNs.

Das Typ I IFN-System ist in der Lage die Replikation einer Vielzahl von Viren zu unterdrücken. Dieser Effekt wird überwiegend durch die Expression antiviral wirkender Proteine vermittelt, welche die IFN-stimulierten Zellen in einen so genannten antiviralen Zustand versetzen (Samuel, 2001; Stark *et al.*, 1998). Die beobachtete drastisch reduzierte Vermehrung der H5N1-Stämme auf den Typ I IFN-behandelten humanen Lungenepithelzelllinien demonstriert anschaulich, dass das humane Typ I IFN-System die Vermehrung von H5N1-Stämmen inhibieren kann (Abbildung 3-19). In einer Arbeit aus dem Jahr 2002 wurde dagegen publiziert, dass die Vermehrung einiger H5N1-Stämme, darunter das hier verwendete HK/97-Isolat in porzinen Lungenepithelzellen nicht durch eine Typ I IFN-Behandlung inhibiert wird (Seo *et al.*, 2002). Die porzine Herkunft dieser Zellen ist mittlerweile widerlegt, indem gezeigt wurde, dass es sich um Zellen einer Afrikanischen Grünen Meerkatze handelt (Silversides *et al.*, 2010). Da es sich bei den von Seo *et al.* verwendeten Zellen demnach nicht um Schweinezellen handelt, aber mit porzinem Interferon stimuliert wurde, zeigte das verwendete Typ I IFN auf diese Zellen wahrscheinlich kaum Wirkung, da Interferone streng speziesspezifisch wirken. Weiterhin wiesen die im Vergleich zu A549-Zellen deutlich geringeren Unterschiede in den erreichten Titern der aviären und humanen H5N1-Isolate auf den Typ I IFN-defizienten VERO-Zellen ebenfalls auf eine IFN-sensitive Vermehrung der H5N1-Stämme hin (Abbildung 3-17).

Dieses Ergebnis zeigt auch, dass die geringe Vermehrungsfähigkeit der aviären H5N1-Isolate in den humanen Lungenepithelzellen zumindest teilweise durch die von ihnen stark ausgelöste Typ I IFN-Sekretion bedingt ist. Dass aviäre H5N1-Isolate eine stärkere Sekretion von Typ I IFN im Vergleich zu saisonalen Laborstämmen *in vitro* auslösen, ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit kürzlich gezeigt worden (Ocana-Macchi *et al.*, 2009).

Die humanen H5N1-Isolate vermehrten sich im Vergleich zu Pan/99 in den Lungenepithelzelllinien zu höheren Titern. In den Lungengewebsbiopsien wurde nur eine ähnliche Vermehrungsfähigkeit der humanen H5N1-Isolate und Pan/99 festgestellt (Abbildung 3-8). Auch dies könnte durch die im Vergleich zu Pan/99 beobachtete stärkere IFN $\beta$ -Sekretion der mit den humanen H5N1-Isolaten infizierten Lungengewebsbiopsien erklärt werden: Während die humanen H5N1-Isolate in den homogenen Zellkulturen nur die Sekretion geringer IFN $\beta$ -Mengen induzieren und eine bessere Vermehrungsfähigkeit im Vergleich zu Pan/99 zeigen, wird durch die humanen H5N1-Stämme in den Lungengewebsbiopsien eine stärkere IFN $\beta$ -Sekretion ausgelöst, wodurch sich deren Vermehrungsfähigkeit auf das Niveau des Pan/99-Stammes reduziert (Abbildung 3-9 und Abbildung 3-8).

Diese Ergebnisse zeigen, dass das humane Typ I IFN-System die Vermehrung der H5N1-Stämme unterdrücken kann. Dass Typ I IFN die Vermehrung der H5N1-Stämme in humanen Zellkulturen zumindest verzögern können, wurde erstmals 2007 angedeutet (Zeng *et al.*, 2007). Mittlerweile zeigen auch publizierte Ergebnisse in Mäusen und Mauszellen (Szretter *et al.*, 2009) sowie in Frettchen (Kugel *et al.*, 2009) eine reduzierte Vermehrung der H5N1-Stämme durch eine Typ I IFN-Behandlung. Auch über eine geringere Transmissibilität von H5N1-Viren zwischen Typ I IFN-behandelten Meerschweinchen wurde berichtet (Van Hoeven *et al.*, 2009). Typ I IFN sind demnach in einer Vielzahl von Spezies gegen H5N1-Stämme antiviral wirksam. Eine geringere Typ I IFN-Sensitivität der Vermehrungsfähigkeit von H5N1-Stämmen im Vergleich zu saisonalen Influenzaviren wurde weder in den zu dieser Arbeit durchgeführten Experimenten noch in verschiedenen Publikationen deutlich (Szretter *et al.*, 2009; Zeng *et al.*, 2007).

Es wurde weiterhin publiziert, dass humane H5N1-Isolate die Typ I IFN-Gene humaner Lungenepithelzellen und Makrophagen deutlich stärker transkriptionell aktivieren als saisonale Influenzaviren (Chan *et al.*, 2005; Cheung *et al.*, 2002). Im Unterschied dazu

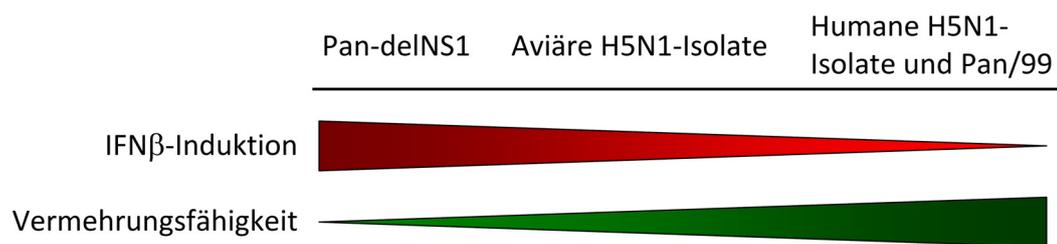
lösten die in der hier vorliegenden Arbeit untersuchten humanen H5N1-Stämme in den epithelialen Zelllinien und humanen Makrophagen eine zu Pan/99-vergleichbar geringe Typ I IFN-Sekretion aus (Abbildung 3-4 und Abbildung 3-12). Andere Autoren kommen ebenfalls zu einem solchen Ergebnis (Zeng *et al.*, 2007). Zeng *et al.* verglichen ebenfalls humane H5N1-Isolate mit dem saisonalen Pan/99-Stamm und demonstrierten, dass die H5N1-Stämme weder eine stärkere transkriptionelle Aktivierung der Typ I IFN-Gene noch eine stärkere Sekretion von IFN $\beta$  nach Infektion humaner Zellen auslösen. Die Unterschiede zu den erstgenannten Arbeiten (Chan *et al.*, 2005; Cheung *et al.*, 2002) resultieren wahrscheinlich aus den verschiedenen verwendeten Virusstämmen. Möglicherweise aktiviert das saisonale Pan/99-Virus deutlich stärker das humane Typ I IFN-System als die von den anderen Autoren zum Vergleich verwendeten saisonalen Influenzaviren.

#### **4.2 Mechanismen der Induktion und Blockade des Typ I IFN-Systems durch die H5N1-Stämme**

Zu Beginn der hier durchgeführten Arbeiten wurde angenommen, dass die beschriebene starke Zytokinsekretion, die von H5N1-Stämmen in humanen Zellen ausgelöst wird, auf einer zu saisonalen Influenzaviren unterschiedlichen Wechselwirkung mit dem nicht-adaptiven Immunsystem beruht. Typ I IFN sind ein wichtiger aktivierender Teil dieses Immunsystems und Viren haben unterschiedlichste Mechanismen entwickelt, die Aktivierung oder die antivirale Wirkung einer Typ I IFN-Antwort zu umgehen. Paramyxoviren mit negativ-orientiertem ssRNA-Genom unterdrücken beispielsweise durch ihre akzessorische V- und C-Proteine die Aktivierung einer Typ I IFN-Sekretion und zusätzlich die Jak-STAT-vermittelte Aktivierung der IFN-stimulierten Gene (Goodbourn & Randall, 2009). *Rota-* und *Orthoreovirinae*, die ein segmentiertes dsRNA-Genom aufweisen, degradieren entweder IRF-3 und -7 und unterdrücken die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und so auch eine IFN-Induktion (Rotaviren) oder sequestrieren dsRNA und inhibieren PKR (Reoviren). Viren beider Virusfamilien verhindern zusätzlich die Akkumulation von ISGF-3 im Zellkern (Sherry, 2009). Auch DNA-Viren modulieren durch immunmodulatorische Proteine das Typ I IFN-System. Beispielsweise inhibiert das Papillomvirus-E6-Protein IRF-3 und das Vaccinia Virus-E3L-Protein sequestriert unter anderem dsRNA (Ronco *et al.*, 1998; Xiang *et al.*, 2002).

Es ist bekannt, dass saisonale Influenzaviren über ihr NS1-Protein die Aktivierung des RIG-I-Signalweges, die Reifung und den Export zellulärer mRNAs und die Aktivierung von PKR unterdrücken. Wie wichtig für Influenzaviren die Vermeidung einer IFN-Antwort ist, zeigen die Ergebnisse zu der Pan-delNS1-Mutante. Dieses Virus unterscheidet sich von dem Pan/99 wt-Stamm nur durch die Deletion von NS1. In Typ I IFN-kompetenten A549- und Calu-3-Zellen ist dieses Virus im Vergleich zu Pan/99 stark attenuiert (Abbildung 3-1 und Abbildung 3-5) und Infektion mit hoher Multiplizität löste in A549-Zellen die stärkste IFN $\beta$ -Sekretion aller untersuchten Viren aus (Abbildung 3-4B). Auf den IFN-inkompetenten VERO-Zellen vermehrten sich das Pan-delNS1-Virus und der Pan/99-Stamm dagegen vergleichbar effizient (Abbildung 3-16).

Die aviären H5N1-Isolate zeigten eine etwas effizientere Vermehrung und geringere Typ I IFN-Induktion als das Pan-delNS1-Virus aber eine geringere Vermehrungsfähigkeit und stärkere Typ I IFN-Induktion als die humanen H5N1-Isolate und das Pan/99-wt-Virus (Abbildung 4-1).



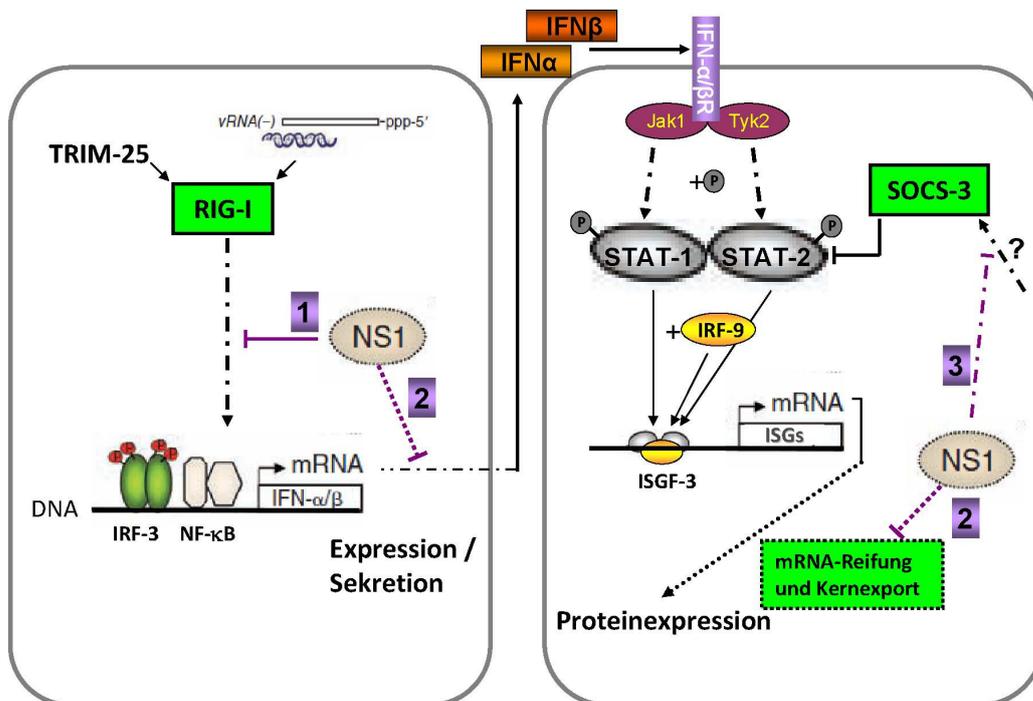
**Abbildung 4-1 Zusammenfassung Vermehrungsfähigkeit und Typ I IFN-Induktion in humanen Zellen**

Eine eingeschränkte Funktionalität der NS1-Proteine aviärer H5N1-Isolate, die Typ I IFN-Induktion in humanen Zellen zu inhibieren, würde diese Beobachtungen gut erklären.

Die durchgeführten Versuche unter siRNA-vermittelter Reduktion der RIG-I-Expression zeigten, dass RIG-I essentiell für die Sekretion von IFN $\beta$  nach H5N1-Influenzavirusinfektion ist. Ein analog durchgeführter RNAi-Versuch zeigte sogar, dass RIG-I für die IFN $\beta$ -Induktion durch die weniger engverwandten Influenza B Viren essentiell ist (Daten nicht gezeigt). Ein möglicher Einfluss von NOD2 auf die Typ I IFN-Induktion durch Influenzaviren (Sabbah *et al.*, 2009) wurde erst spät im Verlauf der Arbeiten bekannt und nicht untersucht. Die hier präsentierten Ergebnisse zusammen mit den publizierten Ergebnissen deuten darauf hin, dass NOD2 und RIG-I Komponenten desselben Signalweges zur Aktivierung des Typ I IFN-Systems sind, da jeweils ein essentieller Beitrag zur IFN-Induktion nach Influenzavirusinfektion beobachtet wurde (Opitz *et al.*, 2007; Sabbah *et al.*, 2009).

Interessanterweise zeigte sich aber, dass alle H5N1-NS1-Proteine effizient die Typ I IFN-Sekretion humaner Zellen unterdrücken. So unterdrückten auch die NS1-Proteine der aviären H5N1-Stämme in einem Reporterassay effizient die Aktivierung des humanen IFN $\beta$ -Promotors durch das Pan-delNS1-Virus (Abbildung 3-37), unterstützten die Vermehrung reassortanter Viren im Pan/99-Hintergrund (Abbildung 3-34) und unterdrückten deren Typ I IFN-Induktion (Abbildung 3-36). In verschiedenen Arbeiten wurde für andere aviäre NS1-Proteine ebenfalls eine gute Funktionalität in humanen Zellen beobachtet (Hayman *et al.*, 2007; Hayman *et al.*, 2006; Sandbulte *et al.*, 2008).

Die Aktivierung der Typ I IFN-Gene wird durch Interaktion der NS1-Proteine mit RIG-I, weiteren zellulären Proteinen wie TRIM-25 und mit RIG-I-aktivierender 5'-PPP-RNA unterdrückt (Gack *et al.*, 2009; Mibayashi *et al.*, 2007; Rehwinkel *et al.*, 2010).



**Abbildung 4-2: Darstellung möglicher NS1-Funktionen, die die Expression von IFN-stimulierten Genen beeinflussen könnten.** Die RIG-I vermittelte Aktivierung der Typ I IFN-Gene als Folge der Erkennung viraler RNA wird durch Unterdrückung der RIG-I-Aktivierung durch NS1 unterbunden (links, 1). Die Expression der Typ I IFN-Gene und der IFN-stimulierten Gene (ISGs) könnte durch die NS1-vermittelte Inhibition der Reifung und des Kernexports zellulärer mRNA unterdrückt werden (2). Durch einen Einfluss des NS1-Proteins oder anderer viraler Proteine auf die Expression oder Funktion von SOCS-3, könnte auch die Signalweiterleitung von aktivierten Typ I IFN-Rezeptoren hin zu der Aktivierung der STAT-Proteine und somit zu der Bildung des IFN-stimulierten Genfaktors-3 (ISGF-3) unterdrückt werden (3). Während alle drei Mechanismen Einfluss auf die Expression antiviral wirksamer Proteine haben können, würden die rechts dargestellten Mechanismen (2 und 3) auch die Wirkung einer Typ I IFN-Stimulation abschwächen.

Weiterhin binden die NS1-Proteine CPSF30 und andere Proteine, die an der mRNA-Reifung zellulärer Gene beteiligt sind und unterdrücken so die Translation zellulärer Proteine

(Fortes *et al.*, 1994; Nemeroff *et al.*, 1998; Satterly *et al.*, 2007). Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente lassen allerdings keine Aussage darüber zu, ob die Blockade des Typ I IFN-Systems durch NS1 überwiegend durch die Inhibition der RIG-I-vermittelten transkriptionellen Aktivierung der Typ I IFN-Gene oder durch die Retention und Degradation zellulärer mRNA im Zellkern vermittelt wird (Abbildung 4-2, Mechanismen 1 und 2). Auch saisonale Influenzaviren unterdrücken eine Typ I IFN-Antwort in deutlich unterschiedlichem Ausmaß über die Inhibition des RIG-I-Signalweges oder über die Inhibition von CPSF30 und der post-transkriptionellen mRNA-Reifung (Kochs *et al.*, 2007). Möglicherweise wird aber auch die über Typ I IFN und den IFN $\alpha/\beta$ -Rezeptor vermittelte transkriptionelle Aktivierung IFN-stimulierter Gene in mit den humanen H5N1-Isolaten infizierten Zellen anders moduliert als in Pan/99-infizierten Zellen. Es ist denkbar, dass die SOCS-3-Expression (*suppressor of cytokine signaling-3*) in den H5N1-infizierten Zellen stärker hochreguliert wird, als in Pan/99 infizierten Zellen (Mechanismus 3 in Abbildung 4-2). SOCS-3 inhibiert die Signalweiterleitung von dem IFN $\alpha/\beta$ -Rezeptor hin zu der Phosphorylierung der STAT1- und STAT2-Proteine und kann so die transkriptionelle Aktivierung IFN-stimulierter Gene während Influenzavirusinfektionen herabregulieren (Pauli *et al.*, 2008). Auf welchem Weg die Expression von SOCS-3 als Antwort auf Influenzavirusinfektion induziert wird, ist bisher nicht gänzlich geklärt. Bekannt ist, dass die Aktivierung der SOCS-3-Expression abhängig von 5'-PPP-RNA und teilweise NF- $\kappa$ B ist, nicht aber von Typ I IFN (Pauli *et al.*, 2008). Eine Analyse des mRNA-Gehaltes IFN-stimulierter Gene oder deren Expression in IFN-stimulierten Zellen, die die verschiedenen NS1-Proteine exprimieren, könnte zeigen, ob und in welchem Ausmaß die H5N1-NS1-Proteine über die in Abbildung 4-2 dargestellten Mechanismen 2 und 3 wirken.

Dass die in Abbildung 4.2 dargestellten Mechanismen 2 und 3 eine wesentlichen Rolle bei der Unterdrückung einer Typ I IFN-Antwort durch die H5N1-Stämme spielen könnten, deutete sich in den RNAi-Versuchen an: In den Pan/99-infizierten Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen ist eine deutliche RIG-I-Expression erkennbar (Abbildung 3-23 und Abbildung 3-25), in entsprechenden mit HK/97 und Thai/04 infizierten Ansätzen war eine RIG-I-Expression per Western Blot dagegen kaum detektierbar. Die RIG-I-Expression wird über IRF1 durch Typ I IFN stark stimuliert (Abbildung 3-24 und (Sanda *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2007; Yoneyama & Fujita, 2010)). Das Pan/99-Virus löste in diesen Ansätzen eine etwas schwächere Sekretion von IFN $\beta$  als Thai/04 aus, wodurch eine geringe RIG-I-Expression in

Pan/99 infizierten Ansätzen zu erwarten wäre. Dass dies nicht der Fall ist, könnte durch eine stärkere Unterdrückung der Reifung und des Exports zellulärer mRNA durch die NS1-Proteine der humanen H5N1-Isolate im Vergleich zu dem Pan/99-NS1-Protein erklärt werden oder auch durch eine unterschiedliche SOCS-3-Regulation/Expression. Ein starkes Eingreifen der humanen H5N1-Stämme in die mRNA-Reifung und den Jak-Stat-Signalweg (Mechanismen 2 und 3 in Abbildung 4.2) müsste den Effekt von Typ I IFN auf deren Vermehrung erkennbar reduzieren. Die Vermehrung von Pan/99 und den humanen H5N1-Isolaten war aber in Anwesenheit des Typ I IFN-Analogons stark und kaum unterschiedlich reduziert. Allerdings war die Vermehrung des Pan/99-Stammes und des HK/97-Isolates im Vergleich mit den anderen Stämmen in Typ I IFN-behandelten A549-Zellen am stärksten reduziert (Abbildung 3-18). Interessanterweise wurde berichtet, dass die NS1-Proteine der H5N1-Stämme aus dem Jahr 1997 nicht an CPSF30 binden können, da die dafür als essentiell angesehenen Aminosäuren F103 und M106 in deren NS1-Proteinen nicht vorkommen (Tabelle 3.1 und (Twu *et al.*, 2007)).

Eine genauere Untersuchung, welchen Beitrag die Mechanismen 2 und 3 zur Unterdrückung einer Typ I IFN-Antwort leisten, könnte daher interessant sein. Dazu müsste die Vermehrung der Viren bei Anwesenheit steigender Typ I IFN-Konzentrationen untersucht werden. Für diese Experimente sollte mit der IFN-Behandlung der Zellen erst nach erfolgter Infektion begonnen werden. Auch sollten Typ I IFN-defiziente aber nachweislich IFN-stimulierbare Zellen verwendet werden, um die Ergebnisse nicht durch mögliche Unterschiede in der IFN-Induktion durch die Viren selbst zu verfälschen.

### **4.3 Humane H5N1-Isolate lösen keine stärkere Zytokinsekretion in homogenen Zellkulturen aus**

Die im Ergebnisteil dargestellten Konzentrationsbestimmungen von Zytokinen (Abbildung 3-14 und Abbildung 3-15) zeigen, dass die humanen H5N1-Isolate in Lungenepithelzellen und Makrophagen keine stärkere Zytokinsekretion auslösten als das Pan/99-Virus. Nur die aviären H5N1-Isolate, die auch eine starke IFN $\beta$ -Sekretion auslösen, verursachten eine erhöhte Sekretion verschiedener Zytokine, was darauf hindeutet, dass die Sekretion der gemessenen Zytokine und IFN $\beta$  ähnlich induziert wird und/oder dass die Zytokinsekretion durch Typ I IFN stimuliert wird.

Für einige Zytokine, wie RANTES, IP-10 und MCP-1 ist gezeigt, dass sie Typ I IFN-induzierbar sind, oder, wie zusätzlich auch TNF $\alpha$  und IL-8, nach Infektion Typ I IFN-stimulierter Zellen

verstärkt sekretiert werden (Buttmann *et al.*, 2007; de Veer *et al.*, 2001; Veckman *et al.*, 2006). Eine neuere Publikation deutet andererseits an, dass beispielsweise die Sekretion der Zytokine RANTES, IP-10 und IL-6 als Antwort auf Influenza A Virusinfektionen *in vitro* überwiegend Typ I IFN unabhängig erfolgt, möglicherweise direkt durch die Aktivierung von IRF-3 (Goodman *et al.*, 2010). Einige Zytokingene scheinen demnach durch das Zusammenspiel mehrerer Signalwege hoch redundant reguliert.

Während die hohe Pathogenität von H5N1-Stämmen im Menschen mit einer hohen Viruslast und hohen Zytokinkonzentrationen im Serum der Infizierten assoziiert wurde, lösten die humanen H5N1-Isolate in den zu der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten nur eine zu Pan/99 vergleichbar geringe Zytokinsekretion aus. Hohe Zytokinkonzentrationen während H5N1-Infektionen korrelieren oft auch mit einer hohen Viruslast (de Jong, 2008; Ng *et al.*, 2006; van den Brand *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2009). Dies deutet stark darauf hin, dass die Hyperzytokinämie während H5N1-Infektionen eher eine Folge des schweren Infektionsverlaufes ist, nicht aber durch ein höheres Potential der humanen H5N1-Isolate, die Sekretion von Zytokinen auszulösen, verursacht wird. Dass die durch die H5N1-Stämme *in vivo* induzierten hohen Konzentrationen verschiedener Zytokine deren hohe Pathogenität bedingen, ist auch mehr und mehr zu bezweifeln. So zeigten sich in NF- $\kappa$ B- oder Zytokinrezeptor-*knock-out* Mäusen keine Unterschiede in der Schwere der Symptomatik von H5N1-Infektionen (Droebner *et al.*, 2008; Salomon *et al.*, 2007). Auch andere Viren, beispielsweise SARS-CoV, induzieren ähnlich wie H5N1-Viren in den Lungen infizierter Makaken stark die Transkription der Typ I IFN- und IL-6-, IL-8- und IP-10-Gene, verursachen prozentual aber deutlich weniger fatale Infektionen (SARS-CoV 11 %, statt 60 % bei H5N1-Infektionen) im Menschen (Baskin *et al.*, 2009; Cilloniz *et al.*, 2009; de Lang *et al.*, 2007; Ng *et al.*, 2006). Das humane Respiratorische Synzytial-Virus verursacht nur selten fatale Infektionen ( $\ll 1$  %, (Leung *et al.*, 2005)) und induziert ebenfalls die Expression verschiedener Zytokingene, wie für Typ I IFN, IL-6, IL-8, IP-10 und RANTES gezeigt wurde (Arnold *et al.*, 1994; Garofalo *et al.*, 1996; Olszewska-Pazdrak *et al.*, 1998).

Im Unterschied zu den homogenen Lungenepithelzell- und Makrophagenkulturen lösten die humanen H5N1-Isolate in den humanen Lungengewebsbiopsien interessanterweise eine stärkere Sekretion von IFN $\beta$  im Vergleich zu Pan/99 aus (Abbildung 3-9). Dies könnte darauf hindeuten, dass andere Zellen als Epithelzellen und Makrophagen durch die H5N1-Stämme stärker als durch das Pan/99-Virus dazu stimuliert werden, IFN $\beta$  zu sekretieren.

Insbesondere kämen (plasmazytoide) dendritische Zellen dafür in Frage, die phagozytierte Influenzaviren TLR-7-abhängig detektieren und große Mengen Typ I IFN sekretieren (Diebold *et al.*, 2004; Sandbulte *et al.*, 2008). Durch die Abwesenheit verschiedener Zelltypen könnten die verwendeten homogenen Zellkulturen daher ein zu vereinfachtes Modellsystem darstellen, um die Hyperzytokinämie in H5N1-Infizierten zu erklären. Die Aktivierung oder Kostimulation von Immunzellen durch infizierte Lungenepithelzellen, die als ‚Sentinel‘ des nicht-adaptiven Immunsystems betrachtet werden, könnte ebenfalls dazu führen, dass bestimmte Zytokine *in vivo* deutlich stärker sekretiert werden (Hippenstiel *et al.*, 2006). Eine Konzentrationsbestimmung der von Lungengewebsbiopsien sekretierten Zytokine wird im Rahmen einer anderen Promotionsarbeit derzeit in der Gruppe analysiert und könnte weitere Hinweise dazu liefern, ob die Hyperzytokinämie in H5N1-Infizierten durch in dieser Arbeit nicht untersuchte Zelltypen verursacht wird.

Interessanterweise vermehrten sich die H5N1-NS-Reassortanten im Vergleich zu Pan/99 in den Lungenstücken deutlich weniger effizient als in A549-Zellen, ohne eine stärkere Typ I IFN-Sekretion auszulösen. Dies könnte darauf hindeuten, dass die H5N1-NS1-Proteine Signalwege, die nicht in die Aktivierung des Typ I IFN-Systems involviert sind, anders beeinflussen als saisonale Influenzavirus-NS1-Proteine. Denkbar wären beispielsweise Signalwege der Apoptoseregulation, wie der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-abhängige Signalweg, oder Signalwege die zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Jun-N-terminale Kinase oder AP-1 führen (Ehrhardt *et al.*, 2007; Ludwig *et al.*, 2002). Andere H5N1-NS1-Funktionen könnten so möglicherweise auch zu einer verstärkten Aktivierung bestimmter Zytokingene beitragen, wie durch *in vivo*-Experimente von Lipatov *et al.* angedeutet.

#### **4.4 Mögliche Erklärungen für die unterschiedlich starke Typ I IFN-Induktion der aviären und humanen H5N1-Isolate**

Die untersuchten humanen H5N1-Isolate unterscheiden sich deutlich in ihrer Vermehrungsfähigkeit und in der durch sie ausgelösten Typ I IFN-Sekretion von den untersuchten aviären H5N1-Stämmen. Dabei handelt es sich bei den humanen H5N1-Isolaten auch um aviäre Influenzaviren die lediglich bereits im Menschen replizierten. Es ist bekannt, dass aviäre Influenzaviren nach Infektion humaner Zellen eine stärkere Sekretion von IFN $\beta$  auslösen können und sich weniger effizient vermehren als saisonale Influenzaviren (Hayman *et al.*, 2007; Hayman *et al.*, 2006).

Worum vermehren sich die humanen H5N1-Isolate dann so effizient in humanen Zellen? Einerseits ist es möglich, dass die humanen H5N1-Isolate bereits Adaptationen an humane Zellen während der Infektion im Menschen erworben haben. Daraufhin deutet, dass die ursprünglichen H5N1-Patientenisolate in der Tat teilweise aus einer Population verschiedener Varianten des selben Virus bestehen (Le *et al.*, 2009). Demnach werden bei der Infektion im Menschen bestimmte Subpopulationen oder Viren mit bestimmten Polymorphismen/Mutationen stark selektioniert. Je nach Replikationsdauer im Menschen könnte dies dazu führen, dass die isolierten H5N1-Stämme bereits unterschiedlich gut an humane Zellen angepasst sind. Auch nach der Isolation kann es zu einer weiteren Selektion und Adaptation durch Passagen in humanen oder mammalen Zellkultursystemen kommen. Die in der Fachliteratur untersuchten humanen H5N1-Isolate können daher unterschiedlich stark an humane Zellen adaptiert sein. Auch die Eigenschaft, stark die Sekretion verschiedener Zytokine auszulösen, könnte dadurch im Vergleich zu den ursprünglich auf den Menschen übertragenen H5N1-Viren abnehmen.

Eine Vielzahl von Adaptationen aviärer H5N1-Stämme an humane oder Säugerzellen ist bereits beschrieben und größtenteils in Tabelle 3-1 zusammengefasst. Die Sequenzierungsdaten der in der vorliegenden Arbeit verwendeten H5N1-Stämme zeigten, dass keine dieser Adaptationen in beiden humanen H5N1-Isolaten vorkommt und demnach essentiell für deren gute Vermehrungsfähigkeit in humanen Zellen ist. Die Proteine der hier untersuchten humanen H5N1-Isolate unterscheiden sich von allen Proteinen der aviären Isolate nur in den Aminosäurepositionen 127 im NS1-Protein und 168 im M1-Protein. Eine ursächliche Bedeutung für die phänotypischen Unterschiede zwischen den aviären und humanen H5N1-Isolaten konnte diesen genomischen Unterschieden nicht zugeordnet werden (Abschnitt 3.3.1 und 3.3.2). Es erscheint daher wahrscheinlich, dass die unterschiedliche IFN $\beta$ -Induktion und Vermehrungsfähigkeit der untersuchten Stämme aus stammspezifischen Unterschieden, möglicherweise in mehreren Gensegmenten, resultiert.

Im Vergleich zu bereits publizierten Sequenzdaten des HK/97- und Thai/04-Stammes fanden sich auf Aminosäureebene nur ein Unterschied im HK/97-NS1-Protein und je einer in den PA-Proteinen. Vergleichsdaten für die untersuchten aviären Viren existieren nicht. Es ist nicht auszuschließen, dass die beobachteten Mutationen in den humanen H5N1-Isolaten dazu führen, dass sie sich ähnlicher zu saisonalen Influenzaviren verhalten, als die

ursprünglich aus Patienten isolierten Viren. Die Mutation im HK/97-PA-Protein (K142E; Lysin in den publizierten Sequenzen) wurde bereits als einer von acht Unterschieden zwischen den H5N1-Isolaten A/Vietnam/1203/2004 und A/Vietnam/1204/2004 beschrieben. Diese Isolate wurden aus dem gleichen Patienten isoliert und sind wahrscheinlich Teil einer Quasispezies (Novak, 1992; Tran *et al.*, 2004). Während das Vietnam/1203-Isolat E142 aufweist, trägt das Vietnam/1204-Isolat K142 im PA-Protein und weist eine 40-fach höhere letale Dosis in Mäusen auf. Die höhere Pathogenität des Vietnam/1203-Isolates wird aber auf die gut untersuchte Variation E627K in dessen PB2-Protein zurückgeführt (Maines *et al.*, 2005).

Andererseits ist es möglich, dass stammspezifische Unterschiede vor der Übertragung auf den Menschen, statt erst danach erworbene Adaptationen, die unterschiedliche Vermehrungsfähigkeit und Typ I IFN-Induktion der untersuchten humanen und aviären H5N1-Isolate bedingen. So wurde gezeigt, dass sich humane H5N1-Isolate in Mäusen und Frettchen effizienter vermehren als aviäre und eine höhere Pathogenität aufweisen (Govorkova *et al.*, 2005; Maines *et al.*, 2005). Govorkova *et al.* verglichen beispielsweise aviäre und humane H5N1-Isolate in einem Frettchenmodell und beobachteten, dass vier von vier getesteten humanen H5N1-Isolaten hohe Titer in den Tieren erreichten und fatale Infektionen verursachten. Von neun ebenfalls getesteten aviären H5N1-Isolaten verursachten nur zwei fatale Infektionen, die sich ähnlich effizient vermehrten wie die humanen H5N1-Isolate (Govorkova *et al.*, 2005). Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass möglicherweise nur ein kleiner Teil der in Vögeln vorkommenden hochpathogenen H5N1-Stämme fatale Infektionen in Säugern hervorrufen kann. Möglicherweise gehören die in der vorliegenden Arbeit untersuchten aviären Isolate nicht dazu, was die deutlichen Unterschiede zwischen den hier untersuchten H5N1-Stämmen ebenfalls erklären würde. Wenn nur ein geringer Anteil der aktuell in Vögeln zirkulierenden H5N1-Stämme produktive humane H5N1-Infektionen verursachen kann, würde dies auch gut deren Seltenheit begründen.

Unabhängig von der Frage, warum sich die humanen H5N1-Isolate so deutlich von den hier untersuchten aviären Isolaten unterscheiden, bleibt noch die Frage offen, wodurch es zu der in dieser Arbeit beobachteten geringeren Vermehrungsfähigkeit der aviären Isolate kommt. Die aviären H5N1-Isolate verursachten eine starke Aktivierung des Typ I IFN-

Systems in den untersuchten humanen Zellen, die nicht auf funktionelle Unterschiede in den NS1-Proteinen zurückgeführt werden konnte. Demnach müssen andere virale Faktoren in den aviären H5N1-Isolaten die starke Typ I IFN-Sekretion auslösen.

Die transkriptionelle Aktivierung der Typ I IFN-Gene durch die H5N1-Stämme wird von RIG-I-vermittelt (Abbildung 3-23) das während der Replikation gebildete 5'-triphosphorylierte RNA erkennt (Hornung *et al.*, 2006; Pichlmair *et al.*, 2006). Demnach ist es wahrscheinlich, dass die aviären H5N1-Isolate in humanen Zellen mehr RIG-I-aktivierende RNA produzieren, wodurch eine stärkere IFN $\beta$ -Sekretion ausgelöst wird. Aus HK/97-, Pan/99- oder Pan-delNS1-infizierten Zellen isolierte RNA löste in transfizierten Zellen nur eine schwache Sekretion von IFN $\beta$  aus, im Unterschied zu RNA-Präparationen aus Zellen, die mit den anderen Viren infiziert wurden (Abbildung 3-39). Da die IFN $\beta$ -Sekretion in diesen Versuchen nur durch 5'-PPP-RNA-Enden stimuliert wurde (Abbildung 3-40), muss während der Infektion mit den aviären Isolaten und Thai/04 tatsächlich mehr 5'-PPP-RNA gebildet worden sein (Hornung *et al.*, 2006; Rehwinkel *et al.*, 2010; Schlee *et al.*, 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nicht mehr abschließend geklärt werden, ob die aviären H5N1-Isolate das Typ I IFN-System auf Grund funktioneller Unterschiede in den Polymeraseproteinen stärker aktivieren. Dafür spricht, dass insbesondere Adaptationen in den Influenzavirus-Polymerasegenen wichtig für deren effiziente Replikation in Säugern sind (Bradel-Tretheway *et al.*, 2008; Gabriel *et al.*, 2007; Gabriel *et al.*, 2005; Massin *et al.*, 2001; Salomon *et al.*, 2006; Subbarao *et al.*, 1993). Interessanterweise zeigen die Ergebnisse mehrerer neuerer Publikationen, dass reassortante Viren, die H5N1-Polymerasesegmente tragen, verschiedene Zytokine stärker induzieren können (Conenello *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009; Mok *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2009). Ein höherer Gehalt an 5'-PPP-RNA, der zu einer verstärkten Detektion der Infektion durch RIG-I führt, könnte diese Beobachtungen gut erklären. Über eine in humanen Zellen höhere Aktivität aviärer Polymerasekomplexe im Vergleich zu saisonalen Influenzaviren ist bereits berichtet worden (Bradel-Tretheway *et al.*, 2008).

Im Fall eines Laborstammes (A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)) trugen nur komplette/volle Länge virale RNAs zu der RIG-I-Aktivierung in humanen Zellen bei (Rehwinkel *et al.*, 2010). Bei der Replikation der aviären H5N1-Isolate in humanen Zellen könnte aber auch viel *defective interfering* (DI-)RNA gebildet werden, die entsteht, wenn bei der Transkription interne Bereiche der Vorlage nicht mit synthetisiert werden (Davis *et al.*, 1980; Fodor *et al.*, 2003).

Für Paramyxoviren wird ein wichtiger Einfluss der Polymerasegenauigkeit auf die Typ I IFN-Induktion und die virale Fitness bereits diskutiert (Goodbourn & Randall, 2009).

### **4.5 Ergebnis dieser Arbeit**

Die in der vorliegenden Arbeit dokumentierte Analyse humaner und aviärer H5N1-Isolate im Vergleich zu einem saisonalen humanpathogenen Influenzavirus liefert insbesondere neue Erkenntnisse zu der Aktivierung und Blockade des humanen Typ I IFN-Systems durch (aviäre) Influenzaviren. So zeigt diese Arbeit, dass auch H5N1-Stämme sich in Gegenwart von Typ I IFN kaum vermehren und dass die Vermeidung der Aktivierung des Typ I IFN-Systems wahrscheinlich einen wichtigen adaptiven Schritt aviärer Influenzaviren an den humanen Wirt darstellt. Zusammen mit den durchgeführten Untersuchungen die zeigen, dass nicht alle humanen H5N1-Stämme eine starke Sekretion von Typ I IFN und anderen Zytokinen in humanen Zellen auslösen, trägt diese Arbeit dazu bei, Widersprüche verschiedener Publikationen in der Fachliteratur zu klären und das pandemische Potential dieser Viren besser einzuschätzen. Außerdem wird deutlich, dass das in der Fachliteratur verfügbare Wissen über Adaptationen der H5N1-Stämme an humane Zellen nicht ausreicht, um die gute Vermehrung zumindest einiger H5N1-Stämme in humanen Zellen zu erklären.

Um eine Pandemie zu verursachen, müssen die H5N1-Stämme sich gut im Menschen vermehren können und die Fähigkeit aufweisen, sich effizient von Mensch zu Mensch zu verbreiten. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten humanen H5N1-Isolate zeigen in humanen Zellen eine ebenso effiziente Vermehrung, wie das saisonale H3N2-Virus Pan/99. Allerdings wurde bisher nur eine geringe Übertragbarkeit von H5N1-Viren zwischen Menschen beobachtet (Abdel-Ghafar *et al.*, 2008). Dies ist wahrscheinlich dadurch begründet, dass die H5N1-Viren, im Unterschied zu saisonalen Influenzaviren, im Menschen überwiegend in tiefen Lungenbereichen replizieren und sich deshalb schlecht durch Niesen und Husten verbreiten (Shinya *et al.*, 2006; van Riel *et al.*, 2010). Da sich Menschen in den letzten sieben Jahren knapp 500-mal mit H5N1-Stämmen infiziert haben und weiterhin infizieren werden, besteht eine ernstzunehmende Wahrscheinlichkeit, dass H5N1-Stämme die Fähigkeit erwerben, sich effizient von Mensch zu Mensch zu verbreiten. Im Unterschied zu der aktuell stattfindenden Pandemie, ausgelöst durch ein H1N1-Virus aus Schweinen das nur selten fatale Infektionen im Menschen verursacht, könnte eine Pandemie mit H5N1-Viren zu deutlich höheren Opferzahlen führen. Ursache dafür ist die

hohe Pathogenität der H5N1-Stämme, die bei etwa 60 % der Infektionen zu einem fatalen Ausgang führt (WHO, 2010a). Der überwiegende Anteil der menschlichen Bevölkerung besitzt ein H5N1-Stämmen gegenüber naives Immunsystem. Das bedeutet, dass das nicht-adaptive Immunsystem bis zu der Ausreifung spezifischer B- und T-Zellen H5N1-Infektionen allein eindämmen muss. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte effiziente Vermehrung einiger H5N1-Isolate in humanen Zellen kann daher entscheidend zu der ungewöhnlich hohen Pathogenität der H5N1-Stämme im Menschen beitragen. Die Hyperzytokinämie, die mit der Pathogenität der H5N1-Stämme im Menschen assoziiert wurde, erscheint an Hand der im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse, eher als Folge der hohen Viruslast. So zeigt diese Arbeit, dass nicht alle H5N1-Isolate in humanen Lungenepithelzellen oder Makrophagen die Sekretion von Typ I IFN und anderen Zytokinen stärker stimulieren als ein saisonales (H3N2) Virus. Auf Grund der hohen Viruslast der H5N1-Stämme im Menschen werden wahrscheinlich viele Zellen infiziert, die dann Zytokine sekretieren und zu einer starken Infiltration von Immunzellen in die infizierte Lunge führen können. Das Lungengewebe wird dabei durch die massive Virusinfektion und wahrscheinlich auch durch die Immunzellaktivität geschädigt, was zu Gewebeschäden bis hin zu Organversagen führen kann.

In Bezug auf die Induktion und Blockade des Typ I IFN-Systems war es im Rahmen dieser Arbeit wichtig zu zeigen, dass H5N1-Influenzaviren das Typ I IFN-System nicht generell stark aktivieren und sich in Anwesenheit von Typ I IFN auch ähnlich wenig vermehren wie saisonale Influenzaviren. Die Gabe von Typ I IFN um die hohe Viruslast bei H5N1-Infektionen zu reduzieren, könnte daher in Betracht kommen. Eine präventive Gabe geringer Typ I IFN-Dosen gegen Influenzavirusinfektionen wird zurzeit klinisch getestet (O. Planz, persönliche Kommunikation) und wäre den vorliegenden Ergebnissen zufolge auch im Fall einer H5N1-Pandemie denkbar. Typ I IFNs werden bereits zu der Behandlung von Schubförmig-remittierender Multipler Sklerose, einigen Krebserkrankungen und von Hepatitis B und C Virusinfektionen klinisch eingesetzt (Kiladjian *et al.*, 2008; Tourbah & Lyon-Caen, 2007). Auch für die Eindämmung und Beseitigung von SARS-CoV-Infektionen wird die Typ I IFN-Antwort als essentiell angesehen und wurde die therapeutische Gabe von Typ I IFN untersucht (Cameron *et al.*, 2007; Cinatl *et al.*, 2003; Dahl *et al.*, 2004; de Lang *et al.*, 2007).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine zu saisonalen Influenzaviren ähnliche Funktionalität der H5N1-NS1-Proteine und dass deren Funktionalität auch für die Vermehrung der H5N1-Stämme wichtig ist. Dies macht das NS1-Protein zu einem noch attraktiveren Ziel für die Entwicklung neuer antiviraler Medikamente (Basu *et al.*, 2009). Des Weiteren bietet die neue Information, dass neben den saisonalen auch aviäre Influenzaviren den humanen RIG-I-Signalweg für eine effiziente Replikation im Menschen inhibieren müssen, möglicherweise einen Anreiz, nach klinisch nutzbaren Aktivatoren dieses Signalweges zu suchen, die jenseits der NS1-vermittelten Blockade ansetzen. Eine solche Klasse antiviraler Medikamente könnte neben Influenzaviren auch gegen andere Viren wirksam sein, wie beispielsweise Hanta Viren, Hepatitis C Viren und Picornaviren, die ebenfalls den RIG-I-Signalweg inhibieren.

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass Adaptationen in den Polymeraseproteinen aviärer Influenzaviren entscheidend zu der Vermeidung einer Typ I IFN-Antwort in humanen Zellen beitragen können. Viele publizierte Untersuchungen machen Adaptationen in den Polymeraseproteinen für eine effiziente Vermehrung aviärer Influenzaviren in humanen Zellen verantwortlich. In wie weit dies mit einer verringerten Aktivierung des Typ I IFN-Systems in Zusammenhang steht, wurde bisher nicht untersucht. Reassortante Viren, die in einem definierten Hintergrund die H5N1-Polymerasesegmente tragen, können dazu ebenso interessante Erkenntnisse liefern, wie eine Charakterisierung der während der Replikation von Influenzaviren gebildeten RNAs und ihres Beitrages zu der Aktivierung des nicht-adaptiven Immunsystems.

## 5 Zusammenfassung

Die antiviral wirkenden Typ I Interferone (IFN $\beta$  und die verschiedenen  $\alpha$ -IFN) werden von infizierten Zellen als Antwort auf Virusinfektionen sekretiert. Typ I IFN induzieren die Expression antiviraler Proteine, aktivieren Immunzellen und die Sekretion weiterer Zytokine. Humane Influenza A Viren unterdrücken die RIG-I-vermittelte Aktivierung der Typ I IFN-Gene mit Hilfe ihres NS1-Proteins, um sich effizient vermehren zu können. Im Unterschied zu diesen saisonalen Influenzaviren wurde gezeigt, dass die hochpathogenen H5N1-Stämme die Typ I IFN-Gene stark aktivieren und sich trotzdem zu hohen Titern vermehren. Eine starke IFN-Sekretion könnte zu der beobachteten Hyperzytokinämie in H5N1-Infizierten beitragen, die mit der hohen Pathogenität der H5N1-Stämme assoziiert wurde. Die der starken Typ I IFN-Induktion in H5N1-infizierten Zellen zugrunde liegenden Mechanismen sind kaum verstanden und wurden durch vergleichende Untersuchungen humaner und aviärer H5N1-Isolate und einem saisonalen H3N2-Stamm analysiert.

Die durchgeführte Charakterisierung aviärer und humaner H5N1-Isolate in verschiedenen humanen Zellkultursystemen zeigte eine geringe Vermehrungsfähigkeit der aviären H5N1-Isolate, die eine starke IFN $\beta$ -Sekretion auslösten. Die humanen H5N1-Isolate und das saisonale H3N2-Virus zeigten dagegen eine effiziente Vermehrung und geringe IFN $\beta$ -Induktion. Die Vermehrung aller Viren war durch Typ I IFN inhibierbar. Die geringe Vermehrung der aviären Isolate konnte mit deren starker IFN $\beta$ -Induktion in humanen Zellen assoziiert werden. Die H5N1-NS1-Proteine zeigten eine für alle Stämme vergleichbare Funktionalität, die Aktivierung des humanen IFN $\beta$ -Promotors zu inhibieren. Reassortante Viren, die die H5N1-NS-Segmente im Hintergrund des H3N2-Stammes tragen, zeigten, dass die H5N1-NS-Segmente die Vermehrung saisonaler Viren unterstützen können. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die H5N1-Stämme das Typ I IFN-System RIG-I-abhängig aktivieren und RIG-I-unabhängige Typ I IFN-induzierende Signalwege nicht wesentlich zu der durch die H5N1-Stämme ausgelösten Typ I IFN-Sekretion beitragen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass aviäre nicht aber humane H5N1-Isolate ein starkes Typ I IFN-induzierendes Potential besitzen können, das im Fall der aviären Isolate nicht durch deren NS1-Proteine vollständig kontrolliert werden kann. Weiterhin zeigte sich, wie für saisonale Influenzaviren auch, dass die H5N1-Stämme darauf angewiesen sind, die Aktivierung des Typ I IFN-Systems zu umgehen um sich effizient in humanen Zellen vermehren zu können.



# Anhang

## Literatur

- Abdel-Ghafar, A. N., Chotpitayasunondh, T., Gao, Z., Hayden, F. G., Nguyen, D. H., de Jong, M. D., Naghdaliyev, A., Peiris, J. S., Shindo, N., Soeroso, S. & Uyeki, T. M. (2008). Update on avian influenza A (H5N1) virus infection in humans. *The New England journal of medicine* **358**, 261-273.
- AGI (2008). Saisonabschlussberichte der AG Influenza: Robert Koch Institut.
- Aldridge, J. R., Jr., Moseley, C. E., Boltz, D. A., Negovetich, N. J., Reynolds, C., Franks, J., Brown, S. A., Doherty, P. C., Webster, R. G. & Thomas, P. G. (2009). TNF/iNOS-producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 5306-5311.
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. & Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732-738.
- Allen, I. C., Scull, M. A., Moore, C. B., Holl, E. K., McElvania-TeKippe, E., Taxman, D. J., Guthrie, E. H., Pickles, R. J. & Ting, J. P. (2009). The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity* **30**, 556-565.
- Andrejeva, J., Childs, K. S., Young, D. F., Carlos, T. S., Stock, N., Goodbourn, S. & Randall, R. E. (2004). The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 17264-17269.
- Anton, A. (2010). Dissertation. In *Robert Koch-Institut, FG17*. Berlin.
- Arnold, R., Humbert, B., Werchau, H., Gallati, H. & König, W. (1994). Interleukin-8, interleukin-6, and soluble tumour necrosis factor receptor type I release from a human pulmonary epithelial cell line (A549) exposed to respiratory syncytial virus. *Immunology* **82**, 126-133.
- Barral, P. M., Sarkar, D., Fisher, P. B. & Racaniello, V. R. (2009). RIG-I is cleaved during picornavirus infection. *Virology* **391**, 171-176.
- Baskin, C. R., Bielefeldt-Ohmann, H., Tumpey, T. M., Sabourin, P. J., Long, J. P., Garcia-Sastre, A., Tolnay, A. E., Albrecht, R., Pyles, J. A., Olson, P. H., Aicher, L. D., Rosenzweig, E. R., Murali-Krishna, K., Clark, E. A., Kotur, M. S., Fornek, J. L., Proll, S., Palermo, R. E., Sabourin, C. L. & Katze, M. G. (2009). Early and sustained innate immune response defines pathology and death in nonhuman primates infected by highly pathogenic influenza virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 3455-3460.
- Basu, D., Walkiewicz, M. P., Frieman, M., Baric, R. S., Auble, D. T. & Engel, D. A. (2009). Novel influenza virus NS1 antagonists block replication and restore innate immune function. *J Virol* **83**, 1881-1891.
- Biron, C. A., Nguyen, K. B., Pien, G. C., Cousens, L. P. & Salazar-Mather, T. P. (1999). Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annual review of immunology* **17**, 189-220.
- Bradel-Tretheway, B. G., Kelley, Z., Chakraborty-Sett, S., Takimoto, T., Kim, B. & Dewhurst, S. (2008). The human H5N1 influenza A virus polymerase complex is active in vitro over a broad range of temperatures, in contrast to the WSN complex, and this property can be attributed to the PB2 subunit. *The Journal of general virology* **89**, 2923-2932.
- Buchy, P., Mardy, S., Vong, S., Toyoda, T., Aubin, J. T., Miller, M., Touch, S., Sovann, L., Dufourcq, J. B., Richner, B., Tu, P. V., Tien, N. T., Lim, W., Peiris, J. S. & Van der Werf, S. (2007). Influenza A/H5N1 virus infection in humans in Cambodia. *J Clin Virol* **39**, 164-168.
- Bullough, P. A., Hughson, F. M., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. (1994). Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature* **371**, 37-43.
- Buttmann, M., Berberich-Siebelt, F., Serfling, E. & Rieckmann, P. (2007). Interferon-beta is a potent inducer of interferon regulatory factor-1/2-dependent IP-10/CXCL10 expression in primary human endothelial cells. *J Vasc Res* **44**, 51-60.
- Cameron, M. J., Ran, L., Xu, L., Danesh, A., Bermejo-Martin, J. F., Cameron, C. M., Muller, M. P., Gold, W. L., Richardson, S. E., Poutanen, S. M., Willey, B. M., DeVries, M. E., Fang, Y., Seneviratne, C., Bosinger, S. E., Persad, D., Wilkinson, P., Greller, L. D., Somogyi, R., Humar, A., Keshavjee, S., Louie, M., Loeb, M. B., Brunton, J., McGeer, A. J. & Kelvin, D. J. (2007). Interferon-mediated immunopathological events are associated with atypical innate and adaptive immune responses in patients with severe acute respiratory syndrome. *Journal of virology* **81**, 8692-8706.

- Cashman, S. M., Morris, D. J. & Kumar-Singh, R. (2004). Adenovirus type 5 pseudotyped with adenovirus type 37 fiber uses sialic acid as a cellular receptor. *Virology* **324**, 129-139.
- CDC (2009). Update: drug susceptibility of swine-origin influenza A (H1N1) viruses, April 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **58**, 433-435.
- Chan, M. C., Cheung, C. Y., Chui, W. H., Tsao, S. W., Nicholls, J. M., Chan, Y. O., Chan, R. W., Long, H. T., Poon, L. L., Guan, Y. & Peiris, J. S. (2005). Proinflammatory cytokine responses induced by influenza A (H5N1) viruses in primary human alveolar and bronchial epithelial cells. *Respiratory research* **6**, 135.
- Chang, H. W., Watson, J. C. & Jacobs, B. L. (1992). The E3L gene of vaccinia virus encodes an inhibitor of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 4825-4829.
- Chen, B. J., Leser, G. P., Morita, E. & Lamb, R. A. (2007a). Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase, but not the matrix protein, are required for assembly and budding of plasmid-derived virus-like particles. *Journal of virology* **81**, 7111-7123.
- Chen, H., Bright, R. A., Subbarao, K., Smith, C., Cox, N. J., Katz, J. M. & Matsuoka, Y. (2007b). Polygenic virulence factors involved in pathogenesis of 1997 Hong Kong H5N1 influenza viruses in mice. *Virus research* **128**, 159-163.
- 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. & Yewdell, J. W. (2001). A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nature medicine* **7**, 1306-1312.
- Cheung, C. Y., Poon, L. L., Lau, A. S., Luk, W., Lau, Y. L., Shortridge, K. F., Gordon, S., Guan, Y. & Peiris, J. S. (2002). Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease? *Lancet* **360**, 1831-1837.
- Chu, W. M., Ostertag, D., Li, Z. W., Chang, L., Chen, Y., Hu, Y., Williams, B., Perrault, J. & Karin, M. (1999). JNK2 and IKKbeta are required for activating the innate response to viral infection. *Immunity* **11**, 721-731.
- Cilloniz, C., Shinya, K., Peng, X., Korth, M. J., Proll, S. C., Aicher, L. D., Carter, V. S., Chang, J. H., Kobasa, D., Feldmann, F., Strong, J. E., Feldmann, H., Kawaoka, Y. & Katze, M. G. (2009). Lethal influenza virus infection in macaques is associated with early dysregulation of inflammatory related genes. *PLoS pathogens* **5**, e1000604.
- Cinatl, J., Morgenstern, B., Bauer, G., Chandra, P., Rabenau, H. & Doerr, H. W. (2003). Treatment of SARS with human interferons. *Lancet* **362**, 293-294.
- Clemens, M. J. & Williams, B. R. (1978). Inhibition of cell-free protein synthesis by pppA2'p5'A2'p5'A: a novel oligonucleotide synthesized by interferon-treated L cell extracts. *Cell* **13**, 565-572.
- Compans, R. W., Content, J. & Duesberg, P. H. (1972). Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus. *Journal of virology* **10**, 795-800.
- Conenello, G. M., Zamarin, D., Perrone, L. A., Tumpey, T. & Palese, P. (2007). A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence. *PLoS pathogens* **3**, 1414-1421.
- Connor, R. J., Kawaoka, Y., Webster, R. G. & Paulson, J. C. (1994). Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology* **205**, 17-23.
- Couceiro, J. N., Paulson, J. C. & Baum, L. G. (1993). Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. *Virus research* **29**, 155-165.
- Dahl, H., Linde, A. & Strannegard, O. (2004). In vitro inhibition of SARS virus replication by human interferons. *Scand J Infect Dis* **36**, 829-831.
- Dalton, R. M., Mullin, A. E., Amorim, M. J., Medcalf, E., Tiley, L. S. & Digard, P. (2006). Temperature sensitive influenza A virus genome replication results from low thermal stability of polymerase-cRNA complexes. *Virology* **3**, 58.
- Davis, A. R., Hiti, A. L. & Nayak, D. P. (1980). Influenza defective interfering viral RNA is formed by internal deletion of genomic RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**, 215-219.
- Dawood, F. S., Jain, S., Finelli, L., Shaw, M. W., Lindstrom, S., Garten, R. J., Gubareva, L. V., Xu, X., Bridges, C. B. & Uyeki, T. M. (2009). Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *The New England journal of medicine* **360**, 2605-2615.
- de Jong, M. D. (2008). H5N1 transmission and disease: observations from the frontlines. *Pediatr Infect Dis J* **27**, S54-S56.
- 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.

- & Farrar, J. (2006).** Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nature medicine* **12**, 1203-1207.
- de Lang, A., Baas, T., Teal, T., Leijten, L. M., Rain, B., Osterhaus, A. D., Haagmans, B. L. & Katze, M. G. (2007).** Functional genomics highlights differential induction of antiviral pathways in the lungs of SARS-CoV-infected macaques. *PLoS pathogens* **3**, e112.
- de Veer, M. J., Holko, M., Frevel, M., Walker, E., Der, S., Paranjape, J. M., Silverman, R. H. & Williams, B. R. (2001).** Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J Leukoc Biol* **69**, 912-920.
- Deng, R., Lu, M., Korteweg, C., Gao, Z., McNutt, M. A., Ye, J., Zhang, T. & Gu, J. (2008).** Distinctly different expression of cytokines and chemokines in the lungs of two H5N1 avian influenza patients. *The Journal of pathology* **216**, 328-336.
- Deonarain, R., Alcami, A., Alexiou, M., Dallman, M. J., Gewert, D. R. & Porter, A. C. (2000).** Impaired antiviral response and alpha/beta interferon induction in mice lacking beta interferon. *Journal of virology* **74**, 3404-3409.
- Der, S. D., Zhou, A., Williams, B. R. & Silverman, R. H. (1998).** Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 15623-15628.
- Diaz-Guerra, M., Rivas, C. & Esteban, M. (1999).** Full activation of RNaseL in animal cells requires binding of 2-5A within ankyrin repeats 6 to 9 of this interferon-inducible enzyme. *J Interferon Cytokine Res* **19**, 113-119.
- Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. & Reis e Sousa, C. (2004).** Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science (New York, NY)* **303**, 1529-1531.
- Droebner, K., Reiling, S. J. & Planz, O. (2008).** Role of hypercytokinemia in NF-kappaB p50-deficient mice after H5N1 influenza A virus infection. *Journal of virology* **82**, 11461-11466.
- Dupuis, S., Jouanguy, E., Al-Hajjar, S., Fieschi, C., Al-Mohsen, I. Z., Al-Jumaah, S., Yang, K., Chapgier, A., Eidenschenk, C., Eid, P., Al Ghoniaim, A., Tufenkeji, H., Frayha, H., Al-Gazlan, S., Al-Rayes, H., Schreiber, R. D., Gresser, I. & Casanova, J. L. (2003).** Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nature genetics* **33**, 388-391.
- Ehrhardt, C., Wolff, T., Pleschka, S., Planz, O., Beermann, W., Bode, J. G., Schmolke, M. & Ludwig, S. (2007).** Influenza A virus NS1 protein activates the PI3K/Akt pathway to mediate antiapoptotic signaling responses. *Journal of virology* **81**, 3058-3067.
- Enami, M., Sharma, G., Benham, C. & Palese, P. (1991).** An influenza virus containing nine different RNA segments. *Virology* **185**, 291-298.
- Fisman, D. N. (2000).** Hemophagocytic syndromes and infection. *Emerg Infect Dis* **6**, 601-608.
- Fodor, E., Mingay, L. J., Crow, M., Deng, T. & Brownlee, G. G. (2003).** A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase promotes the generation of defective interfering RNAs. *Journal of virology* **77**, 5017-5020.
- Fortes, P., Beloso, A. & Ortin, J. (1994).** Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks mRNA nucleocytoplasmic transport. *The EMBO journal* **13**, 704-712.
- Gabriel, G., Abram, M., Keiner, B., Wagner, R., Klenk, H. D. & Stech, J. (2007).** Differential polymerase activity in avian and mammalian cells determines host range of influenza virus. *Journal of virology* **81**, 9601-9604.
- Gabriel, G., Dauber, B., Wolff, T., Planz, O., Klenk, H. D. & Stech, J. (2005).** The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 18590-18595.
- Gack, M. U., Albrecht, R. A., Urano, T., Inn, K. S., Huang, I. C., Carnero, E., Farzan, M., Inoue, S., Jung, J. U. & Garcia-Sastre, A. (2009).** Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I. *Cell host & microbe* **5**, 439-449.
- Galabru, J. & Hovanessian, A. (1987).** Autophosphorylation of the protein kinase dependent on double-stranded RNA. *The Journal of biological chemistry* **262**, 15538-15544.
- Gallucci, S., Lolkema, M. & Matzinger, P. (1999).** Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nature medicine* **5**, 1249-1255.
- Garcia-Sastre, A., Egorov, A., Matassov, D., Brandt, S., Levy, D. E., Durbin, J. E., Palese, P. & Muster, T. (1998).** Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology* **252**, 324-330.
- Garofalo, R., Mei, F., Espejo, R., Ye, G., Haeberle, H., Baron, S., Ogra, P. L. & Reyes, V. E. (1996).** Respiratory syncytial virus infection of human respiratory epithelial cells up-regulates class I MHC expression through the induction of IFN-beta and IL-1 alpha. *J Immunol* **157**, 2506-2513.

- Gomez-Puertas, P., Albo, C., Perez-Pastrana, E., Vivo, A. & Portela, A. (2000). Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. *Journal of virology* **74**, 11538-11547.
- Goodbourn, S. & Randall, R. E. (2009). The regulation of type I interferon production by paramyxoviruses. *J Interferon Cytokine Res* **29**, 539-547.
- Goodman, A. G., Zeng, H., Proll, S. C., Peng, X., Cilloniz, C., Carter, V. S., Korth, M. J., Tumpey, T. M. & Katze, M. G. (2010). The alpha/beta interferon receptor provides protection against influenza virus replication but is dispensable for inflammatory response signaling. *Journal of virology* **84**, 2027-2037.
- Govorkova, E. A., Rehg, J. E., Krauss, S., Yen, H. L., Guan, Y., Peiris, M., Nguyen, T. D., Hanh, T. H., Puthavathana, P., Long, H. T., Buranathai, C., Lim, W., Webster, R. G. & Hoffmann, E. (2005). Lethality to ferrets of H5N1 influenza viruses isolated from humans and poultry in 2004. *Journal of virology* **79**, 2191-2198.
- Gu, J., Xie, Z., Gao, Z., Liu, J., Korteweg, C., Ye, J., Lau, L. T., Lu, J., Zhang, B., McNutt, M. A., Lu, M., Anderson, V. M., Gong, E., Yu, A. C. & Lipkin, W. I. (2007). H5N1 infection of the respiratory tract and beyond: a molecular pathology study. *Lancet* **370**, 1137-1145.
- Guo, Z., Chen, L. M., Zeng, H., Gomez, J. A., Plowden, J., Fujita, T., Katz, J. M., Donis, R. O. & Sambhara, S. (2007). NS1 protein of influenza A virus inhibits the function of intracytoplasmic pathogen sensor, RIG-I. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **36**, 263-269.
- Haller, O., Staeheli, P. & Kochs, G. (2007). Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *Biochimie* **89**, 812-818.
- Hatada, E., Saito, S. & Fukuda, R. (1999). Mutant influenza viruses with a defective NS1 protein cannot block the activation of PKR in infected cells. *Journal of virology* **73**, 2425-2433.
- Hay (1992). The action of adamantanamides against influenza A viruses: inhibition of the M2 ion channel protein. *Semin Virol* **3**, 21-30.
- Hayman, A., Comely, S., Lackenby, A., Hartgroves, L. C., Goodbourn, S., McCauley, J. W. & Barclay, W. S. (2007). NS1 proteins of avian influenza A viruses can act as antagonists of the human alpha/beta interferon response. *Journal of virology* **81**, 2318-2327.
- Hayman, A., Comely, S., Lackenby, A., Murphy, S., McCauley, J., Goodbourn, S. & Barclay, W. (2006). Variation in the ability of human influenza A viruses to induce and inhibit the IFN-beta pathway. *Virology* **347**, 52-64.
- He, B., Gross, M. & Roizman, B. (1997). The gamma(1)34.5 protein of herpes simplex virus 1 complexes with protein phosphatase 1alpha to dephosphorylate the alpha subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 and preclude the shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 843-848.
- He, X., Zhou, J., Bartlam, M., Zhang, R., Ma, J., Lou, Z., Li, X., Li, J., Joachimiak, A., Zeng, Z., Ge, R., Rao, Z. & Liu, Y. (2008). Crystal structure of the polymerase PA(C)-PB1(N) complex from an avian influenza H5N1 virus. *Nature* **454**, 1123-1126.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. & Akira, S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740-745.
- Henter, J. I., Chow, C. B., Leung, C. W. & Lau, Y. L. (2006). Cytotoxic therapy for severe avian influenza A (H5N1) infection. *Lancet* **367**, 870-873.
- Hippenstiel, S., Opitz, B., Schmeck, B. & Suttrop, N. (2006). Lung epithelium as a sentinel and effector system in pneumonia--molecular mechanisms of pathogen recognition and signal transduction. *Respiratory research* **7**, 97.
- Hoffmann, E., Neumann, G., Kawaoka, Y., Hobom, G. & Webster, R. G. (2000). A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 6108-6113.
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K. K., Schlee, M., Endres, S. & Hartmann, G. (2006). 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* **314**, 994-997.
- Hsu, M. T., Parvin, J. D., Gupta, S., Krystal, M. & Palese, P. (1987). Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal panhandle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 8140-8144.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>.
- Huang, H. C., Chu, C. J., Lee, F. Y., Chang, F. Y., Wang, S. S., Lin, H. C., Hou, M. C., Chan, C. C., Wu, S. L., Chen, C. T. & Lee, S. D. (2000). Chronic inhibition of nitric oxide ameliorates splanchnic hyposensitivity to glypressin in a hemorrhage-transfused rat model of portal hypertension. *Scand J Gastroenterol* **35**, 1308-1313.

- Isaacs, A. & Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Containing papers of a Biological character* **147**, 258-267.
- Jackson, D., Hossain, M. J., Hickman, D., Perez, D. R. & Lamb, R. A. (2008). A new influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 4381-4386.
- Jacobs, B. L. & Langland, J. O. (1996). When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology* **219**, 339-349.
- Janeway, C. A., Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **54 Pt 1**, 1-13.
- Jiao, P., Tian, G., Li, Y., Deng, G., Jiang, Y., Liu, C., Liu, W., Bu, Z., Kawaoka, Y. & Chen, H. (2008). A single-amino-acid substitution in the NS1 protein changes the pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in mice. *Journal of virology* **82**, 1146-1154.
- Kates, M., Allison, A. C., Tyrell, D. A. & James, A. T. (1962). Origin of lipids in influenza virus. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **27**, 293-301.
- Kawai, T. & Akira, S. (2008). Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1143**, 1-20.
- Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K. J., Takeuchi, O. & Akira, S. (2005). IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* **6**, 981-988.
- Kawaoka, Y., Krauss, S. & Webster, R. G. (1989). Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *Journal of virology* **63**, 4603-4608.
- Kerr, I. M. & Brown, R. E. (1978). pppA2'p5'A2'p5'A: an inhibitor of protein synthesis synthesized with an enzyme fraction from interferon-treated cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**, 256-260.
- Kido, H., Murakami, M., Oba, K., Chen, Y. & Towatari, T. (1999). Cellular proteinases trigger the infectivity of the influenza A and Sendai viruses. *Molecules and cells* **9**, 235-244.
- Kiladjian, J. J., Chomienne, C. & Fenaux, P. (2008). Interferon-alpha therapy in bcr-abl-negative myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* **22**, 1990-1998.
- Klenk, H. D. & Garten, W. (1994). Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends in microbiology* **2**, 39-43.
- Kochs, G., Garcia-Sastre, A. & Martinez-Sobrido, L. (2007). Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein. *Journal of virology* **81**, 7011-7021.
- Kochs, G., Martinez-Sobrido, L., Lienenklaus, S., Weiss, S., Garcia-Sastre, A. & Staeheli, P. (2009). Strong interferon-inducing capacity of a highly virulent variant of influenza A virus strain PR8 with deletions in the NS1 gene. *The Journal of general virology* **90**, 2990-2994.
- Kostura, M. & Mathews, M. B. (1989). Purification and activation of the double-stranded RNA-dependent eIF-2 kinase DAI. *Molecular and cellular biology* **9**, 1576-1586.
- Krug, R. M., Broni, B. A. & Bouloy, M. (1979). Are the 5' ends of influenza viral mRNAs synthesized in vivo donated by host mRNAs? *Cell* **18**, 329-334.
- Kugel, D., Kochs, G., Obojes, K., Roth, J., Kobinger, G. P., Kobasa, D., Haller, O., Staeheli, P. & von Messling, V. (2009). Intranasal administration of alpha interferon reduces seasonal influenza A virus morbidity in ferrets. *Journal of virology* **83**, 3843-3851.
- Kumar, M. & Carmichael, G. G. (1998). Antisense RNA: function and fate of duplex RNA in cells of higher eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 1415-1434.
- Lamb, R. A. & Choppin, P. W. (1981). Identification of a second protein (M2) encoded by RNA segment 7 of influenza virus. *Virology* **112**, 729-737.
- Lamb, R. A., Etkind, P. R. & Choppin, P. W. (1978). Evidence for a ninth influenza viral polypeptide. *Virology* **91**, 60-78.
- Lamb, R. A., Krug, R.M. (2001). *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott, Williams & Williams.
- Lamb, R. A., Lai, C. J. & Choppin, P. W. (1981). Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: colinear and interrupted mRNAs code for overlapping proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**, 4170-4174.
- Lämml, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 680-685.
- Le Bon, A., Schiavoni, G., D'Agostino, G., Gresser, I., Belardelli, F. & Tough, D. F. (2001). Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* **14**, 461-470.

- Le, Q. M., Sakai-Tagawa, Y., Ozawa, M., Ito, M. & Kawaoka, Y. (2009). Selection of H5N1 influenza virus PB2 during replication in humans. *Journal of virology* **83**, 5278-5281.
- Lenschow, D. J., Lai, C., Frias-Staheli, N., Giannakopoulos, N. V., Lutz, A., Wolff, T., Osiak, A., Levine, B., Schmidt, R. E., Garcia-Sastre, A., Leib, D. A., Pekosz, A., Knobloch, K. P., Horak, I. & Virgin, H. W. t. (2007). IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 1371-1376.
- Leung, A. K., Kellner, J. D. & Davies, H. D. (2005). Respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Natl Med Assoc* **97**, 1708-1713.
- Li, O. T., Chan, M. C., Leung, C. S., Chan, R. W., Guan, Y., Nicholls, J. M. & Poon, L. L. (2009). Full factorial analysis of mammalian and avian influenza polymerase subunits suggests a role of an efficient polymerase for virus adaptation. *PLoS one* **4**, e5658.
- Li, Z., Chen, H., Jiao, P., Deng, G., Tian, G., Li, Y., Hoffmann, E., Webster, R. G., Matsuoka, Y. & Yu, K. (2005). Molecular basis of replication of duck H5N1 influenza viruses in a mammalian mouse model. *Journal of virology* **79**, 12058-12064.
- Lindenmann, J. (1964). Inheritance of Resistance to Influenza Virus in Mice. *Proc Soc Exp Biol Med* **116**, 506-509.
- Lipatov, A. S., Andreadsky, S., Webby, R. J., Hulse, D. J., Rehg, J. E., Krauss, S., Perez, D. R., Doherty, P. C., Webster, R. G. & Sangster, M. Y. (2005). Pathogenesis of Hong Kong H5N1 influenza virus NS gene reassortants in mice: the role of cytokines and B- and T-cell responses. *The Journal of general virology* **86**, 1121-1130.
- Lu, Y., Qian, X. Y. & Krug, R. M. (1994). The influenza virus NS1 protein: a novel inhibitor of pre-mRNA splicing. *Genes Dev* **8**, 1817-1828.
- Lu, Y., Wambach, M., Katze, M. G. & Krug, R. M. (1995). Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor. *Virology* **214**, 222-228.
- Ludwig, S., Wang, X., Ehrhardt, C., Zheng, H., Donelan, N., Planz, O., Pleschka, S., Garcia-Sastre, A., Heins, G. & Wolff, T. (2002). The influenza A virus NS1 protein inhibits activation of Jun N-terminal kinase and AP-1 transcription factors. *Journal of virology* **76**, 11166-11171.
- Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R. & Iwasaki, A. (2003). Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* **198**, 513-520.
- Lund, J. M., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N. C., Gale, N. W., Iwasaki, A. & Flavell, R. A. (2004). Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 5598-5603.
- Luo, G. X., Luytjes, W., Enami, M. & Palese, P. (1991). The polyadenylation signal of influenza virus RNA involves a stretch of uridines followed by the RNA duplex of the panhandle structure. *Journal of virology* **65**, 2861-2867.
- Lycett, S. J., Ward, M. J., Lewis, F. I., Poon, A. F., Kosakovsky Pond, S. L. & Leigh Brown, A. J. (2009). Detection of mammalian virulence determinants in highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses: multivariate analysis of published data. *Journal of virology*.
- Maines, T. R., Lu, X. H., Erb, S. M., Edwards, L., Guarner, J., Greer, P. W., Nguyen, D. C., Szretter, K. J., Chen, L. M., Thawatsupha, P., Chittaganpitch, M., Waicharoen, S., Nguyen, D. T., Nguyen, T., Nguyen, H. H., Kim, J. H., Hoang, L. T., Kang, C., Phuong, L. S., Lim, W., Zaki, S., Donis, R. O., Cox, N. J., Katz, J. M. & Tumpey, T. M. (2005). Avian influenza (H5N1) viruses isolated from humans in Asia in 2004 exhibit increased virulence in mammals. *Journal of virology* **79**, 11788-11800.
- Maines, T. R., Szretter, K. J., Perrone, L., Belser, J. A., Bright, R. A., Zeng, H., Tumpey, T. M. & Katz, J. M. (2008). Pathogenesis of emerging avian influenza viruses in mammals and the host innate immune response. *Immunol Rev* **225**, 68-84.
- Marsh, G. A., Rabadan, R., Levine, A. J. & Palese, P. (2008). Highly conserved regions of influenza A virus polymerase gene segments are critical for efficient viral RNA packaging. *Journal of virology* **82**, 2295-2304.
- Martin, K. & Helenius, A. (1991a). Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell* **67**, 117-130.
- Martin, K. & Helenius, A. (1991b). Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus. *Journal of virology* **65**, 232-244.
- Massin, P., van der Werf, S. & Naffakh, N. (2001). Residue 627 of PB2 is a determinant of cold sensitivity in RNA replication of avian influenza viruses. *Journal of virology* **75**, 5398-5404.

- Matlin, K. S., Reggio, H., Helenius, A. & Simons, K. (1981).** Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line. *The Journal of cell biology* **91**, 601-613.
- Matrosovich, M., Zhou, N., Kawaoka, Y. & Webster, R. (1999).** The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *Journal of virology* **73**, 1146-1155.
- McAllister, C. S. & Samuel, C. E. (2009).** The RNA-activated protein kinase enhances the induction of interferon-beta and apoptosis mediated by cytoplasmic RNA sensors. *J Biol Chem* **284**, 1644-1651.
- McAuley, J. L., Zhang, K. & McCullers, J. A. (2010).** The effects of influenza A virus PB1-F2 protein on polymerase activity are strain specific and do not impact pathogenesis. *Journal of virology* **84**, 558-564.
- Mehle, A. & Doudna, J. A. (2008).** An inhibitory activity in human cells restricts the function of an avian-like influenza virus polymerase. *Cell host & microbe* **4**, 111-122.
- Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R. & Tschopp, J. (2005).** Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* **437**, 1167-1172.
- Mibayashi, M., Martinez-Sobrido, L., Loo, Y. M., Cardenas, W. B., Gale, M., Jr. & Garcia-Sastre, A. (2007).** Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. *Journal of virology* **81**, 514-524.
- Midoux, P., Pichon, C., Yaouanc, J. J. & Jaffres, P. A. (2009).** Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers. *Br J Pharmacol* **157**, 166-178.
- Min, J. Y. & Krug, R. M. (2006).** The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 7100-7105.
- Min, J. Y., Li, S., Sen, G. C. & 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.
- Mok, K. P., Wong, C. H., Cheung, C. Y., Chan, M. C., Lee, S. M., Nicholls, J. M., Guan, Y. & Peiris, J. S. (2009).** Viral genetic determinants of H5N1 influenza viruses that contribute to cytokine dysregulation. *The Journal of infectious diseases* **200**, 1104-1112.
- Moore, C. B., Bergstralh, D. T., Duncan, J. A., Lei, Y., Morrison, T. E., Zimmermann, A. G., Accavitti-Loper, M. A., Madden, V. J., Sun, L., Ye, Z., Lich, J. D., Heise, M. T., Chen, Z. & Ting, J. P. (2008).** NLRX1 is a regulator of mitochondrial antiviral immunity. *Nature* **451**, 573-577.
- Mordstein, M., Kochs, G., Dumoutier, L., Renaud, J. C., Paludan, S. R., Klucher, K. & Staeheli, P. (2008).** Interferon-lambda contributes to innate immunity of mice against influenza A virus but not against hepatotropic viruses. *PLoS pathogens* **4**, e1000151.
- Murti, K. G., Brown, P. S., Bean, W. J., Jr. & Webster, R. G. (1992).** Composition of the helical internal components of influenza virus as revealed by immunogold labeling/electron microscopy. *Virology* **186**, 294-299.
- Nallagatla, S. R., Hwang, J., Toroney, R., Zheng, X., Cameron, C. E. & Bevilacqua, P. C. (2007).** 5'-triphosphate-dependent activation of PKR by RNAs with short stem-loops. *Science (New York, NY)* **318**, 1455-1458.
- Nemeroff, M. E., Barabino, S. M., Li, Y., Keller, W. & Krug, R. M. (1998).** Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3'end formation of cellular pre-mRNAs. *Molecular cell* **1**, 991-1000.
- Neumann, G., Noda, T. & Kawaoka, Y. (2009).** Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* **459**, 931-939.
- Ng, W. F., To, K. F., Lam, W. W., Ng, T. K. & Lee, K. C. (2006).** The comparative pathology of severe acute respiratory syndrome and avian influenza A subtype H5N1--a review. *Hum Pathol* **37**, 381-390.
- Noda, T., Sagara, H., Yen, A., Takada, A., Kida, H., Cheng, R. H. & Kawaoka, Y. (2006).** Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature* **439**, 490-492.
- Novak, M. A. (1992).** What is a quasispecies? *Trends Ecol Evol* **7**, 118-121.
- O'Neill, R. E., Jaskunas, R., Blobel, G., Palese, P. & Moroianu, J. (1995).** Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import. *The Journal of biological chemistry* **270**, 22701-22704.
- O'Neill, R. E., Talon, J. & Palese, P. (1998).** The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *The EMBO journal* **17**, 288-296.
- Obenauer, J. C., Denson, J., Mehta, P. K., Su, X., Mukatira, S., Finkelstein, D. B., Xu, X., Wang, J., Ma, J., Fan, Y., Rakestraw, K. M., Webster, R. G., Hoffmann, E., Krauss, S., Zheng, J., Zhang, Z. & Naeve, C. W. (2006).** Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates. *Science* **311**, 1576-1580.

- Ocana-Macchi, M., Bel, M., Guzylack-Piriou, L., Ruggli, N., Liniger, M., McCullough, K. C., Sakoda, Y., Isoda, N., Matrosovich, M. & Summerfield, A. (2009). Hemagglutinin-dependent tropism of H5N1 avian influenza virus for human endothelial cells. *Journal of virology* **83**, 12947-12955.
- Odagiri, T. & 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. *Journal of virology* **71**, 2138-2145.
- Olszewska-Pazdrak, B., Casola, A., Saito, T., Alam, R., Crowe, S. E., Mei, F., Ogra, P. L. & Garofalo, R. P. (1998). Cell-specific expression of RANTES, MCP-1, and MIP-1alpha by lower airway epithelial cells and eosinophils infected with respiratory syncytial virus. *Journal of virology* **72**, 4756-4764.
- Opitz, B., Rejaibi, A., Dauber, B., Eckhard, J., Vinzing, M., Schmeck, B., Hippenstiel, S., Suttorp, N. & Wolff, T. (2007). IFNbeta induction by influenza A virus is mediated by RIG-I which is regulated by the viral NS1 protein. *Cellular microbiology* **9**, 930-938.
- Pahl, H. L. & Baeuerle, P. A. (1995). Expression of influenza virus hemagglutinin activates transcription factor NF-kappa B. *Journal of virology* **69**, 1480-1484.
- Palese, P., Tobita, K., Ueda, M. & Compans, R. W. (1974). Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology* **61**, 397-410.
- Pauli, E. K., Schmolke, M., Wolff, T., Viemann, D., Roth, J., Bode, J. G. & Ludwig, S. (2008). Influenza A virus inhibits type I IFN signaling via NF-kappaB-dependent induction of SOCS-3 expression. *PLoS pathogens* **4**, e1000196.
- Peiris, J. S., Yu, W. C., Leung, C. W., Cheung, C. Y., Ng, W. F., Nicholls, J. M., Ng, T. K., Chan, K. H., Lai, S. T., Lim, W. L., Yuen, K. Y. & Guan, Y. (2004). Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. *Lancet* **363**, 617-619.
- Pestka, S., Krause, C. D. & Walter, M. R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological reviews* **202**, 8-32.
- Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C. P., Naslund, T. I., Liljestrom, P., Weber, F. & Reis e Sousa, C. (2006). RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science (New York, NY)* **314**, 997-1001.
- Pinto, L. H., Holsinger, L. J. & Lamb, R. A. (1992). Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* **69**, 517-528.
- Plotch, S. J., Bouloy, M., Ulmanen, I. & 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.
- Pritlove, D. C., Poon, L. L., Fodor, E., Sharps, J. & Brownlee, G. G. (1998). Polyadenylation of influenza virus mRNA transcribed in vitro from model virion RNA templates: requirement for 5' conserved sequences. *Journal of virology* **72**, 1280-1286.
- Qiu, Y. & Krug, R. M. (1994). The influenza virus NS1 protein is a poly(A)-binding protein that inhibits nuclear export of mRNAs containing poly(A). *Journal of virology* **68**, 2425-2432.
- Regan, J. F., Liang, Y. & Parslow, T. G. (2006). Defective assembly of influenza A virus due to a mutation in the polymerase subunit PA. *Journal of virology* **80**, 252-261.
- Rehwinkel, J., Tan, C. P., Goubau, D., Schulz, O., Pichlmair, A., Bier, K., Robb, N., Vreede, F., Barclay, W., Fodor, E. & Reis e Sousa, C. (2010). RIG-I detects viral genomic RNA during negative-strand RNA virus infection. *Cell* **140**, 397-408.
- Richardson, J. C. & Akkina, R. K. (1991). NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells. *Archives of virology* **116**, 69-80.
- Robb, N. C., Smith, M., Vreede, F. T. & Fodor, E. (2009). NS2/NEP protein regulates transcription and replication of the influenza virus RNA genome. *The Journal of general virology* **90**, 1398-1407.
- Rogers, G. N. & Paulson, J. C. (1983). Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology* **127**, 361-373.
- Ronco, L. V., Karpova, A. Y., Vidal, M. & Howley, P. M. (1998). Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev* **12**, 2061-2072.
- Sabbah, A., Chang, T. H., Harnack, R., Frohlich, V., Tominaga, K., Dube, P. H., Xiang, Y. & Bose, S. (2009). Activation of innate immune antiviral responses by Nod2. *Nat Immunol* **10**, 1073-1080.
- Salomon, R., Franks, J., Govorkova, E. A., Ilyushina, N. A., Yen, H. L., Hulse-Post, D. J., Humbert, J., Trichet, M., Rehg, J. E., Webby, R. J., Webster, R. G. & Hoffmann, E. (2006). The polymerase complex genes contribute to the high virulence of the human H5N1 influenza virus isolate A/Vietnam/1203/04. *The Journal of experimental medicine* **203**, 689-697.

- Salomon, R., Hoffmann, E. & Webster, R. G. (2007). Inhibition of the cytokine response does not protect against lethal H5N1 influenza infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 12479-12481.
- Samuel, C. E. (1979). Mechanism of interferon action: phosphorylation of protein synthesis initiation factor eIF-2 in interferon-treated human cells by a ribosome-associated kinase processing site specificity similar to hemin-regulated rabbit reticulocyte kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 600-604.
- Samuel, C. E. (2001). Antiviral actions of interferons. *Clinical microbiology reviews* **14**, 778-809, table of contents.
- Sanda, C., Weitzel, P., Tsukahara, T., Schaley, J., Edenberg, H. J., Stephens, M. A., McClintick, J. N., Blatt, L. M., Li, L., Brodsky, L. & Taylor, M. W. (2006). Differential gene induction by type I and type II interferons and their combination. *J Interferon Cytokine Res* **26**, 462-472.
- Sandbulte, M. R., Boon, A. C., Webby, R. J. & Riberdy, J. M. (2008). Analysis of cytokine secretion from human plasmacytoid dendritic cells infected with H5N1 or low-pathogenicity influenza viruses. *Virology* **381**, 22-28.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 5463-5467.
- Satterly, N., Tsai, P. L., van Deursen, J., Nussenzweig, D. R., Wang, Y., Faria, P. A., Levay, A., Levy, D. E. & Fontoura, B. M. (2007). Influenza virus targets the mRNA export machinery and the nuclear pore complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 1853-1858.
- Schlee, M., Roth, A., Hornung, V., Hagmann, C. A., Wimmenauer, V., Barchet, W., Coch, C., Janke, M., Mihailovic, A., Wardle, G., Juranek, S., Kato, H., Kawai, T., Poeck, H., Fitzgerald, K. A., Takeuchi, O., Akira, S., Tuschl, T., Latz, E., Ludwig, J. & Hartmann, G. (2009). Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity* **31**, 25-34.
- Scholtissek, C., Rohde, W., Von Hoyningen, V. & Rott, R. (1978). On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. *Virology* **87**, 13-20.
- Seo, S. H., Hoffmann, E. & Webster, R. G. (2002). Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. *Nature medicine* **8**, 950-954.
- Seth, R. B., Sun, L., Ea, C. K. & Chen, Z. J. (2005). Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* **122**, 669-682.
- Shapiro, G. I. & 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. *Journal of virology* **62**, 2285-2290.
- Sherry, B. (2009). Rotavirus and reovirus modulation of the interferon response. *J Interferon Cytokine Res* **29**, 559-567.
- Shinya, K., Ebina, M., Yamada, S., Ono, M., Kasai, N. & Kawaoka, Y. (2006). Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature* **440**, 435-436.
- Silversides, D. W., Music, N., Jacques, M., Gagnon, C. A. & Webby, R. (2010). Investigation of the species origin of the St. Jude Porcine Lung epithelial cell line (SJPL) made available to researchers. *J Virol* **84**, 5454-5455.
- Skehel, J. J. & Wiley, D. C. (2000). Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annual review of biochemistry* **69**, 531-569.
- Smith, G. L., Levin, J. Z., Palese, P. & Moss, B. (1987). Synthesis and cellular location of the ten influenza polypeptides individually expressed by recombinant vaccinia viruses. *Virology* **160**, 336-345.
- Song, M. S., Pascua, P. N., Lee, J. H., Baek, Y. H., Lee, O. J., Kim, C. J., Kim, H., Webby, R. J., Webster, R. G. & Choi, Y. K. (2009). The polymerase acidic protein gene of influenza A virus contributes to pathogenicity in a mouse model. *Journal of virology* **83**, 12325-12335.
- Staeheli, P. & Haller, O. (1985). Interferon-induced human protein with homology to protein Mx of influenza virus-resistant mice. *Molecular and cellular biology* **5**, 2150-2153.
- Stark, G. R., Kerr, I. M., Williams, B. R., Silverman, R. H. & Schreiber, R. D. (1998). How cells respond to interferons. *Annual review of biochemistry* **67**, 227-264.
- Stech, O., Veits, J., Weber, S., Deckers, D., Schroer, D., Vahlenkamp, T. W., Breithaupt, A., Teifke, J., Mettenleiter, T. C. & Stech, J. (2009). Acquisition of a polybasic hemagglutinin cleavage site by a low-pathogenic avian influenza virus is not sufficient for immediate transformation into a highly pathogenic strain. *Journal of virology* **83**, 5864-5868.

- Stieneke-Grober, A., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E., Thomas, G., Roberts, C., Klenk, H. D. & Garten, W. (1992). Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *The EMBO journal* **11**, 2407-2414.
- Su, Z. Z., Sarkar, D., Emdad, L., Barral, P. M. & Fisher, P. B. (2007). Central role of interferon regulatory factor-1 (IRF-1) in controlling retinoic acid inducible gene-I (RIG-I) expression. *J Cell Physiol* **213**, 502-510.
- Subbarao, E. K., London, W. & Murphy, B. R. (1993). A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *Journal of virology* **67**, 1761-1764.
- Subbarao, K. & Shaw, M. W. (2000). Molecular aspects of avian influenza (H5N1) viruses isolated from humans. *Rev Med Virol* **10**, 337-348.
- Sugrue, R. J. & Hay, A. J. (1991). Structural characteristics of the M2 protein of influenza A viruses: evidence that it forms a tetrameric channel. *Virology* **180**, 617-624.
- Szretter, K. J., Gangappa, S., Belser, J. A., Zeng, H., Chen, H., Matsuoka, Y., Sambhara, S., Swayne, D. E., Tumpey, T. M. & Katz, J. M. (2009). Early control of H5N1 influenza virus replication by the type I interferon response in mice. *Journal of virology* **83**, 5825-5834.
- Takaoka, A. & Yanai, H. (2006). Interferon signalling network in innate defence. *Cell Microbiol* **8**, 907-922.
- Talon, J., Horvath, C. M., Polley, R., Basler, C. F., Muster, T., Palese, P. & Garcia-Sastre, A. (2000). Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein. *Journal of virology* **74**, 7989-7996.
- Tan, S. L. & Katze, M. G. (1998). Biochemical and genetic evidence for complex formation between the influenza A virus NS1 protein and the interferon-induced PKR protein kinase. *J Interferon Cytokine Res* **18**, 757-766.
- Taniguchi, T. & Takaoka, A. (2002). The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. *Current opinion in immunology* **14**, 111-116.
- Taubenberger, J. K., Reid, A. H., Krafft, A. E., Bijwaard, K. E. & Fanning, T. G. (1997). Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus. *Science (New York, NY)* **275**, 1793-1796.
- Tiley, L. S., Hagen, M., Matthews, J. T. & Krystal, M. (1994). Sequence-specific binding of the influenza virus RNA polymerase to sequences located at the 5' ends of the viral RNAs. *Journal of virology* **68**, 5108-5116.
- To, K. F., Chan, P. K., Chan, K. F., Lee, W. K., Lam, W. Y., Wong, K. F., Tang, N. L., Tsang, D. N., Sung, R. Y., Buckley, T. A., Tam, J. S. & Cheng, A. F. (2001). Pathology of fatal human infection associated with avian influenza A H5N1 virus. *Journal of medical virology* **63**, 242-246.
- Tourbah, A. & Lyon-Caen, O. (2007). Interferons in multiple sclerosis: ten years' experience. *Biochimie* **89**, 899-902.
- Tran, T. H., Nguyen, T. L., Nguyen, T. D., Luong, T. S., Pham, P. M., Nguyen, V. C., Pham, T. S., Vo, C. D., Le, T. Q., Ngo, T. T., Dao, B. K., Le, P. P., Nguyen, T. T., Hoang, T. L., Cao, V. T., Le, T. G., Nguyen, D. T., Le, H. N., Nguyen, K. T., Le, H. S., Le, V. T., Christiane, D., Tran, T. T., Menno de, J., Schultsz, C., Cheng, P., Lim, W., Horby, P. & Farrar, J. (2004). Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. *The New England journal of medicine* **350**, 1179-1188.
- Twu, K. Y., Kuo, R. L., Marklund, J. & Krug, R. M. (2007). The H5N1 influenza virus NS genes selected after 1998 enhance virus replication in mammalian cells. *J Virol* **81**, 8112-8121.
- Uiprasertkul, M., Kitphati, R., Puthavathana, P., Kriwong, R., Kongchanagul, A., Ungchusak, K., Angkasekwinai, S., Choekphaibulkit, K., Srisook, K., Vanprapar, N. & Auewarakul, P. (2007). Apoptosis and pathogenesis of avian influenza A (H5N1) virus in humans. *Emerging infectious diseases* **13**, 708-712.
- van den Brand, J. M., Stittelaar, K. J., van Amerongen, G., Rimmelzwaan, G. F., Simon, J., de Wit, E., Munster, V., Bestebroer, T., Fouchier, R. A., Kuiken, T. & Osterhaus, A. D. (2010). Severity of pneumonia due to new H1N1 influenza virus in ferrets is intermediate between that due to seasonal H1N1 virus and highly pathogenic avian influenza H5N1 virus. *The Journal of infectious diseases* **201**, 993-999.
- Van Hoesen, N., Belser, J. A., Szretter, K. J., Zeng, H., Staeheli, P., Swayne, D. E., Katz, J. M. & Tumpey, T. M. (2009). Pathogenesis of 1918 pandemic and H5N1 influenza virus infections in a guinea pig model: antiviral potential of exogenous alpha interferon to reduce virus shedding. *Journal of virology* **83**, 2851-2861.
- van Riel, D., den Bakker, M. A., Leijten, L. M., Chutinimitkul, S., Munster, V. J., de Wit, E., Rimmelzwaan, G. F., Fouchier, R. A., Osterhaus, A. D. & Kuiken, T. (2010). Seasonal and pandemic human influenza viruses attach better to human upper respiratory tract epithelium than avian influenza viruses. *Am J Pathol* **176**, 1614-1618.

- Veckman, V., Osterlund, P., Fagerlund, R., Melen, K., Matikainen, S. & Julkunen, I. (2006). TNF-alpha and IFN-alpha enhance influenza-A-virus-induced chemokine gene expression in human A549 lung epithelial cells. *Virology* **345**, 96-104.
- Vong, S., Ly, S., Van Kerkhove, M. D., Achenbach, J., Holl, D., Buchy, P., Sorn, S., Seng, H., Uyeki, T. M., Sok, T. & Katz, J. M. (2009). Risk factors associated with subclinical human infection with avian influenza A (H5N1) virus--Cambodia, 2006. *The Journal of infectious diseases* **199**, 1744-1752.
- Vreede, F. T., Jung, T. E. & Brownlee, G. G. (2004). Model suggesting that replication of influenza virus is regulated by stabilization of replicative intermediates. *Journal of virology* **78**, 9568-9572.
- Wang, X., Li, M., Zheng, H., Muster, T., Palese, P., Beg, A. A. & Garcia-Sastre, A. (2000). Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappaB and induction of alpha/beta interferon. *Journal of virology* **74**, 11566-11573.
- Wathelet, M. G., Lin, C. H., Parekh, B. S., Ronco, L. V., Howley, P. M. & Maniatis, T. (1998). Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer in vivo. *Molecular cell* **1**, 507-518.
- Weber, F., Wagner, V., Rasmussen, S. B., Hartmann, R. & Paludan, S. R. (2006). Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. *Journal of virology* **80**, 5059-5064.
- Webster, R. G., Campbell, C. H. & Granoff, A. (1971). The "in vivo" production of "new" influenza A viruses. I. Genetic recombination between avian and mammalian influenza viruses. *Virology* **44**, 317-328.
- Weiss, R. A. (2002). Virulence and pathogenesis. *Trends Microbiol* **10**, 314-317.
- WHO (1980). A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum. In *Bulletin of the World Health Organization*, pp. 585-591. Genf.
- WHO (2010a). Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO.
- WHO (2010b). <http://www.who.int/en/>.
- Wolff, T. & Ludwig, S. (2009). Influenza viruses control the vertebrate type I interferon system: factors, mechanisms, and consequences. *J Interferon Cytokine Res* **29**, 549-557.
- Wolff, T., Zielecki, F., Abt, M., Voss, D., Semmler, I. & Matthaei, M. (2008). Sabotage of antiviral signaling and effectors by influenza viruses. *Biological chemistry* **389**, 1299-1305.
- Wu, W. L., Chen, Y., Wang, P., Song, W., Lau, S. Y., Rayner, J. M., Smith, G. J., Webster, R. G., Peiris, J. S., Lin, T., Xia, N., Guan, Y. & Chen, H. (2008). Antigenic profile of avian H5N1 viruses in Asia from 2002 to 2007. *Journal of virology* **82**, 1798-1807.
- Xiang, Y., Condit, R. C., Vijaysri, S., Jacobs, B., Williams, B. R. & Silverman, R. H. (2002). Blockade of interferon induction and action by the E3L double-stranded RNA binding proteins of vaccinia virus. *Journal of virology* **76**, 5251-5259.
- Xu, L. G., Wang, Y. Y., Han, K. J., Li, L. Y., Zhai, Z. & Shu, H. B. (2005). VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell* **19**, 727-740.
- Yoneyama, M. & Fujita, T. (2010). Recognition of viral nucleic acids in innate immunity. *Rev Med Virol* **20**, 4-22.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S. & Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature immunology* **5**, 730-737.
- Yoneyama, M., Suhara, W., Fukuhara, Y., Sato, M., Ozato, K. & Fujita, T. (1996). Autocrine amplification of type I interferon gene expression mediated by interferon stimulated gene factor 3 (ISGF3). *Journal of biochemistry* **120**, 160-169.
- Yuan, W. & Krug, R. M. (2001). Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein. *The EMBO journal* **20**, 362-371.
- Zebedee, S. L. & Lamb, R. A. (1988). Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *Journal of virology* **62**, 2762-2772.
- Zeng, H., Goldsmith, C., Thawatsupha, P., Chittaganpitch, M., Waicharoen, S., Zaki, S., Tumpey, T. M. & Katz, J. M. (2007). Highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses elicit an attenuated type I interferon response in polarized human bronchial epithelial cells. *Journal of virology* **81**, 12439-12449.
- Zhao, C., Denison, C., Huibregtse, J. M., Gygi, S. & Krug, R. M. (2005). Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 10200-10205.
- Zhou, A., Paranjape, J. M., Der, S. D., Williams, B. R. & Silverman, R. H. (1999). Interferon action in triply deficient mice reveals the existence of alternative antiviral pathways. *Virology* **258**, 435-440.

**Zhou, J. J., Fang, D. Y., Fu, J., Tian, J., Zhou, J. M., Yan, H. J., Liang, Y. & Jiang, L. F. (2009).** Infection and replication of avian influenza H5N1 virus in an infected human. *Virus Genes* **39**, 76-80.

## ***Sequenzdaten der untersuchten H5N1-Isolate***

Im Folgenden sind die in Kooperation mit A. Zöhner, RKI, FG 17, generierten Sequenzierungsergebnisse dargestellt. Die NP-Segmente wurden nicht und die PB2-Segmente der humanen H5N1-Isolate nur partiell sequenziert.

### **A/Hongkong/156/97 (H5N1)**

#### **PB2 (partiell)**

GGGAGACTGTAAAGATCCAATGGTCCCAAGAACCCACCATGCTATACAATAAGATGGAGTTTGAACCATTTCAATCTTTA  
GTACCAAAGGCTGCCAGAAGCCAATATAGTGGATTTGTGAGAACGCTATCCAGCAGATGCGTGATGTTTTGGGAACGT  
TTGACACTGTTCAAATAATCAAATACTACCATTTGCAGCAGCCCCACCTGAACAGAGTAGGATGCAATTTTCTTCTCTGA  
CTGTGAATGTGAGGGGATCAGGAATGAGAATACTTGTGAGAGGTAACCTCCCCTGCGTTTAAMTACAWCAAGACAACT  
AAGAGGCTTACAATACTTGGGAAGGACGCAGGTGCACTTACAGAGGACCCAGATGAAGGAACAGCAGGAGTAGAGTS  
TGCAGTATTGAGAGGGTTTCTAATTCTCGGCAAAGAAGACAAAAGATATGGACCAGCATTGAGCATCAATGAACTGAG  
CAATCTTACGAAAAGGGGAG

#### **PB1**

ATGGATGTCAATCCGACTTTACTTTTTCTTAAAGTGCCAGCGCAAAATGCCATAAGTACCACATTCCTTATACTGGAGAT  
CCCCATACAGCCATGGAACAGGAACAGGATACACCATGGACACAGTCAACAGAACACATCAATATTCAGAAAAAGGG  
AGGTGGACAACAAACACAGAGACCGGAGCACCCCAACTCAACCTATTGATGGACCATTACCTGAAGATAACGAGCCG  
AGCGGGTATGCACAAACAGATTGTGTATTGGAAGCAATGGCTTTCCTTGAAGAATCCCACCCAGGACTCTTTGAAA  
ACTCATGTCTTGAACGATGGAAGTTGTCCAGCAAACGAGAGTGGATAAGCTGACCCAAGGTCGCCAGACCTATGACTGGA  
CATTGAACAGAAACCAGCCGCTGCAACTGCTTTGGCCAACCATAGAAATTCAGATCGAACGGTCTAACAGCCAA  
TGAGTCAGGAAGGCTAATAGATTTCTCAAGGACGTAATGGAATCAATGGATAAAGGAAGAAATGGAGATAACAACACA  
TTCCAGAGAAAGAGAAGAGTGAGGGACAACATGACCAAGAAAATGGTCACAAAGAACAATAGGGAAAAAGAAGC  
AAAGGCTGACAAAAAGAGCTACCTAATAAGAGCACTGACACTGAACACAATGACAAAAGATGCTGAAAGGGGAAAA  
TTGAAAAGGCGAGCGATTGCAACACCCGGAATGCAATCAGAGGATTCGTGCACTTTGTGCAAGCACTAGCAAGGAGC  
ATCTGTGAAAACTTGAGCAATCTGGACTCCCCGTCGGAGGGAATGAGAAGAAGGCTAAATTTGGCAAATGTTGTGAGA  
AAGATGATGACTAACTACAAGATACAGAGCTCTTTTTACAGTTACCGGAGACAACACCAAATGGAATGAGAATCAGA  
ATCCTCGAATATTTCTAGCAATGATAACATACATCACAAGGAACCAACCTGAATGGTTTAGAAATGTCTTGAGCATTGCC  
CCTATAATGTTCTCAAATAAGATGGCGAGGTTAGGGAAAGGATACATGTTTCGAGAGTAAGAGCATGAAGCTACGGACA  
CAAATACCAGCAGAAATGCTTGCAAACATTGACTTGAATACTTCAACGAATCAACGAGAAAAGAAAATTTGAGAAAATAA  
GACCTCTACTAGTAGAGGGCACAGCCTCATTGAGTCCAGGGATGATGATGGGCATGTTTAAATGCTAAGTACGGTCTT  
AGGAGTCTCAATCTTAAATCTTGGGCAGAAGAGGTACACCAAACACATACTGGTGGGATGGGCTCCAATCCTCTGAT  
GATTTGCTCTCATAGTGAATGCACCAAATCATGAGGGAATACAAGCAGGAGTGGATAGATTCTATAGGACTTGCAAAC  
TAGTTGGAATCAACATGAGCAAAAAGAAGTCTTACATAAATCGGACAGGAACATTTGAGTTCACAAGCTTTTTCTACCGC  
TATGGGTTTGTAGCCAATTCAGCATGGAGCTGCCAGCTTTGGAGTTTCCGGAATTAATGAATCGGCTGACATGAGCA  
TTGGAGTTACAGTGATAAAGAATAATATGATAAACAACGACCTTGGACCAGCAACAGCTCAGATGGCTCTTACAGCTGTT  
CATTAAAGGACTACAGATACACCTACCGATGCCACAGAGGTGATACACAAATTCAAATAAGATCATTGAAATTGAAG  
AAGCTGTGGGAGCAGACCCGCTCAAAGGCAGGACTGTTGGTTTCAGATGGAGGGCCGAATTTATACAACATCCGGAAT  
CTTACATTCCAGAAGTTTCTGAAAGTGGGAGTTGATGGATGAAGATTATCAGGGAAGACTGTGTAACCCTCTGAACC  
CGTTTGTCACTATAAGGAAGTTGAATCCGTCAACAATGCTGTGGTAATGCCAGCCCATGGTCCAGCCAAGAGCATGGA  
ATATGATGCCGTTGCAACTACACATTCATGGATTCCAAGAGAAAACCGCTCATTCTCAACACTAGCCAAAAGGGGAATTC  
TTGAGGATGAACAAATGTACCAGAAGTGTGCACTCTATTGAGAAAATCTTCCCTAGCAGTTCATACCGGAGGCCAGTT  
GGAATTTCCAGCATGATGGAGCCATGGTGTCTAGGGCCGAATTTGATGCACGGATTGACTTCAATCTGGAAGGATT  
AAGAAAAGAAGATTTGCTGAGATCTTGAAGATCTGTTCCACCATTGAAGAGCTCGGACGGCAAGGGAAGTGAATTTGG  
CTTGTCTTCATGAAAAATGCCTTGTCTACT

## Sequenzdaten der untersuchten H5N1-Isolate

---

### PA

CTTTGTGCGACAATGCTTCAATCCAATGATTGTGCGAGCTTGC GGAAAAGACAATGAAAGAGTATGGGGAAGATCCGAA  
GATTGAAACAAACAAGTTCGCTGCAATATGCACACACTTAGAAGTCTGCTTCATGTATTCCAGACTTCCATTTCAATGACG  
AACGAGGCCGAATCAATAATTGTGGAATCTGGTGATCCGAATGCATTGTTGAAACACCGGTTTCAAATAATTGAAGGAA  
GAGACCGAGCAATGGCCTGGACAGTGGTGAATAGCATCTGCAACACCACAGGAGTCGATAAACCCAAATTCCTTCCGG  
ATCTATACGACTACAAGGAAAACCGATTCACTGAAATTGGTGTGACACGGAGGGAAGTTCATATATTAATCTTAGAGAA  
AGCTAACAAAGATAAAATCCGAGGAAAACACATATCCACATCTTCTCATTCACTGGAGAAGAAATGGCCACTAAAGCTGAC  
TACACCCTTGATGAAGAGAGCAGGGCAAGAATCAAAACCAGACTATTCACCATAAGACAGGAAATGGCAAGCAGGGGT  
CTATGGGACTCCTTTCGTCAGTCCGAGAGAGGGCAAGAGACAATTGAAGAAAAGATTTGAAATCACAGGGACCATGCGT  
AGGCTTGCCGACCAAAGTCTCCACCTAATCTCCAGCCTTGAAAACCTTGTAGAGCCTATGTGGATGGATTTAAACCGAA  
CGGCTGCATTGAGGGCAAGCTTTCTCAAATGTGCAAGAAGTGAACGCCAGAATTGAGCCATTTCTGAAGACAACACCA  
CGTCTCTCAGATTGCCCTGATGGACCTCCCTGCTCCAGCGGTGCAAAATTTCTGCTGATGGATGCTCTGAAATTAAGCAT  
TGAGGACCCGAGCCATGAGGGGGAGGGGATACCGCTATATGATGCGATCAAATGCATGAAAACATTTCTTTGGCTGGAG  
AGAGCCCAACATCATCAAACCACACGAAAAAGGCATAAATCCAAATTATGTGCTGGATTGGAAGCAGGTGCTGGCAGA  
ACTCCAGGATATTGAAAATGAGGATAAAAAATCCAAAAACAAGAACATGAAGAAAAACAAGCCAATTAATGTGGGCACT  
CGGAGAGAATATGGCACCCGAAAAAGTGGACTTTGAGGATTGCAAAGACATTGACGATCTGAAAACAGTATCACAGTGA  
TGAGCCAGAGCTCAGATCGCTAGCAAGCTGGATCCAGAATGAGTTCAACAAGGCATGTGAATTGACCGATTTCGAGCTG  
GATAGAATTGATGAGATAGGGGAAGATGTTGCCCAATTGAGCACATTGCAAGTATGAGAAGGAACTACTTCACAGC  
GGAGGTGTCCATTGCAGGGCTACTGAGTACATAATGAAGGGGGTTTACATAAACACAGCTTTGCTCAATGCATCTTGT  
GCAGCCATGGATGACTTCCAATGATAAGCAAATGCAGAACAAAAGAAGGAAGGAGGAGGACAAACCTG  
TATGGGTTCAATTGATAAAGGAAGGTCCCATTTGAGAAATGATACTGACGTGGTGAACCTTTGTGAGTATGGAATTCCTCC  
TTACTGACCAAGGCTGGAGCCACACAATGGGAAAAGTACTGTGTTCTTGAATAGGGGAAATGCTCTTGC GGACTGC  
AATAGGTCAAGTGTCAAGGCCATGTTCTGTATGTGAGAACTAACGGAACCTCAAAAATTAAGATGAAATGGGGGAT  
GGAAATGAGGCGCTGCCTTCTTCAATCTTCAACAGATTGAGAGCATGATCGAGGCTGAGTCTTCTATCAAAGAGAAA  
GACATGACCAAAGAGTTCCTTGA AAAACAGATCGGAGACATGGCCAATTGGAGAGTCACCTAAGGGAGTGGAGGAAGG  
CTCCATCGGGAAGGTGTGAGAACCTTAGCAAAATCTGTGTTCAACAGCCTATATTCATCTCCACAACCTCGAAGGAT  
TTTCAGCTGAATCGAGAAAACCTACTACTATTGTTCAAGCACTTAGGGACAACCTGGAACCTGGAACCTTCGATCTTGAA  
GGGCTATATGGAGCAATTGAGGAGTGCCTGATTAATGATCCCTGGGTTTTGCTTAATGCATCTTGGTTCAACTCCTTCT  
CACACATGACTAAGATAGTTGTGGCAATGCTACTATTGCTATCCATACGCCAAAA

### HA

ATGGAGAAAACAGTGCTTCTTCTTGAACAGTCACTGTTGTTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTACCATGCAAACAA  
CTCGACAGAGCAGGTTGACACAATAATGGAAAAGAATGTTACTGTTACACATGCCCAAGACATACTGGAAAGGACACA  
CAACGGGAAGCTCTGCGATCTAAATGGAGTGAAGCCTCTCATTTTGGAGGATTGTAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGA  
AACCTATGTGTGACGAATTCATCAATGTGCCGGAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAGTCCAGCCAATGACCTCT  
GTTATCCAGGGAATTTCAACGACTATGAAGAAGTGAACACCTATTGAGCAGAATAAACCATTTTGAAGAAAATTCAGAT  
CATCCCAAAAGTCTTGGTCCAATCATGATGCCTCATCAGGGGTGAGCTCAGCATGTCCATACCTTGGGAGGTCTCCT  
TTTTAGAAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAAGTGCATACCCAACAATAAAGAGGAGCTACAATAATACCAACCA  
AGAAGATCTTTTGGTACTGTGGGGGATTCACCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAAAGCTCTATCAAAAATCCAACC  
ACCTACATTTCCGTTGGAACATCAACACTGAACCAGAGATTGGTTCCAGAAATAGCTACTAGACCCAAAGTAAACGGGC  
AAAGTGAAGAATGGAGTCTTCTGGACAATTTTAAAGCCGAATGATGCCATCAATTTGAGAGTAATGGAAATTTTCAT  
TGCTCCAGAATATGCATACAAAATGTCAAGAAAGGGGACTCAACAATTATGAAAAGTGAATTGGAATATGGTAACTGC  
AACACCAAGTGTCAAATCCAATGGGGGCGATAAACTCTAGTATGCCATTCCACAACATACACCCCTCACCATCGGGG  
AATGCCCAAAATATGTGAAATCAAACAGATTAGTCTTGGCAGTGGACTCAGAAAATACCCCTCAAAGAGAGAGAAGAAG  
AAAAAGAGAGGACTATTTGGAGCTATAGCAGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATG  
GGTACCACCATAGCAATGAGCAGGGGAGTGGATACGCTGCAGACAAAAGAAATCCACTCAAAAGGCAATAGATGGAGTC  
ACCAATAAGGTCAACTCGATCATTAACAAAATGAACACTCAGTTTGGAGCCGTTGGAAGGGAAATTAATAACTTGGAAA  
GGAGGATAGAGAATTTAAACAAGAAGATGGAAGACGGATTCTAGATGTCTGGACTTACAATGCTGAACTTCTGGTTCT  
CATGGAAAATGAGAGAACTCTCGACTTTCATGACTCAAATGTCAAGAACCTTTACGACAAGGTCCGACTACAGCTTAGG  
GATAATGCAAAGGAGCTGGGTAATGGTTGTTTCAAAATCTATCAAAAATGTGATAATGAATGTATGGAAAGTGTAAAAA  
ACGGAACGTATGACTACCCGAGTATTGAGAAGAAGCAAGACTAAACAGAGAGGAAATAAGTGGAGTAAAATGGAAAT  
CAATGGGAACCTACCAATACTGTCAATTTATTCAACAGTGGCGAGTCCCTAGCACTGGCAATCATGGTAGCTGGTCTA  
TCTTTATGGATGTGCTCCAATGGATCGTTACAATGCAGAATTTGCATTTAA

## Sequenzdaten der untersuchten H5N1-Isolate

### NA

TCAGAAGATAATAACCATTGGATCAATCTGTATGGTAGTTGGGATAATCAGCTTGATGTTACAAATTGGAAACATAATAT  
CAGTATGGGTGACCCACATAATTCAAACCTGGCACCCAAACCAGCCTGAACCATGCAATCAAAGCATCAATTTTTACT  
GAGCAGGCTGCAGCTTCAGTGACATTAGCGGGCAATTCCTCTCTGCCCATTAGTGATGGGCTATATACAGCAAGG  
ACAATAGTATArGAATTGGTTCCAAAGGGGATGTGTTTGTATAAGAGAACCATTATCTCATGCTCCCATTTGGAATGC  
AGAACCTTTTTCTTGACCCAAGGAGCCCTATTGAATGACAAGCATTCTAATGGGACCGTCAAAGACAGGAGCCCTATA  
GAACTTTAATGAGCTGTCTGTGGTGAGGCTCCTCCCATACAACCTCAAGGTTTGAGTCTGTTGCTTGGTCGGCAAGT  
GCTTGCCATGATGGCATTAGTTGGCTAACAAATTGGAATTTCCGGTCCGGATAATGGGGCTGTGGCTGTGTTGAAATACA  
ATGGCATAATAACAGACACCATCAAGAGTTGGAGGAACAACATACTGAGGACGCAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTGA  
ATGGTCTGTGTTTACTGTAATGACAGATGGACCGAGTAATGAACAGGCCTCATAACAAGATTTTCAAGATAGAAAAAGG  
GAGGGTAGTCAAATCAGTTGAGTTGAACGCCCTAATTATCATTACGAGGAATGCTCCTGTTATCCTGATGCTGGCGAA  
ATCAGATGTGTGTGCAGGGATAATTGGCATGGCTCGAACCGACCATGGGTGTCTTTCAATCAGAATCTGGAGTATCAA  
TAGGATATATATGCAGTGGGGTTTTCCGGAGACAGTCCACGCCCAATGATGGGACAGGCAGTTGTGGTCCAGTGTCTCT  
TAACGGAGCGTATGGAGTAAAAGGGTTTTCAATTAATAACGGCAATGGTGTGGATCGGGAGAACCAAAGGACTAG  
TTCCAGGAGCGTTTTGAAATGATTTGGGATCCAAATGGGTGGACCGAAACAGACAGTAGCTTCTCGTTGAAGCAAGA  
CATCATAGCAATAACTGATTGGTCAGGATACAGCGGGAGTTTTATTCAACATCCAGAAGTACAGGATTAATTGCATG  
AGACCTTGCTCTGGGTTGAACTAATCAGAGGGAGGCCAAAGAGAAAAACAATCTGGACTAGTGGGAGCAGTATATCT  
TTCTGTGGTGTAATAGTGACTGTGGGTTGGTCTTGCCAGACGGTCTGAGTTGCCATTCACCATTGACAAGTAG

### M

ATGAGTCTTCTaACCGAGGTGCAAACGTACGTTCTCTATCATCCCATCAGGCCCCCTCAAAGCCGAGATCGCGCAGAG  
ACTTGAGGATGTTTTGCAGGGAAGAACACAGATCTTGAGGCTCTCATGGAATGGCTAAAGACAAGACCAATCCTGTCA  
CCTCTGACTAAGGGAATTTAGGGTTGTGTTACGCTCACCGTGCCAGTGAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGATTTG  
TCCAAAATGCCCTAAATGGGAATGGAGACCCAAACAACATGGACAGGGCAGTTAAACTATACAAGAAGCTGAAGAGGG  
AAATGACATTCATGGAGCAAAGGAAGTTGCACTCAGTTACTCAACTGGTGCGCTTGCCAGTTGCATGGGTCTCATATA  
CAACCGGATGGGAACAGTGACCACAGAAGTGGCTCTTGGCCTAGTATGTGCCACTTGTGAGCAGATTGCTGATGCCAA  
CATCGGTCCCACAGGCAGATGGCGACTACCACCAACCCACTAATCAGGCATGAGAACAGAATGGTACTAGCCAGCACTA  
CGGCTAAGGCCATGGAGCAAATGGCTGGATCAAGTGAAGCAGGCAGCAGAGGCCATGGAAGTCGCAAGTCAGGCTAGA  
CAAATGGTGCAGGCAATGAGGACAATTGGGACTCACCTAGCTCCAGTAcAGGTCTAAAAGATGATCTTATTGAAAATT  
TGCAGGCTTACCAGAAACGGATGGGGTGCAGATGCAGCGATTCAAGTATCCTCTCGTTGTTGCAGCAAGTATCATTG  
GGATATTGCATTGATATTGTGGATTCTTGATCGTCTTTCTCAAATGCATTTATCGTCGTTTTAAATACGGTTTTGAAA  
GAGGGCCTTACGGAAGGAGTGCCTGAGTCTATGAGGAAGAGTATCGGCAGGAACAGCAGAATGCTGTGGATGTTG  
ACGATGGTCATTTtGTCAACATAGAGCTgAgTAAAAAACTACCTGTTTCTACT

### NS

GTGACAAAAACATAATGGATTCCAACACTGTGTCAAGCTTTCAGGTAGACTGCTTTCTTTGGCATGTCCGCAAACGATTT  
GCAGACCAAGAAGTGGGTGATGCCCATTCCTTGACCGCTTCGCCGAGATCAGAAGTCCCTAAGAGGAAGAGGCAGC  
ACTCTGGTCTGGACATCAGAAGTCCACTCGTGAAGGAAAGCATATAGTGAGCGGATTCTGGAGGAAGAATCTGAT  
GAGGCATTTAAAATGACTATCGCTTCAGTGCCTGCTCCACGCTACCTAACTGAAATGACTCTTGAGGAAATGTCAAGGA  
ACTGGTTAATGCTCATTCCCAAGCAGAAAGTGACAGGGTCCCTTTGCATTAGAATGGACCAGGCAATAATGGATAAAGA  
CATCATATTGAAAGCAAACCTTTAGTGTGATTTTAAATCGACTTGAAGCTCTGATACTACTTAGAGCTTTTACAGACGAAG  
GAGCAATAGTGGGCGAAATCTCACCATTACCTCCCTCCAGGACATACTGAAGAGGATGTCAAAAATGCAATTGGGGT  
CCTCATCGGAGGACTTGAATGGAATGATAACACAGTTTCGAGTCTCTGAAACTCTACAGAGATTCACTTGGAGAAGCAGT  
GATGAGAATGGGAGATCTCCACTCCCTCCAAAACAGAAACGGAAAATGGAGAGAAACAATTGAGCCAGAAGTTTGAAGA  
GATAAGATGGTTAATTGAAGAAGTGCACATAGGTTAAGAATTACAGAGAATAGCTTTGAACAAATAACCTTTATGCAA  
GCCTTACAACCTATTGCTTGAAGTGGAGCAAGAGATAAGAACTTTCTGTTTCAGCTTATTTAATGATAAAAAACAC

### A/Thailand/1 (Kan-1)/2004 (H5N1)

#### PB2 (partiell)

TTAATGGTTGCATACATGTTGGAAAGGGAACTAGTCCGCAAACAGATTCTACCGGTAGCAGGCGGAAAAAGCAGT  
GTGTACATTGAGGTATTGCATTTGACTCAAGGGACCTGCTGGGAACAGATGTACTCCAGGCGGAGAAGTGAGAAAT  
GACGATGTTGACCAGAGTTTGATCATCGCTGCCAGAAACATTGTTAGGAGAGCAACGGTATCAGCGGATCCACTGGCAT  
CACTGCTGGAGATGTGTACAGCACACAAATTGGTGGGATAAGGATGGTGGACATCCTTAGGCAAATCCAAGTGGG  
AACAAGCTGTGGATATATGCAAAGCAGCAATGGGTCTGAGGATCAGTTCTCTTTAGCTTTGGAGGCTTCACTTTCAA

## Sequenzdaten der untersuchten H5N1-Isolate

AGAACAAGTGGATCATCCGTC AAGAAGGAAGAGGAAGTGCTTACAGGCAACCTCCAAACATTGAAAATAAGAGTACAT  
GAGGGGTATGAGGAATTCACAATGTTGGGCGGAGGGCAACAGCTATCTGAGGAAAGCAACTAGAAGGCTGATTCA  
GTTGATAGTAAGTGAAGAGACGAACAATCAATCGCTGAGGCAATCATTGTAGCAATGGTGTCTCTCAGGAGGATTG  
CATGATAAAGGCA

### PB1

ATGGATGTCaATCCGACTTTACTTTTCTTGaAAGTACCAGTGCAAAATGCTATAAGTACCACATTCCCTTATACTGGAGAC  
CCTCCATACAGCCATGGAACAGGGACAGGATACACCATGGACACAGTCAACAGAACACACCAATATTCAGAAAAGGGG  
AAGTGGACAACAAACACAGAGACTGGAGCACCCCACTCAACCCGATTGATGGACCACTGCCTGAGGATAATGAGCCC  
AGTGGGTATGCACAAAAGATTGTGATTGGAAGCAATGGCTTTCCTTGAAGAATCCCACCCAGGGATCTTTGAAAAC  
CGTGTCTTGAAAACAAATGGAATTGTTCAACAAACAAGAGTGGATAAACTGACCCAAGGTCGCCAGACCTATGACTGGAC  
ATTGAATAGAAAACCAACCGGCTGCAACTGCTTTGGCCAACACTATAGAAATCTTCAGATCAAACGGTCTAACAGCCAAT  
GAATCGGGACGGCTAATAGATTTCTCAAGGATGTGATGGAATCAATGGATAAGGAAGAAATGGAGATAACAACACAT  
TTCCAGAGAAAAGAGAAGGGTGAGGGGACAACATGACCAAAAAAATGGTCACACAAAGAACAATAGGGAAGAAAAACA  
AAGGCTGAACAAAAAGAGCTACCTGATAAGAGCACTGACACTGAACACAATGACAAAAGATGCAGAAAAGAGGCAAAAT  
GAAGAGGCGAGCGATTGCAACACCCGGAATGCAAATCAGAGGATTCGTGTACTTTGTTGAAACACTAGCGAGGAGTAT  
CTGTGAGAAACTTGAGCAATCTGGACTCCAGTCGGAGGGAATGAGAAGAAGGCTAAATTGGCAAACGTCGTGAGGA  
AGATGATGACTAACTACAAGATACTGAACTCTCCTTTACAATTACTGGAGACAATACCAAATGGAATGAGAATCAGAA  
TCCTAGGATGTTTCTGGCAATGATAACGTACATCACAAGGAACCAGCCAGAATGGTTTCGGAATGTCTTAAGCATTGCA  
CCTATAATGTTCTCAAAACAAATGGCGAGACTAGGAAAAGGATACATGTTTCGAAAGTAAGAGCATGAAGTTACGAACA  
CAAATACCAGCAGAAATGCTTGCAAACATTGATCTTAAATACTTCAATGAATTAACGAAAAAGAAAATTGAGAAAATAA  
GGCCTCTATTAATAGATGGTACAGCCTCATTGAGCCTGGAATGATGATGGGCATGTTCAACATGCTGAGTACAGTCTT  
AGGAGTTTCAATCTGAATCTTGACAGAAAAGGTACACCAAACACATATTGGTGGGACGGACTCCAATCCTCTGAT  
GATTTGCTCTCATCGTAAATGCACCGAATCATGAGGGAATACAAGCAGGAGTGGATAGGTTTTATAGGACTTGTAAC  
TAGTTGGAATCAATATGAGCAAGAAGAAGTCTTACATAAATCGGACAGGGACATTTGAATTCACGAGCTTTTTCTACCG  
CTATGGATTTGTAGCCAATTTAGTATGGAGCTGCCAGTTTTGGAGTGTCTGGAATTAATGAATCGGCCGACATGAGC  
ATTGGTGTACAGTGATAAAAAACAATATGATAAACAACGACCTTGGCCAGCAACAGCTCAGATGGCTCTCAGTTAT  
TCATCAAGGACTACAGATACACATACCGATGCCACAGAGGGGATACGCAAGTCCAAACAAGGAGATCATTCCGAGCTGA  
AGAAGCTGTGGGAGCAAACCGTTCAAAGGCAGGACTGTTGATTTAGATGGAGGACCAAATCTATACAATATCCGAA  
ATCTCCATATCTCTGAAGTCTGCTTAAAATGGGAATTGATGGATGAAGATTACCAGGGCAGACTGTGTAATCCTCTGAAT  
CCATTCGTGAGCCATAAGGAAATGAATCTGTCAACAATGCTGTAGTAATGCCAGCTCATGGCCCGCCAAGAGTATGG  
AATATGATGCCGTTGCAACTACACATTCATGGATTCTTAAAAGGAACCGTTCCATTCTCAATACGAGTCAAAGGGGAATT  
CTTGAGGATGAACAGATGTACCAGAAGTGTGCAATTTATTGAGAAAATTCTCCCAGCAGTTTATATCGGAGGCCAG  
TTGGAATTTCCAGCATGGTGGAGGCCATGGTGTCTAGGGCCCGAATTGACGCACGAATTGATTTGAGTCTGGAAGGA  
TTAAGAAAAGAAGAGTTTGTGAGATCATGaGATCTGTTCCACCATTGAAGAACTCAGACGGCAAAAAATAGTGAATTA  
GCTGTCTCTCGTGAAAAAATGCCTTGTCTACTAATAc

### PA

TTTGTGCGACAATGCTTCAATCCAATGATCGTCGAGCTTGCAGAAAAGGCAATGAAAGAATATGGGGAAAGATCCGAAA  
ATCGAAACGAACAAGTTTGTGCAATATGCACACACTTGGAGGTCTGTTTCATGTATTCCGATTTTCACTTTATTGATGA  
ACGGAGTGAATCAATAATTGTAGAATCTGGAGATCCGAATGCATTATTGAAACACCGATTTGAAATAATTGAAGGAAGA  
GACCGAACGATGGCCTGGACTGTGGTGAATAGTATCTGCAACACCACAGGAGTTGAGAAAACCTAAATTTCTCCCAGATT  
TGTATGACTACAAAGAGAACCGATTCATCGAAATTTGGAGTGACACGGAGGGAAGTTCATACATACTATCTGGAGAAA  
CCAACAAGATAAAATCCGAGAGGACACATATTACATATTCTCATTACAGGGGAGGAAATGGCCACCAAAGCGGACTA  
CACCTTGATGAAGAGAGCAGGGCAAGAATTAACCAGGCTGTTACCATAAGGCAGGAAATGGCCAGTAGGGGTCT  
ATGGGATTCCTTTCTCAATCCGAGAGAGGGCAAGAGACAATTGAAGAAAAATTTGAAATCACTGGAACCATGCGCAG  
ACTTGACAGACCAAAGTCTCCACCGAATCTTCCAGCCTTGAACCTTTAGAGCCTATGTGGATGGGTTTGAACCGAACG  
GCTGCATTGAGGGCAAGCTTTCTCAAAATGTCAAAAGAAGTGAATGCTAGAATTGAGCCATTTTTGAAGACAACGCCACG  
CCCTCTCAGACTACCTGATGGCCTCCTTGTCTCAGCGGTGCAAGTTCTTGTGATGGATGCCCTTAAATTAAGCATCG  
AAGACCCGAGTCATGAGGGGGAGGGGATACCACTATACGATGCAATCAAATGCATGAAGACATTTTTCGGATGGAAG  
AGCCCAACATCGTGAACACATGAAAAAGGCATTAACCCCAATTACCTCCTGGCTTGAAGCAAGTGTGGCAGAACT  
CCAAGATATTGAAAATGAGGAGAAAATCCAAAAACAAGAACAATGAAAAACAAGCCAGTTGAAGTGGGCACTCG  
GTGAGAACATGGCACCAGAGAAAAGTAGACTTTGAGGACTGCAAAAGATGTTAGCGATCTAAGACAGTATGACAGTGTG  
AACCAGAGTCTAGATCACTAGCAAGCTGGATTGAGAGTGAATTAACAAGGCATGTGAATTGACAGATTCGAGTTGGAT  
TGAATTTGATGAAATAGGAGAAGACGTAGCTCAATTTGAGCACATTGCAAGTATGAGAAGGAACTTTTTACAGCGGA  
AGTATCCCATTGCAGGGCCACTGAATACATAATGAAGGGAGTGTACATAAACACAGCCCTGTTGAATGCATCCTGTGCA

## Sequenzdaten der untersuchten H5N1-Isolate

---

GCCATGGATGACTTTCAACTGATTCCAATGATAAGCAAATGCAGAACCAAAGAAGGAAGACGGAAAATAATCTGTATG  
GATTCATTATAAAAAGGGAGATCCCACTTGAGGAATGATACCGATGTGGTAAATTTTGTGAGTATGGAATTCTCTTACT  
GATCCGAGGCTGGAGCCACACAAGTGGGAAAAGTACTGTGCCTCGAGATAGGAGACATGCTCCTCCGGACTGCAGTA  
GGCCAAGTTTCAAGGCCATGTTCTGTATGTAAGAACCAATGGAACCTCCAAGATCAAATGAAATGGGGCATGGAA  
ATGAGGCGATGCCTTCTCAATCCCTCAACAAATGAAAGCATGATTGAAGCCGAGTCTTCTGTCAAAGAGAAGGACA  
TGACCAAAGAATTCTTTGAAAACAAATCAGAAACATGGCCGATTGGAGAGTCCCCAAGGGGATGGAGGAAGGCTCCA  
TCGGGAAGGTGTGCAGAACCTTGCTGGCGAAGTCTGTGTTCAACAGTTTATATGCATCTCCAACTCGAGGGGTTTTTC  
AGCTGAATCAAGAAAATTGCTTCTCATTGCTCAGGCACTTAGGGACAACCTGGAACCTGGGACCTTCGATCTGGAGGG  
CTATATGAAGCAATTGAGGAGTGCCTGATTAACGATCCCTGGGTTTTGCTTAATGCGTCTTGGTTCAACTCCTCTCGCA  
CATGCACTGAAATAGTTGTGGCAATGCTACTATTTGCTATCCATACTGTCCA

### HA

ATGGAGAAAATAGTGCTTCTTTTTGCAATAGTCAGTCTTGTTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTACCATGCAAACAA  
CTCGACAGAGCAGGTTGACACAATAATGGAAAAGAAGCTTACTGTTACACATGCCCAAGACATACTGGAAAAGACACA  
CAACGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTTAATTTTGGAGAGATTGTAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGA  
AACCAATGTGTGACGAATTCATCAATGTGCCGAATGGTCTACATAGTGAGAGAAGGCCAATCCAGTCAATGACCTCT  
GTTACCCAGGGGATTTCAATGACTATGAAGAATTGAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCATTTTGGAGAAAATTCAGAT  
CATCCCCAAAAGTTCTTG(gtccagtcctgaagcctcattaggggtg)AGCTCAGCATGTCCATACCAGGGAAAAGTCTCCTTTTTCA  
GAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAAGTACATACCCAACAATAAAGAGGAGCTACAATAATACCAACCAAGAAG  
ATCTTTTGGTACTGTGGGGGATTCCACATCCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAAAGCTCTATCAAAAACCAACACCTAT  
ATTTCCGTTGGGACATCAACACTAAACCAGAGATTGGTACCAAGAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAAGTG  
GAAGGATGGAGTTCTTCTGGACAATTTTAAAACGAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTAATGGAAATTTTATTGCTCCA  
GAATATGCATACAAAATTGTCAAGAAAGGGGACTCAACAATTATGAAAAGTGAATTGGAATATGGTAACTGCAACACCA  
AGTGTCAAACCTCAATGGGGGCGATAAACTCTAGTATGCCATTCCACAATATACACCTCTCACCATCGGGGAATGCCCC  
AAATATGTGAAATCAAACAGATTAGTCTTGCAGACTGGGCTCAGAAAATAGCCCTCAAAGAGAGAGAAGAAGAAAAAAG  
AGAGGATTATTTGGAGCTATAGCAGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACCA  
CCATAGCAATGAGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAATCCAATCAAAGGCAATAGATGGAGTACCAATAA  
GGTCAACTCGATCATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGGAGCCGTTGGAAGGGAATTTAACAACCTTAGAAAGGAGAAT  
AGAGAATTTAACAAGAAGATGGAAGACGGGTTCTAGATGTCTGGACTTATAATGCTGAACCTTCTGGTTCTCATGGAA  
AATGAGAGAACTCTAGACTTTTCTGACTCAAATGTCAAGAACCTTTACGACAAGGTCCGACTACAGCTTAGGGATAATG  
CAAAGGAACTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCATAAATGTGATAATGAATGTATGGAAAGTGTAAAGAAACGGAA  
CGTATGACTACCCGAGTATTCAGAAGAAGCAAGACTAAAAAGAGAGGAAATAAGTGGAGTAAAATTGGAATCAATAG  
GAATTTACCAAATACTGTCAATTTATTCTACAGTGGCGAGTTCCCTAGCACTGGCAATCATGGTAGCTGGTCTATCCTTAT  
GGATGTGCTCCAATGGGTGCTTACAATGCAGAATTTGCATTTAAATTTGTGAGTTCAGATTG

### NA

ATGAATCAAATAAGAAGATAATAACCATCGGATCAATCTGTATGGTAACTGGAATGGTTAGCTTAATGTTACAAATTG  
GGAACCTTGATCTCAATATGGGTGAGTCAATTCACACAGGGGAATCAACACAAAGCTGAACCAATCAGCAATACTAA  
TTTTCTTACTGAGAAAAGCTGTGGCTTCAGTAAAATTAGCGGGCAATTCATCTCTTTGCCCATTAATGGATGGGCTGTAT  
ACAGTAAGGACAACAGTATAAGGATCGGTTCCAAGGGGGATGTGTTTGTATAAGAGAGCCATTCATCTCATGCTCCCA  
CTTGGAAATGCAGAACTTTCTTTTTGACTCAGGGAGCCTTGCTGAATGACAAGCACTCCAATGGGACTGTCAAAGACAGA  
AGCCCTCACAGAACATTAATGAGTTGCTGTGGGTGAGGCTCCCTCCCATATAACTCAAGGTTTGTAGTCTGTTGCTTG  
GTCAGCAAGTGTGCCATGATGGCACCAGTTGGTTGACAATTGGAATTTCTGGCCAGACAATGGGGCTGTGGCTGTA  
TTGAAATACAATGGCATAATAACAGACTATCAAGAGTTGGAGGAATAACATACTGAGAACTCAAGAGTCTGAATGTG  
CATGTGTAATGGCTCTTGCTTACTGTAATGACTGACGGACCAAGTAATGGTCAGGCATCACATAAGATCTTCAAAATG  
GAAAAAGGGAAAAGTGGTTAAATCAGTCAATTTGGATGCTCCCAATTACTATGAGGAATGCTCCTGTTATCCTGATG  
CCGGCGAAATCACATGTGTGTGCAGGGATAATTGGCATGGCTCAAATCGGCCATGGGTATCTTTCAATCAAAAATTTGGA  
GTATCAATAGGATATATATGCAGTGGAGTTTTCCGAGACAATCCACGCCCAATGATGGAACAGGTAGTTGTGGTCCG  
GTGTCCTTAACGGGGCATATGGGGTAAAAGGGTTTTCAATTTAAATACGGCAATGGTGTCTGGATCGGGAGAACAAAA  
AGCACTAATCCAGGAGCGGCTTTGAAATGATTTGGGATCAAATGGGTGGACTGAAACGGACAGTAGCTTTTCAAGTGA  
AACAAGATATCGTAGCAATAACTGATTGGTCAGGATATAGCGGGAGTTTTGTCCAGCATCCAGAACTGACAGGACTAGA  
TTGCATAAGACCTTGTCTGGGTTGAGTTGATCAGAGGGCGGCCAAAAGAGAGCACAAATTTGACTAGTGGGAGCAG  
CATATCTTTTTGTGGTGAATACTAGTGACTGTGGGTTGGTCTTGGCCAGACGGTGTGAATTGCCATTCACCATTGACA  
AGTAG

## Sequenzdaten der untersuchten H5N1-Isolate

---

### M

ATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGTACGTTCTCTATCATCCCCTCAGGCCCTCAAAGCCGAGATCGCGCAGAA  
ACTTGAAGATGTCTTTGCAGGAAAGAACCCGATCTCGAGGCTCTCATGGAGTGGCTAAAGACAAGACCAATCCTGTCA  
CCTCTGACTAAAGGGATTTTGGGATTTGTATTACGCTCACCCTGCCAGTGAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGCTTTG  
TCCAGAATGCCCTAAATGGAAATGGAGATCCAAATAATATGGATAGAGCAGTCAAGCTATATAAGAAGCTGAAAAGAG  
AAATAACATTCCATGGGGCTAAGGAGGTCGCACTCAGCTACTCAACCGGTGCACTTGCCAGTTGCATGGGTCTCATATA  
CAACAGGATGGGAACGGTACTACGGAAGTGGCTTTTGGCTAGTGTGTGCCACTTGTGAGCAGATTGCAGATTACACA  
GCATCGGTCTCACAGACAGATGGCACTACCACCAACCACTAATCAGACATGAGAACAGAATGGTGTGGCCAGCACT  
ACAGCTAAGGCTATGGAGCAGATGGCAGGATCAAGTGAGCAGGCAGCGGAAGCCATGGAGATCGCTAATCAGGCTAG  
GCAGATGGTGCAGGCAATGAGGACAATTGGGACTCATCTAACTCTAGTGTGGTCTGAGAGATAATCTTCTTAAAAAT  
TTGCAGGCCTACCAGAAACGAATGGGAGTGCAGATGCAGCGATTCAAGTGATCCTATTGTTGTTGCCGAAATATCATT  
GGGATCTTGCATTGATATTGTGGATTCTTGTATCGTCTTTCTTCAAATGCATTTATCGTCGCCTTAAATACGGTTTAAAA  
AGAGGGCCTGCTACGGCAGGGGTACCTGAGTCTATGAGGGAAGAGTACCGGCAGGAACAGCAGAGTGTGTGGATGT  
TGACGATGGTCATTTTGTCAACATAGAATTGGAGTAAAAAA

### NS

ATGGATTCCAACACTGTGTCAAGCTTTCAGGTAGACTGCTTTCTTTGGCATGTCCGCAAACGATTTGCAGACCAAGAACT  
GGGTGATGCCCATTCCTTGACCGGCTTCGCCGAGATCAGAACTCCCTAAGAGGAAGAGGCAACACTCTTGGTCTGGAC  
ATCGAAACAGCTACGCGCGCAGGAAAGCAGATAGTGGAGCGGATTCTGGAGGAGGAGTCTGATAAGGCACTTAAAAAT  
GCCGGCTTACGCTACCTAACTGACATGACTCTCGAAGAAATGTCAAGGGACTGGTTCATGCTCATGCCCAAGCAGAAA  
GTGGCAGGTTCCCTTGCATCAAATGGACCAGGCAATAATGGATAAAGTCATCATATTGAAAGCAAACCTCAGTGTGA  
TTTTGACCGGTTGGAAACCTAATACTACTTAGAGCTTTCACAGAAGAAGGAGCAATCGTGGGAGAAATCTCACCATT  
ACCTTCTTCCAGGACATACTGGTGTAGGATATCAAAAATGCAATTGGCGTCTCATCGGAGGACTTGAATGGAATGAT  
AACACAGTTCGAGTCACTGAAACTATACAGAGATTCGCTTGGAGAAGCAGTGATGAGGATGGGAGACTTCCACTCCCTC  
CAAATCAGAAACGGAAAATGGCGAGAACAATTGAGTCAGAAAGTTTGAAGAAATAAGGTGGCTGATTGAAGAAGTAAG  
ACATAGATTGAAAATTACAGAAAACAGCTTCAACAGATAACGTTTATGCAAGCCTTACAACACTACTGCTTGAAGTGGAG  
CAAGAGATAAGAGCCTTCTGTTTCAGCTTATTTAATGATAAAAAACACCTTGTCTACTAATAACCCGGCGGCCCAA  
AATGCCGACTCGG

### A/chicken/Indonesia/R132/2006 (H5N1)

#### PB2

AGGGAACCTGGTCCGCAAAACCAGATTCTACCGGTAGCAGGCGGAACAAGCAGTGTGTACATTGAGGTATTGCATTTG  
ACTCAAGGGACCTGCTGGGAACAGATGTACTCCAGGCGGAGAAGTGAGAAACGACGATGTTGATCAGAGTTTGATC  
ATCGCTGCCAGAAAACATTGTTAGGAGAGCAACGGTATCAGCGGATCCACTGGCATCACTGCTGAAAATGTGTACAGCA  
CACGAATTGGTGGGACAAGGATGGTGGACATCCTTAGGCAAAAATCCAACCTGAGGAACAAGCTGTGGATATATGCAAAG  
CAGCAATGGGTCTGAGAATCAGTTCATCCTTTAGCTTTGGAGGCTTCACTTTCAAAGAACAAGTGGATCATCCGTCACG  
AAGGAAGAGGAAGTGCTTACAGGCAACCTCCAACATTGAAAATAAGAGTACATGAGGGGTATGAGGAATTCACAATG  
GTTGGGCGGAGGGCAACAGCTATCCTGAGGAAAGCAACTAGAAGGCTGATTGATTGATAGTAAGTGAAGAGACGA  
ACAATCAATCGCTGAGGCAATCATTGTAGCAATGGTGTCTCACAGGAGGATTGCATGATAAAGGCAGTCCGAGGCGA  
TCTGAATTTGTAACAGAGCAAACCAAGGTTAAACCCCATGCATCAACTCCTGAGACATTTTCAAAGGACGCAAAA  
GTGCTATTTGAGAATGGGGAATTGAACCCATTGATAATGTGCATGGGGATGATCGGAATATTACCTGACATGACTCCCA  
GCACAGAAATGTCACTGAGAGGAGTAAGAGTTAGTAAAATGGGAGTGGATGAATATTCCAGCACTGAGAGAGTAGTT  
GTGAGTATTGACCGTTTCTTAAGGGTTCGAGATCAGCGGGGGAACGTAATCTTATCTCCGAAAGAGGTGAGCGAAACCC  
AGGGAACAGAGAAATTGACAATAACATATTCATCATCAATGATGTGGGAAATCAACGGTCTGAGTCACTGCTTGTAA  
CACCTATCAATGGATCATCAGAAACTGGGAAACTGTGAAGATTCAATGGTCTCAAGACCCACGATACTGTACAATAAG  
ATGGAGTTTGAACCGTTCCAATCCTTGGTACCTAAAGCTGCCAGAGGCCAATACAGTGGATTTGTGAGAACATTATTCCA  
ACAAATGCGTGACGTAAGGACATTTGATACTGTCCAGATAATAAAGCTGCTACCATTTGCAGCAGCCCCACGGGAG  
CAGAGCAGAATGCAGTTTTCTCTAACTGTGAATGTGAGAGGCTCTGGAATGAGAATACTCGTAAGGGGCAATTCCC  
CTGTGTTCAACTACAATAAGGCAACCAAAAGGCTTACCGTTCTTGGAAAGGACGCAGGTGCATTAACAGAGGACCCAG  
ATGAGGGGACAGCCGGAGTGAATCTGCAGTACTGAGGGGATTCTAATTTTAGGCAAGGAGGACAAAAGGTATGGA  
CCAGCATTGAGCATCAATGAACTGAGCAATCTTGCAGAAAGGGGAGAAAGCAAATGACTGATAGGGCAAGGAGATGT  
GGTGTGGTAATGAAACGGAAACGGGACTCTAGCATACTTACTGACAGCCAGACAGCGACCAAAAGAATTCGGATGGC  
CATCAATTAG

## Sequenzdaten der untersuchten H5N1-Isolate

### PB1

ATGGATGTCAATCCGACTTTACTTTTCTTGAAAGTACCAGTGC AAAATGCTATAAGTACCACATTCCTTATACTGGAGAC  
CCTCCATACAGCCATGGAACAGGGACAGGATACACCATGGACACAGTCAACAGAACACACCAATATTCAGAAAAGGGG  
AAGTGGACAACAAACACAGAGACTGGAGCACCCCACTCAACCCGATTGATGGACCTACCTGAGGATAATGAGCCC  
AGTGGGTATGCACAAACAGATTGTGTATTGGAAGCAATGGCTTTCCTTGAAGAATCCCACCCAGGGATCTTTGAAAAC  
CGTGTCTTGAAACGATGGAAATTGTTCAACAAACAAGAGTGGATAAACTGACCCAAGGTCGCCAGACTTATGACTGGAC  
ATTGAATAGAAACCAACCGGCTGCAACTGCTTTGGCCAACACTATAGAAATCTTCAGATCGAACGGTCTAACAGCCAAT  
GAATCGGGACGGCTAATAGATTTCTCAAGGATGTGATGGAATCAATGGATAAGGAAGAAATGGAGATAACAACACAT  
TTCCAGAGAAAGAGAAGAGTGGAGGACAACATGACCAAGAAAATGGTCACACAAAAGAACAAATAGGGAAGAAAAACA  
AAGGCTGAACAAAAGGAGCTACCTGATAAGAGCACTGACACTGAACACAATGACAAAAGATGCAGAAAGAGGCAAAT  
TGAAGAGGGCAGCAATTGCAACACCCGGAATGCAAATCAGAGGATTCGTGTACTTTGTTGAAACACTAGCGAGGAGTA  
TCTGTGAGAACTTGAGCAATCTGGACTCCCAGTCGGAGGGAATGAGAAGAAGGCTAAATTGGCAAACGTCGTGAGGA  
AGATGATGACTAACTCAAGATACTGAACTCTCCTTACAATTACTGGGGACAATACCAAATGGAATGAGAATCAGAA  
TCCTAGGATGTTTCTGGCAATGATAACGTACATCACAAGGAACCGCCAGAATGGTTTCGAAATGTCTTAAGCATTGCC  
CTATAATGTTCTCAAACAAGATGGCGAGATTAGGGAAAAGGATACATGTTTCGAAAGTAAGAGCATGAAGTTACGAACAC  
AAATACCAGCAGAAATGCTTGCAACATTGATCTTAAATACTTCAATGAATTAACGAAAAAGAAAATTGAGAAAATAAG  
ACCTCTATTAATAGATGGTGCAGCCTCATTGAGCCCTGGAATGATGATGGGCATGTTCAACATGCTGAGTACAGTCTTA  
GGAGTCTCAATCTGAATCTTGGACAGAAAAGGTACACAAAACCATATTGGTGGGACGGACTCCAATCCTCTGATG  
ATTCGCTCTCATCGTAAATGCACCGAATCATGAGGGAATACAAGCAGGAGTGGATAGGTTTTATAGGACTTGTAAC  
AGTTGGAATCAATATGAGCAAGAAGAAGTCTTACATAAATCGGACAGGGACATTTGAATTCACGAGCTTTTTCTACCGC  
TATGGATTTGTAGCAATTCAGTATGGAGCTGCCAGTTTTGGAGTGTCTGGAATTAATGAATCGGCCGACATGAGCA  
TTGGTGTACAGTGATAAAGAACAATATGATAAAACAACGACCTTGGGCCAGCAACAGCTCAGATGGCTCTTCAGCTATT  
CATCAAGGACTACAGATACACATACCGATGCCACAGAGGGGATACGCAAATCCAAACGAGGAGATCATTGAGCTGAA  
GAAGCTGTGGGAGCAAACCCATTCAAAGGCAGGACTGTTGTTTTAGATGGAGGACCAAATCTATACAATATCCGAAA  
TCTCCACATTCTGAGGTCTGCTTGAATGGGAATTGATGGATGAAGATTACCAGGGCAGACTGTGTAATCCTCTGAAT  
CCGTTCTCAGCCATAAGGAAATTGAATCTGTCAACAATGCTGTAGTAATGCCAGCTCATGGCCCGCCAAGAGTATGG  
AATATGATGCCGTTGCAACCACACATTCATGGATTCTAAAAGGAATCGTTCCATTCTCAATACGAATCAAAGGGGAATT  
CTTGAGGATGAACAGATGTACCAGAAGTGTGCAATCTATTGAGAAATTTCTCCAGCAGTTCATATCGGAGGCCAG  
TTGGAATTTCCAGCATGGTGGAGGCCATGGTGTCTAGGGCCGAATTGACGCACGAATTGATTTGAGTCTGGAAGGA  
TTAAGAAAGAAGAGTTTCTGAGATCATGAAGATCTGTTCCACCATTGAAGAGCTCAGACGGCAAAAATAGTGAATTA  
GCTTGTCTTTCTGAAAAAATGCCTTGTCTACTAATAAC

### PA

TTTGTGCGACAATGCTTCAATCCAATGATTGTCGAGCTTGC GGGAAAAGGCAATGAAAGAATATGGGGAAGATCCGAAA  
ATCGAAACGAACAAATTTGCTGCAATATGCACACACTTGGAGGTCTGCTTCATGTATTCGGACTTTCACCTTTATTGATGA  
ACGGAGTGAATCAATAATTGTAGAATCTGGAGATCCGAATGCATTATTGAAACACCGATTTGAAATAATTGAAGGAAGA  
GACCGAACGATGGCCTGGACTGTGGTGAATAGTATTTGCAACACCACCGGAGTCGAGAAACCCAAATTTCTCCAGATT  
TGTATGACTACAAAGAGAACCATTGTTGAAATTTGGAGTGACACGGAGGGAAGTTCATACATACTATCTGGAGAAAAG  
CCAACAAGATAAAATCCGAGAAGACACACATTCACATATTCTCATTACAGGGGAGGAAATGGCCACCAAAGCGGACTA  
CACCTTGATGAAGAGAGCAGGGCAAGAATTAACCAGGCTGTTACCATAAGACAGGAAATGGCCAGTAGGGGTCT  
ATGGGATTCCTTTCTGCAATCCGAGAGAGGGCAAGAGACAATTGAAGAAAAATTTGAAATCACTGGAACCATGCGCAG  
ACTTGCCGACCAAAGTCTCCACCGAACTTCTCCAGCCTTGAAAACCTTAGAGCCTATGTGGATGGATTGCAACCGAACG  
GCTGCATTGAGGGCAAGCTTTCTCAAATGTCAAAGAAGTGAATGCTAGAATTGAGCCATTTTTGAAAGACAACGCCACG  
CCCTCTCAGATTACCTGATGGGCCTCTTGCTCTCAGCGGTGCAAGTTCTTGCTGATGGATGCTCTTAAATTAAGCATCG  
AAGACCCGAGTCATGAGGGGGAGGGGATACCACTATACGATGCAATCAAATGCATGAAGACATTTTTGCGTTGGAAGG  
AGCCCAACATCGTGAACACATGAAAAAGGTATAAACCCCAATTACCTCTGGCTTGGAAGCAAGTGTGGCAGAACT  
CCAAGATATCGAAAATGAGGAGAAAATCCAAAAACAAGAACATGAAAAAAAACAAGCCAGTTGAAGTGGGCACTCG  
GTGAGAACATGGCACCAGAGAAAGTAGACTTTGAGGACTGCAAAGATGTTAGCGATCTAAAACAGTATGACAGTGATG  
AACCAGAGTCTAGATCACTAGCAAGCTGGATTGAGAGTGAATTAACAAGGCATGTGAATTAACAGATTGAGTTGGAT  
TGAACCTGATGAAATAGGAGAGGACGTTGCTCCAATTGAGCACATTGCAAGTATGAGAAGGAACTATTTTACAGCGGA  
AGTATCCCATTGACAGAGCCACTGAATACATAATGAAGGGAGTGTACATAAACACAGCTATGTTGAATGCATCCTGTGCA  
GCCATGGATGACTTTCAACTGATTCCAATGATAAGCAAATGCAGAACAAAAGGAAGGACGGAAAACTAATCTGTATG  
GATTCATTATAAAGGGAAGATCCCACTTGAGRAATGATACCGATGTGGTAAATTATGTGAGTATGGaATTCTCTTACT  
GACCAAGGCTGGAGCCACACAAGTGGGAAAAGTACTGTCTCGAGATAGGAGACATGCTCCTCCGACTGCAATA  
GGTCAAGTTTTCAAGGCCATGTTCTGTATGTGAGAACCAACGGAACCTCCAAGATCAAATGAAATGGGGCATGGAA  
ATGAGGCGATGCCTTCTTCAATCCCTCAACAAATTGAAAGCATGATTGAAGCCGAGTCTTGTCAAAGAGAAGGACA

## Sequenzdaten der untersuchten H5N1-Isolate

---

TGACCAAAGAATTCTTTGAAAACAAATCAGAAACATGGCCGATTGGAGAGTCCCCAAAGGAGTGGAGGAAGGCTCCA  
TCGGAAAGGTGTGCAGAACCTTGCTGGCGAAGTCTGTGTTCAACAGTTTGTATGCATCTTCACAACCTCGAGGGGTTTT  
AGCTGAATCAAGAAAATTGCTTCTCATTGCTCAGGCACTTAGGGACAACCTGGAACCTGGGACCTTCGATCTTGAGGG  
CTATATGAAGCAATTGAGGAGTGCCTGATTAACGATCCCTGGGTTTTGCTTAATGCGTCTGGTTCAACTCCTCCTCGCA  
CATGCACTGAAATAGTTGTGGCAATGCTACTATTGCTATCCATACTGTCCAAAAAAGTACCTTGTCTACTAATAA

### HA

ATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGAATAGTCAGTCTTGTTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTACCATGCAAAACA  
TTCAACAGAGCAGGTTGACACAATAATGGAAAAGAACGTTACTGTTACACATGCCAAGACATACTGGAAAAGACACAC  
AACGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTAATTTTAAGAGATTGTAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGG  
AACCCAATGTGTGACGAATTCATCAATGTACCGAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAGCCAATGACCTCT  
GTTACCAGGGAATTTCAACGACTATGAAGAAGTAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCATTTTGAGAAAATTCAGAT  
CATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCGATCATGAAGCCTCATCGGGGTGAGCTCAGCATGTCCATACCTGGGAAAAGTCTCCT  
TTTTTAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAAGTGCATACCCAACAATAAGAGAAAGCTACAATAATACCAACCA  
AGAAGATCTTTTGGTACTGTGGGGGATTACCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAAGGCTATATCAAAACCCAACC  
ACCTATATTTCCGTTGGGACATCAACACTAAACCAGAGATTGGTACCAAAAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGC  
AAAGTGAAGGATGGAGTCTTCTGGACAATTTTAAAATCGAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTAATGGAAATTCAT  
TGCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTCAAGAAAGGGGACTCAGCAATTATGAAAAGTGAATTGGAATATGGTAACTGC  
AACACCAAGTGTCAAACCTCAATGGGGGCGATAAACTCTAGTATGCCATTCCACAACATACACCCTCTCACCATCGGGG  
AATGCCCAAAATATGTGAAATCAAACAGATTAGTCTTGCAGTGGGCTCAGAAAATAGCCCTCAAAGAGAGAGAAGAA  
GAAAAAGAGAGGACTATTTGGAGCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTAT  
GGGTACCACCATAGCAATGAGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAAATCCACTCAAAGGCAATAGATGGAGT  
CACCAATAAGGTCAACTCGATCATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGGGCGGTTGGAAGGGAATTAATAACTTAGAA  
AGGAGAATAGAGAATTTAAACAAGAAGATGGAAGACGGATTCTAGATGTCTGGACTTATAATGCTGAACTTCTGGTTC  
TCATGGAAAATGAGAGAACTCTAGACTTTTCTGACTCAAATGTTAAGAACCTCTACGACAAGGTCCGACTACAGCTTAG  
GGATAATGCAAAGGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCACAATGTGATAATGAATGTATGGAAAAGTATAAG  
AAACGGAACGTATAACTACCCGAGTATTGAGAAGAAGCAAGATTAAGAAAGAGAGGAAATAAGTGGAGTAAATTTGG  
AATCAATAGGAACTTACCAAATACTGTCAATTTATTCAACAGTGGCGAGTTCCTAGCACTGGCAATCATGATGGCTGGT  
CTATCTTTATGGATGTCTCCAATGGATCGTTACAATGCAGAAATTTGCATTTAA

### NA

CCAAATCAGAAGATAATAACCATTGGATCAATCTGTATGGTAATTGGAATAGTTAGCTTAATGTTACAAATTGGGAACAT  
GATCTCAATATGGGTCAGTCAATTCAGACAGGGAATCAACACCAAGCTGAATCAATCAGCAATACTAACCCCTCTTA  
CTGAGAAAAGCTGTGGCTTCAGTAACATTAGCGGGCAATTCATCTCTTTGCCCATAGAGGATGGGCTGTACACAGTAA  
GGACAACAGTATAAGGATCGGTTCCAAGGGGGATGTGTTGTTATTAGAGAGCCGTTTCTCATGCTCCCACTTGGAA  
TGCAGAACTTTCTTTTGAATCAGGGAGCCTTGTGAATGACAAGCACTCCAACGGGACTGTCAAAGACAGAAGCCCTC  
ACAGAACATTGATGAGTTGCTGTGGGTGAGGCTCCCTCCCATACAACCTCAAGGTTTGAATCTGTTGCTTGGTCAGCA  
AGCGCTTGCCATGATGGCACCAGTTGGTTGACAATTGGAATTTCTGGCCAGACAATGGGGCTGTGGCTGTATTGAAAT  
ACAATGGCATAATAACAGACACTATCAAGAGTTGGAGGAACAACATACTGAGAACTCAAGAGTCTGAATGTGCATGTG  
TAAATGGCTCTTGTCTTACTGTAATGACTGATGGACCAAGTAATGGGCAGGCATCATATAAGATCTTCAAATGGAAAA  
AGGGAAAGTGGTAAATCAGTCAATTTGGATGCTCCTAATTAATCACTATGAGGAGTGTCTCTGTTATCCTGATGCCGGC  
GAAATCACATGTGTGTGCAGGGATAATTGGCATGGCTCAAATAGGCCATGGGTATCTTTCAATCAAATTTGGAGTATC  
AAATAGGATATATGCAAGTGGAGTTTTCGGAGACAATCCACGCCCAATGATGGAACAGGTAGTTGTGGTCCGATGTC  
CCCTAACGGGGCATATGGGGTAAAAGGGTTTTCAATTAATACGGCAATGGTGTGGATCGGAAGAACCAAAAGCAC  
TAATTCAGGAGCGGCTTTGAAATGATTTGGGATCAAATGGGTGGACTGGAACGGACAGTAGCTTTTCGGTGAACA  
AGATATAGTAGCAATAACTGATTGGTCAGGATATAGCGGGAGTTTTGTCCAGCATCCAGAACTGACAGGATTAGATTGC  
ATAAGACCTTGTCTGGGTTGAGTTAATCAGAGGGCGGCCAAAGAGAGCAATTTGGACTAGTGGGAGCAGCATA  
TCTTTTTGTGGTGTAAATAGTGACACTGTGAGTTGGTCTTGGCCAGACGGTGTGAGTTGCCATTACCAATTGACAAGTA  
G

### M

ATGAGTCTTCTAACCAGGTCGAAAACGTACGTTCTCTATCATCCCCTCAGGCCCCCTCAAAGCCGAGATCGCGCAGAA  
ACTTGAAGATGTCTTTGCAAGAAAGAACCCGATCTCGAGGCTCTCATGGAGTGGCTAAAGACAAGACCAATCCTGTCA  
CCTCTGACTAAAGGGATTTTGGGATTTGATTACGCTCACCGTGCCAGTGAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGCTTTG  
TCCAGAATGCCCTAAATGGAAATGGAGATCCAAATAATATGGATAGGGCAGTTAAGCTATATAAGAAGCTGAAAAGAG

### XX

## Sequenzdaten der untersuchten H5N1-Isolate

---

AAATAACATTCCATGGGGCTAAGGAGGTGCGACTCAGCTACTCAACCGGTGCACTTGCCAGTTGCATGGGTCTTATATA  
CAACAGGATGGGAACGGTGACTACGGAAGTGGCTTTTGGCCTAGTGTGTGCCACTTGTGAGCAGATTGCAGATTCACA  
GCATCGGTCTCACAGGCAGATGGCAACTATCACCAACCCACTAATCAGGCATGAAAACAGAATGGTGCTGGCCAGCACT  
ACAGCTAAGGCTATGGAGCAGATGGCGGGATCAAGTGAGCAGGCAGCGGAAGCCATGGAGGTGCGTAATCAGGCTAG  
GCAGATGGTGCAGGCAATGAGGACAATTGGGACTCATCTAACTCTAGTGCTGGTCTGAGAGATAATCTTCTTAAAAAT  
TTGCAGGCCTACCAGAAACGAATGGGAGTGCAGATGCAGCGATTCAAGTGATCCTCTTGTGTTGCCGCAAGTATCATT  
GGGATCTTGCCTTGATATTGTGGATTCTTGATCGTCTTTCTTCAAATGCATTTATCGTCGCCTTAAATACGGTTTAAAA  
AGAGGGCCTTCTACGGCAGGGGTACCTGAGTCTATGAGGGAAGAATACCGGCAGGAACAGCAGAGTGCTGTGGATGT  
TGACGATGGTCATTTTGTCAACATAGAATGG

### NS

ATGGATTCCAACACTGTGTTAAGCTTTTCCAGGTAGACTGCTTTCTTGGCATGTCCGCAAACGATTTGCAGACCAAGA  
GGGTGATGCCCATTTCTTGACCGGCTTCGCCGAGATCAGAAGTCCCTAAGAGGAAGAGGCAACACTCTTGGTCTGGAC  
ATCGAGACAGCTACTCGTGCGGGAAAGCAAATAGTGGAGCGGATTCTGGAGGAGGAGTCTGATGAGGCACTTAAAAAT  
GCCGGCTTACGCTACCTAACTGACATGACTCTCGAAGAAATGTCAAGGGACTGGTTCATGCTCATGCCAAGCAGAAA  
GTGGCAGGTTCCCTTTGCATCAAAAATGGACCAGGCAATAATGGATAAAAACCGTCATATTGAAAGCAAACCTCAGTGTGA  
TTTTTGACCGGTTGGAAACCCTAATACTACTTAGAGCTTTTACAGAAGAAGGAGCAATCGTAGGAGAAAATCTCACCATTA  
CCTTCTCTTCCAGGACATACTGGTGGAGATGTCAAAAATGCAATTGGCGTCTCATCGGAGGACTTGAATGGAATGATA  
ACACAGTTCGAGTCTCTGAAACTATACAGAGATTCGCTTGGAGAAGCAGTAATGAGGATGGGAGACTTCCATTCCCTCC  
AAATCAGAAACGGAAAATGGCGAGAACAATTGGGTGAGAAGTTGAAGAAATAAGGTGGCTGATTGAAGAAGTACGA  
CATAGATTGAAAATTACAGAAAACAGCTTCGAACAGATAACATTTATGCAAGCCTTACAACACTACTGCTTGAAGTGGAGC  
AAGAGATAAGAGCCTTCTCGTTTCAGTTTATTTAATGATAAA

### A/duck/Vietnam/TG24-01/2004 (H5N1)

#### PB2

AGGGAACTGGTCCGCAAAACCAGATTCCTACCGGTAGCAGGCGGAACAAGCAGTGTGTACATTGAGGTATTGCATTTG  
ACTCAAGGGACCTGCTGGGAACAGATGTACTCCAGGCGGAGAAGTGAGAAATGACGATGTTGACCAGAGTTTGATC  
ATCGCTGCCAGAAACATTGTTAGGAGAGCAACGGTATCAGCGGATCCACTGGCATCACTGCTGGAGATGTGTACAGC  
ACACAAATTGGTGGGATAAGGATGGTGGACATCCTTAGGCAAAATCCAACCTGAGGAACAAGCTGTGGATATATGCAAA  
GCAGCAATGGGTCTGAGGATCAGTTCTTCTTTAGCTTTGGAGGCTTCACTTTCAAAGAACAAGTGGATCATCCGTC  
GAAGGAAGAGGAAGTGCTTACAGGCAACCTCAAACATTGAAAATAAGAGTACATGAGGGGTATGAGGAATTCACAA  
GGTTGGGAGGAGGGCAACAGCTATCCTGAGGAAAGCAACTAGAAGGCTGATTGATTGATAGTAAGCGGAAGAGACG  
AACAATCAATCGTCTGAGGCAATCATTGTAGCAATGGTGTCTCACAGGAGGATTGCATGATAAAGGCAGTCCGAGGCG  
ATCTGAATTTGTAACAGAGCAAACCAAGATTAACCCCATGCATCAACTCCTGAGACATTTTCAAAGGATGCAAAA  
GTGCTATTTGAGAATTGGGGAATTGAACCCATTGATAATGTATGATGGGGATGATAGGAATATTACCTGACATGACTCCTA  
GCACAGAAATGTACTGAGAGGAGTAAGAGTTAGTAAAATGGGAGTGGATGAATATTCCAGCACTGAGAGAGTAGTT  
GTAAGTATTGACCGTTTCTAAGGGTTCGAGATCAGCGGGGAACGTAATCTTATCTCCGAAGAGGTCAGCGAAACCC  
AGGGAACAGAGAAATTGACAATAACATATTATCATCGATGATGTGGGAAATCAACGGTCTGAGTCACTGCTTGTAA  
CACTTATCAGTGGATCATCAGAAACTGGGAGACTGTGAAGATTCAATGGTCTCAAGACCCACGATGCTGTACAATAAG  
ATGGAGTTTGAACCGTTCCAATCCTTGGTACCCAAAGCTGCCAGAGGTCAATACAGTGGATTTGTGAGAACATTATTCCA  
ACAAATGCGTGACGTAATGAGGACATTTGATACTGTTTCAAGATAATAAGCTGCTACCATTTGAGCAGCCCCACCGGAG  
CAGAGCAGAATGCAGTTTTCTTCTAACTGTGAATGTGAGAGGCTCAGGAATGAGAATACTCGTAAGGGGCAATTCCC  
CTGCGTTCAACTACAATAAGGCAACCAAAAGGCTTACCGTTCTTGGAAAGGACGCAGGTGCATTAACAGAGGATCCAG  
ATGAGGGGACAGCCGGAGTGAATCTGCAGTACTGAGGGGATTCTAATTCTAGGCAAGGAGGACAAAAGGTATGGA  
CCAGCATTGAGCATCAATGAACTGAGCAATCTTACGAAGGGGGAGAAAGCTAATGTGCTGATAGGGCAAGGAGACGT  
GGTGTGGTAATGAAACGAAAACGGGACTCTAGCATACTTACTGACAGCCAGACAGCGACCAAAAGGATTCCGATGGC  
CATCAATTAG

#### PB1

ATGGATGTCAATCCGACTTTACTTTTCTTAAAAGTACCAGTGCAAAATGCTATAAGTACCACATTCCCTTATACGGGAGA  
CCCTCCATACAGCCATGGAACAGGGACAGGATACACCATGGACACAGTCAACAGAACACACCAATATTCAGAAAAGGG  
GAAGTGGACAACAAACACAGAGACTGGAGCACCCCAACTCAACCGATTGATGGACCACTACTGAGGATAATGAGCC  
CAGTGGGTATGCACAAACAGATTGTGTATTGGAAGCAATGGCTTTCTTGAAGAATCCCACCCAGGGATCTTTGAAAAC  
TCGTGTCTTGAACGATGGAATTTGTTGAGCAAAACAGAGTGGATAAACTGACCAAGGTGCCAGACCTATGACTGGA

## Sequenzdaten der untersuchten H5N1-Isolate

---

CATTGAATAGGAACCAACCGGCTGCAACTGCTTTGGCCAACACTATAGAAATCTTCAGATCGAACGGTCTAACAGCCAA  
TGAATCGGGACGGCTAATAGATTTCTCAAGGATGTGATGGAATCAATGGATAAGGAAGAAATGGAGATAACAACACA  
TTCCAGAGAAAGAGAAGGGTGAGGGACAACATGACCAAAAAATGGTCACACAAAGAACAATAGGGAAGAAAAAC  
AAAGGCTGAACAAAAGAGTACCTGATAAGAGCACTGACACTGAACACAATGACAAAAGATGCAGAAAGAGGCAAA  
TTGAAGAGGCGAGCGATTGCAACACCCGGAATGCAAATCAGAGGATTCGTGTACTTTGTTGAAACTAGCGAGGAGT  
ATCTGTGAGAACTTGAGCAATCTGGACTCCCAGTCGGAGGGAATGAGAAGAAGGCTAAATTGGCAAACGTAGTGAG  
GAAGATGATGACTAACTACAAGATACTGAACTCTCCTTTACAATTACTGGAGACAATACCAAATGGAATGAGAATCAG  
AATCCTAGGATGTTTCTGGCAATGATAACGTACATACAAGGAACCAGCCAGAATGGTTTCGGAATGTCTTAAGCATTG  
CCCCTATAATGTTCTCAACAAAATGGCGAGACTAGGAAAAGGATACATGTTTCGAAAGTAAGAGCATGAAGTTACGAAC  
ACAAATACCAGCAGAAATGCTTGCAACCATTGATCTTAAATACTTCAATGAATTAACGAAAAAGAAAATTGAGAAAATA  
AGGCCTCTATTAATAGATGGTACAGCCTCATTGAGCCCTGGAATGATGATGGGCATGTTCAACATGCTGAGTACAGTCC  
TAGGAGTCTCAATCCTGAATCTTGACAGAAAAGGTACACCAAAACCACATATTGGTGGGACGGACTCCAATCCTCTGA  
TGATTTGCTCTCATCGTAAATGCACCGAATCATGAGGGAATACAAGCAGGAGTGGATAGGTTTTATAGGACTTGTA  
CTAGTTGGGATCAATATGAGCAAGAAGAAGTCTTACATAAATCGGACAGGGACATTTGAATTCACGAGTTTTTTCTACC  
GCTATGGATTTGTAGCCAATTTAGTATGGAGCTGCCAGTTTTGGAGTGTCTGGAATTAATGAATCGGCCGACATGAG  
CATTGGTGTACGGTGATAAAAAACAATATGATAAACAACGACCTTGGGCCAGCAACAGCTCAGATGGCTCTTCAGTTA  
TTCATCAAGGACTACAGATACACATACCGATGCCACAGAGGGGATACGCAAATCCAAACAAGGAGATCATTGAGCTG  
AAGAAGCTGTGGGAGCAAACCCGTTCAAAGGCAGGACTGTTGGTTTCAGATGGAGGACCAAATCTATACAATATCCGA  
AATCTCCATATTCCTGAAGTCTGCTTAAATGGGAATTGATGGATGAAGATTACCAGGGCAGACTGTGTAATCCTCTGAA  
TCCATTGCTCAGCCATAAGGAAATTGAATCTATTAACAATGCTGTAGTAATGCCAGCTCATGGTCCGGCCAAGAGTACG  
GAATATGATGCCGTTGCAACTACACATTCATGGATTCTAAAAGGAACCGTCCATTCTCAATACGAGTCAAAGGGGAA  
TTCTTGAGGATGAACAGATGTACCAGAAGTGTGCAACCTATTTCGAGAAATTCTCCCAGCAGTTCATATCGGAGGCC  
AGTTGGAATTTCCAGCATGGTGGAGGCCATGGTGTCCAGGGCCGAATTGATGCACGAATTGATTTTCGAGTCTGGAAG  
GATTAAGAAAGAAGAGTTTGCCGAGATCATGAAGATCTGTTCCACCATTGAAGAACTCAGACGGCAAAAATAGTGAATT  
TAGCTTGTCTTTCTGTGAAAAATGCCTTGTTTCTACTAATAAC

### PA

TTTGTGCGACAATGCTTCAATCCAATGATTGTGCAACTGCGGAAAAGGCAATGAAAGAATATGGGGAAGATCCGAAA  
ATCGAAACGAACAAGTTTGTGCAATATGCACACACTTGGAGGTCTGTTTCATGTATTCCGATTTTCACTTTATTGATGA  
ACGGAGTGAATCAATAATTGTAGAATCTGGAGATCCGAATGCATTATTGAAACACCGATTTGAAATAATTGAAGGAAGA  
GACCGAACGATGGCCTGGACTGTGGTGAATAGTATCTGCAACACCACAGGAGTTGAGAAACCTAAATTTCTCCAGATT  
TGTATGACTACAAAGAGAACCGATTTCATCGAAATTGGAGTGACACGGAGGGAAGTTCATACATACTATCTGGAKAAAGC  
CAACAAGATAAAATCCGAGAAGACACATATTCATATATTCTCATTACAGGGGAGGAAATGGCCACCAAAGCGGACTAC  
ACCTTGATGAAGAGAGCAGGGCAAGAATTAACCCAGGCTGTTACCATAAGGCAGGAAATGGCCAGTAGGGGTCTA  
TGGGATTCCTTTCTCAATCCGAGAGAGGCGAAGAGACAATTGAAGAGAAATTTGAAATCACTGGAACCATGCGCAGA  
CTTGACAGCAAAGTCTCCACCGAACTTCTCCAGCCTTAAAACCTTAGAGCCTATGTGGATGGATTGCAACCGAACGG  
CTGCATTGAGGGCAAGCTTTCTCAAATGTCAAAGAAGTGAATGCTAGAATTGAGCCATTTTGAAGACAACGCCACGC  
CCTCTCAGACTACCTGATGGGCTCCTGTCTCAGCGTCTGAAGTCTTGTGATGGATGCCCTTAAATTAAGCATCGA  
AGACCCGAGTTCATGAGGGGGAGGGGATACCACTATACGATGCAATCAAATGCATGAAGACATTTTTCGGCTGGAAAAG  
GCCAACATCGTGAAACCACATGAAAAAGGTATAAACCCCAATTACCTCCTGGCTTGGAAAGCAAGTGTGGCAGAACTC  
CAAGATATTGAAATGAGGAGAAAATCCCAAAAACAAGAACATGAAAAAACAAGCCAGTTGAAGTGGGCACTAGG  
TGAGAACATGGCACCAGAGAAAATAGACTTTGAGGACTGCAAAGATGTTAGCGATCTAAGACAGTATGACAGTGTGA  
ACCAGAGTCTAGATCACTAGCAAGCTGGATTGAGAGTGAATTCACAAGGCATGTGAATTGACAGATTGAGATTGGATT  
GAACTTGACGAAATAGGAGAAGACGTAGCTCCAATTGAGCACATTGCAAGTATGAGAAGGAACTATTTTACAGCGGAA  
GTATCCCATGACAGGGCCACTGAGTACATAATGAAGGGAGTGTACATAAACACAGCCCTGTTGAATGCATCCTGTGCAG  
CCATGGATGACTTTCAACTGATTCCAATGATAAGCAAATGCAGAACCAAAGAAGGAAGACGGAAAATAATCTGTATGG  
ATTCATTATAAAAGGGAGATCCCACTTGAGGAATGATACCGATGTGGTAAATTTTGTGAGTATGGAATCTCTTACTG  
ATCCGAGACTGGAGCCACACAAGTGGGAAAAGTACTGTGTCTCGAGATAGGAGACATGCTCCTCCGGACTGCAGTAG  
GCCAAGTTTACGGCCATGTTCTGTATGTAAGAACCAATGGAACCTCCAAGATCAAAATGAAATGGGGCATGGAAT  
GAGGCGATGCCTTCTTCAATCCCTTCAACAAATTGAAAGCATGATTGAAGCCGAGTCTTCTGTCAAAGAGAAGGACATG  
ACCAAAGAATTTTGAATAAATCAGAAACATGGCCGATTGGAGAGTCCCCAAGGGAGTGGAGGAAGGCTCCATC  
GGAAAGGTGTGAGAACCCTGCTGGCGAAGTCTGTGTTCAACAGTTTATATGCATCTCCACAACCTCGAGGGGTTTTAG  
CTGAATCAAGAAAATTGCTTCTCATTGCTCAGGCACTTAGGGACAACCTGGAACCTGGGACCTTCGATCTTGAGGGCT  
ATATGAAGCAATTGAGGAGTGCCTGATTAACGATCCCTGGGTTTTGCTTAATGCGTCTTGGTTCAACTCCTCCTCGCAC  
ATGCACTGAAATAG

## Sequenzdaten der untersuchten H5N1-Isolate

### HA

ATGGAGAAAATAGTGCTTTTTCTTGCAATAGTCAGTCTTGTTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTACCATGCAAACAA  
CTCGACAGAGCAGGTTGACACAATAATGGAAAAGAACGTTACTGTTACACATGCCAAGACATACTGGAAAAGACACA  
CAACGGAAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCAATTTTGAGAGATTGTAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGA  
AACCAATGTGTGACGAATTCATCAATGTGCCGAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAGTCAATGATCTCT  
GTTACCCAGGGGATTTCAATGACTATGAAGAATTGAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCATTTTGAGAAAATTCAGAT  
CATCCCCAAAAGTTCTTGGCCAGTCATGAAGCCTCATTAGGGGTGAGCTCAGCATGTCCATACCAGGGAAACGTCCTCTCT  
TTTTCAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAACAGTACATACCCAACAATAAAGAGGGAGCTACAATAACACCAACCA  
AGAAGATCTTTTGGTACTGTGGGGGATTACCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAAAAGCTCTATCAAAACCCAACC  
ACCTATATTTCCGTTGGGACATCAACACTAAACCAGAGATTGGTACCAAGAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGC  
AAAGTGAAGGATGGAGTTCTTCTGGACAATTTAAAACCGAATGATGCAATCAATTTGAGAGTAATGGAAATTTTCAT  
TGCCCCAGAATATGCATACAAAATTTGCAAGAAAGGGGACTCAACAATTATGAAAAGTGAATTGGAATATGGTAACTGC  
AACACCAAGTGTCAAACACCAATGGGGGCGATAAATTTAGTATGCCATTCCACAATATACACCTCTCACCATCGGGG  
AATGCCCAAATATGTGAAATCAAACAGATTAGTCCTTGCAGTGGGCTCAGAAATAGCCCTCAAAGAGAGAGAAGAA  
AAAAGAGAGGATTTTGGAGCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAAATGGTAGATGGTTGGTATGGG  
TACCACATAGCAATGAGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAATCCACTCAAAGGCAATAGATGGAGTCACC  
AATAAGGTCAACTCGATCATTGACAAAATGAACACTCAGTTGAAAGCCGTTGGAAGGGAAATTTAACACTTAGAAAGGA  
GAATAGAGAATTTAAACAAGAAGATGGAAGACGGGTTCTAGATGTCTGGACTTATAATGCTGAACTTCTGGTTCTCAT  
GGAAAATGAGAGAATCTAGACTTTTCATGACTCAAATGTCAAGAACCTTTACGACAAGGTCCGACTACAGCTTAGGGAT  
AATGCAAAGGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCAAAATGTGATAATGAATGTATGGAAAGTGAAGAAAC  
GGACGTATGACTACCCGAGTATTCAGAAGAAGCAAACTAAAAGAGAGGAAATAAGTGGAGTAAAATTGGAATCA  
ATAGGAATTTACCAAATACTGTCAATTTATCCACAGTAGCGAGTTCCCTAGCACTGGCAATCATGGTAGCTGGTCTATC  
CTTATGGATGTGCTCCAATGGGTCGTTACAATGCAGAATATGCATTTAGATTTGTGAGTTCAGATTGTAGTT

### NA

CAGAAGATAATAACCATCGGATCAATCTGTATGGTAACTGGAATAGTTAGCTTAATGTTACAAATTGGGAACATGATCTC  
AATATGGGTGAGTCAATTCACACAGGGAATCAACACCAATCTGAACCAATCAGCAATACTAATTTTCTTACTGAGA  
AAGCTGTGGCTTCAAGAAAATTAGCGGGCAATTCATCTCTTGGCCCATTAACGGATGGGCTGTATACAGTAAGGACAA  
CAGTATAAGGATCGGTTCCAAGGGGGATGTGTTTGTATAAGAGAGCCGTTTCATCTCATGCTCCCACTTGGAAATGCAGA  
ACTTTCTTTTTGACTCAGGGAGCCTTGTGAATGACAAGCACTCCAATGGGACTGTCAAAGACAGAAGCCCTCACAGAA  
CATTAAATGAGTTGCTGTGGGTGAGGCTCCCTCCCATATAACTCAAGTTTGAGTCTGTGCTTGGTCAGCRAGTGCT  
TGCCATGATGGCACCAGTTGGTTGACAATTTGATTTCTGGCCAGACAATGGGGCTGTGGCTGTAGTGAAGTACAATG  
GCATAATAACAGACACTATCAAGAGTTGGAGGAACAACATACTGAGAATCAAGAGTCTGAGTGTGCATGTGTAATG  
GCTCTTGTCTTACTGTAATGACTGACGGACCAAGTAATGGTCAGGCATCACATAAGATCTTCAAATGGAAAAAGGGAA  
AGTGGTTAAATCAGTCGAATTTGGATGCTCCTAATTACTATGAGGAATGCTCCTGTTATCCTGATGCCGGCGAAATCA  
CATGTGTGTGCAGGGATAATTGGCATGGCTCAAATCGGCCATGGGTGTCTTCAATCAAATTTGGAGTATCAAATAGG  
ATATATATGCAGTGGAGTTTTCGGAGACAATCCACGCCCAATGATGGAACAGGTAGTTGTGGTCCGGTGTCTCTAAT  
GGGGCATATGGGGTAAAAGGTTTTTCATTTAAATACGGCAATGGTGTCTGGATCGGGAGAACAAAAGCACTAATTTCA  
GGAGCGCTTTGAAATGATTTGGGATCCAAATGGGTGGACTGAAACGGACAGTAGCTTTTCAAGTAAACAAGATATCG  
TAGCAATAACTGATTGGTCAGGATATAGCGGGAGTTTTGTCCAGCATCCAGAATGACAGGACTAGATTGCATAAGACC  
TTGTTTCTGGGTTGAGTTGATCAGAGGGCGGCCAAAGAGAGACAATTTGGACTAGTGGGAGCAGCATATCTTTTTGT  
GGTGAAATAGTGACACTGTGGGTTGGTCTTGGCCAGACGGTGTGAGTTGCCATTACCATTGACAAGTAG

### M

ATGAGTCTTCTAACAGAGGTCGAAACGTACGTTCTCTATCATCCCCTCAGGCCCCCTCAAAGCCGAGATCGCGCAGAA  
ACTTGAAGATGTCTTTCAGGAAAGAACACCGATCTCGAGGCTCTCATGGAGTGGCTAAAGACAAGACCAATCCTGTCA  
CCTCTGACTAAAGGGATTTTGGGATTTGATTACGCTCACCCTGCCAGTGAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGCTTTG  
TCCAGAATGCCCTAAATGGAAATGGAGATCCAAACAATATGGATAGGGCAGTGAAGCTATATAAGAAGCTGAAAAGAG  
AGATAACATCCATGGGGCTAAGGAGGTTGCACTCAGCTACTCAACTGGTGCATTGCCAGTTGCATGGGCTCATATA  
CAACAGGATGGGAACGGTACTACGGAAGTGGCTTTTGGCCTAGTGTGTGCCACTTGTGAGCAGATTGCAGATTCACA  
GCATCGGTCTCACAGACAGATGGCAACTATACCAACCCACTAATCAGACATGAGAACAGAATGGTGTGGCCAGCACT  
ACAGCTAAGGCTATGGAGCAGATGGCGGGATCAAGTGAAGCAGGCGGAAGCCATGGAAATCGCTAATCAGGCTAG  
GCAGATGGTGCAGGCAATGAGGACAATTTGGGACTCATCTAACTCTAGTGTGGTCTGAGAGATAATCTTCTGAAAAT  
TTGCAGGCCTACCAGAAACGAATGGGAGTGCAGATGCAGCGATTCAAGTATCCTATTGTTGTTGCCGCAAATATCATT  
GGGATCTTGCATTTGATATTGTGGATTCTTGATCGTCTTTTCTCAAATGCATTTATCGTCGCCTTAAATACGGTTTGAAA

## Sequenzdaten der untersuchten H5N1-Isolate

AGAGGGCCTGCTACGGCAGGGGTACCTGAGTCTATGAGGGAAGAGTACCGGCAGGAACAGCAGAGTGCTGTGGATGT  
TGACGATGGTCATTTGTCAACATAGAATGATAA

### NS

ATGGATTCCAACACTGTGTCAAGCTTTTCAGGTAGACTGCTTTCTTTGGCATGTCCGCAAACGATTTGCAGACCAAGA  
GGGTGATGCCCCATTCTTGACCGGCTTCGCCGAGATCAGAAAGTCCCTAAGAGGAAGAGGCAACACTTTGGTCTGGAC  
ATCGAAACAGCTACTCGCGCAGGAAAGCAAATAGTGGAGCGGATTCTGGAGGAGGAGTCTGATAAAGCACTTAAATG  
CCGGCTTACGCTACCTAACTGACATGACTCTCGAAGAAATGTCAAGGGACTGGTTCATGCTCATGCCAAGCAGAAAG  
TGGCAGGTTCCCTTTGCATCAAATGGACCAGGCAATAATGGATAAAACCATCATATTGAAAGCAAACCTCAGTGTGAT  
TTTTGACCGGTTGGAACCCTAATACTACTTAGAGCTTTACAGAAGAAGGAGCAATCGTGGGAGAAATCTCACCATTA  
CCTTCTCTCCAGGACATACTGATGAGGATGTCAAAAATGCAATTGGCGTCTCATCGGAGGACTTGAATGGAATGATA  
ACACAGTTCGAGTCACTGAACTATACAGAGATTGCTTGGAGAAGCAGTGTGAGGATGGGAGACTTCCACTCCCTCC  
AAATCAGAAACGGAAAATGGCGAGAACAATTGAGTCAGAAGTTTGAAGAAATAAGGTGGCTGATTGAAGAAGTAAGA  
CATAGATTGAAAATTACAGAAAACAGCTTCGAACAGATAACGTTTATGCAAGCCTTAACTACTGCTTGAAGTGGAGC  
AAGAGATAAGAGCCTTCTCGTTTCAGCTTATTTAATGATAAAAAACACCCTGTTTCTACTAATAACCCGGCGGCCAAA  
ATGCCGACTCGG

### A/Buzzard/Berlin/1/2006 (H5N1)

#### PB2

ATGGAGAGAATAAAGGAATTAAGAGATCTAATGTCACAGTCCCGCACTCGCGAGATACTAACAAAAACCACTGTGGAC  
CATATGGCCATAATCAAGAAATACACATCAGGAAGACAAGAGAAGAACCCTGCTCTCAGAATGAAATGGATGATGGCA  
ATGAAATATCCAATCACAGCGGACAAGAGAATAATAGAGATGATTCCTGAAAGGAATGAACAGGGACAGACACTCTGG  
AGCAAGACAAATGATGCTGGATCGGACAGGGTGTGGTGTCTCCCTAGCTGTAACCTGGTGAATAGGAATGGGCCG  
ACGACAAGTACAGTTTATTATCCAAAGTTTATAAAAACATACTTTGAGAAGTTGAAAGTTAAAACATGGAACCTTTG  
GTCCCGTTTATTCCGAAACCAAGTTAAAATACGCCCGGAGTTGATACAAATCCTGGCCATGCAGATCTCAGCGCTAAA  
GAAGCACAAGATGTCATCATGGAGGTCGTTTTCCCAAATGAAGTGGGAGCTAGAATATTGACTTCAGAGTCACAATTGA  
CAATAACGAAAGAGAAGAAAGAGAGCTCCAAGATTGTAAGATTGCTCCCTAATGGTTgCATaCATGTTGGAAaGGGA  
aCTGGTCCGCaAAACCAGATTCTACCAGTAGCAGGCGGAACAAGCAGTGTGTACATTGAGGTATTGCATTTGACTCAA  
GGAACCTGCTGGGAACAGATGTACTCCAGGCGGAGAAGTAAGAAATGACGATGTTGACCAGAGTTTGTATTGCT  
GCCAGAAACATTGTTAGGAGAGCAACGGTATCAGCGGATCCACTGGCATCACTGCTGGAGATGTGTACAGCACACAA  
ATTGGTGGGATAAGGATGGTGGACATCCTTAGGCAAAATCCAAGTGGGAACAAGCTGTGGATATATGCAAAGCAGCA  
ATGGGTCTGAGGATCAGTTCATCCTTTAGCTTTGGAGGCTTCACTTTCAAAGAACAAGTGGATCATCCGTCACGAAGG  
AAGAGGAAGTGCTTACAGGCAACCTCCAAACATTGAAAATAAGAGTACATGAGGGGTATGAGGAATTCACAATGGTTG  
GGCAGAGGGCAACAGCTATCCTGAGGAAAGCAACTAGAAGGCTGATTGAGTTGATAGTAAGTGGAAAGAAACGAACAA  
TCAATCGCTGAGGCAATCATTGTAGCAATGGTGTCTCACAGGAGGATTGCATGATAAAAGCAGTCCGAGGCGATCTGA  
ATTTCTGTAACAGAGCAAACCAAGATTAAACCCCATGCATCAACTCCTGAGACATTTTCAAAGGACGCAAAAGTGCT  
ATTTGAGAATTGGGGAACCTGAACCCATTGATAATGTATGGGATGATCGGAATATTACCTGACATGACTCCAGCACA  
GAAATGTCAGTACTGAGAGGAGTAAGAGTTAGTAAAGTGGGAGTAGATGAATATTCCAGCACTGAGAGAGTAGTTGTAAGC  
ATTGACCGCTTCTAAGGGTTTCGAGACCAGCGGGGAACGTAAGTCTTATCTCCGAAAGAGTTCAGCGAAACACAGGGA  
ACAGAGAAGTTGACAATAACATATTATCATCAATGATGTGGAAATCAACGGTCTGAGTCACTGCTTGTAAACACT  
ATCAATGGATCATCAGAAaCTGGGAGACAGTGAATAATCAGTGGTCTCAAGACCCCACTATGTTGTACAATAAGATGGA  
GTTTGAACCGTTCCAATCCTTGGTACCTAAAGCTGCCAGAGGTCAATACAGTGGATTTGTGAGAACATTATTCCAACAAA  
TGCGTGACGTAAGGGACATTTGATACTGTCCAGATAATAAAGCTGTACCATTTCAGCAGCCCCACCGAAGCAGAG  
CAGAATGCAGTTTTCTCTCTAACTGTGAATGTGAGAGGCTCAGGAATGAGAATACTCATAAGGGGCAATTTCCCTGTG  
TTCAACTACAATAAGGCAACCAAAAGACTTACCGTTCTTGGAAAGGACGCAGGTGCATTAACAGAGGATCCAGATGAG  
GGGACAGCCGGAGTGGAAATCTGCACTACTGAGGGGTTCTAATTCTAGGCAAGGAGGACAAAAGATATGGACCAGC  
ATTGAGCATCAATGAACTGAGCAATCTTCAAAGGGGAGAAAGCTAATGTGCTGATAGGGCAAGGAGACGTGGTGTG  
GGTAATGAAACGGAAACGGGACTCTAGCATACTTACTGACAGCCAGACAGCGACCAAAAGAATcCGGATGGCCATCAA  
TTA

#### PB1

ACTTTACTTTTCTTGAAGTACCAGTGCAAAATGCTATAAGTACCACATTCCCTTATACTGGAGACCCTCCATACAGCCAT  
GGGACAGGGACAGGATACACCATGGACACAGTCAACAGAACACACCAATATTGAAAAAGGGGAAGTGGACAACAAA  
CACAGAGACTGGAGCACCCCAACTCAACCGATTGATGGACCACTACCTGAGGATAATGAGCCAGTGGTTATGCACAA

## Sequenzdaten der untersuchten H5N1-Isolate

ACAGATTGTGATTGGAAGCAATGGCTTTCCTTGAAGAATCCCACCCAGGGATCTTTGAAAACCTCGTGTCTTGAAACGAT  
GGAAATTGTTCAACAAACAAGAGTGGATAAACTGACCAAGGTCGTGACACCTATGACTGGACATTGAATAGAAACCA  
ACCGGCTGCAACCGCTTTGGCCAACACTATAGAAATCTTCAGATCGAACGGTCTAACAGCCAATGAATCGGGACGGCTA  
ATAGATTTCTCAAGGATGTGATGGAATCAATGGATAAGGAAGAAATGGAGATAACAACACACTTCCAGAGGAAGAGA  
AGAGTGAGAGACAACATGACCAAAAAGATGGTCACACAAAGAACAATAGGGAAGAAAAAGCAAAGGCTGAACAAAA  
GAGCTACCTGATAAGAGCACTGACACTGAATACAATGACAAAAGATGCAGAAAGAGGCAAATTTGAAGAGGCGAGCAA  
TTGCAACACCCGGAATGCAAATCAGAGGATTCGTGACTTTGTTGAAACATTAGCGAGGAGTATCTGTGAGAACTTGA  
GCAATCTGGACTCCCAGTTGGAGGGAATGAAAAGAAGGCTAAATTTGGCAAACGTCGTGAGGAAGATGATGACTAATTC  
TCACGATACTGAACTTTCCTTTCAATTAATGAGACAATACTAAATGGAATGAGAATCAGAATCCTAGGATGTTTCTGG  
CAATGATAACATACATCACAAGGAACCAGCCAGAATGGTTTCGGAATGTCTTAAGCATTGCCCTATAATGTTCTCAAAC  
AAAATGGCAAGATTAGGAAGAGGATACATGTTTCGAAAGTAAGAGCATGAAGTTGCGAACACAAATACCAGCAGAAAT  
GCTTGCAAACATTGATCTTAAATACTTCAATGAATTAACGAAAAGAAAATGAAAAATAAGACCTCTATTAATAGATG  
GTACAGCCTCATTGAGCCCTGGAATGATGATGGGCATGTTCAACATGCTGAGTACAGTTCTGGGAGTCTCAATCTTGAA  
CCTTGGACAGAAAAGGTACACCAAAACCACATATTGGTGGGACGGACTCCAATCCTCTGATGATTTGCTCTCATCGTAA  
ATGCACCGAATCATGAGGGAATACAAGCAGGAGTGGATAGATTTTATAGGACTTGTAATTAGTTGGAATCAACATGA  
GCAAGAAGAAGTCTTACATAAATCGGACAGGGACATTTGAATTCACGAGCTTTTTCTACCGCTATGGATTTGTAGCCAAT  
TTCAGTATGGAGCTGCCAGTTTTGGAGTGTCTGGAATTAATGAATCGGCCGACATGAGCATTGGTGTTCAGTGATAA  
GGAACAATATGATAAACAACGACCTTGGGCCAGCAACAGCTCAGATGGCTCTTCAGCTATTCATCAAGGACTACAGATA  
CACATACCGATGCCACAGAGGGGATACGCAAATCCAACGAGGAGATCATTGAGCTGAAGAAGCTGTGGGAGCAAAA  
CCCGTTCAAAGGCAGGACTGTTGGTTTTAGATGGAGGACCAAATCTATACAACATCCGAAATCTCCATATCCCTGAGGTC  
TGCTTGAATGGGAATTGATGGATGAAGATTACCAGGGCAGACTGTGTAATCCTCTGAATCCGTTTCGTGAGCCATAAGG  
AAATTGAATCTGTCAACAATGCTGTAGTAATGCCAGCTCATGGCCCGCCAAGGGTATGGAATATGATGCCGTTGCAAC  
TACGATTATGATTCTAAAAGGAATCGTTCCATTCTCAATACGAGTCAAAGGGGAATTTCTGAGGATGAACAGATG  
TACCAGAAGTGTGCAATCTATTTGAGAAATCTTCCCAGCAGTTTATATCGGAGGCCAGTTGGAATTTCCAGCATGGT  
GGAGGCCATGGTGTCTAGGGCCGAATTTGATGCACGAATTTGATTTGAGTCTGGAAGGATTAAGAAAGAAGAGTTGC  
TGAGATCATGAAGATCTGTTCCACCATTGAAGAGCTCAGACGGCCAAAATAGTGAA

### PA

ATGGAAGATTTTGTGCGACAATGCTTCAATCCAATGATTGTGCGAGCTTGCAGGAAAAGGCAATGAAAGAATATGGGGAA  
GATCCGAAAATCGAAACGAACAAATTTGCTGCAATATGCACACACTTGGAGGTCTGTTTCATGTATTTCGATTTTCACTT  
TATTGATGAACGGAGTGAATCAATAATTGTAGAATCTGGAGATCCGAATACATTATTGAAACACCGATTTGAAATAATT  
GAAGGAAGAGACCGAACGATGGCCTGGACTGTGGTGAATAGTATTTGCAACACCACAGGAGTGCAGAAACCTAAATTT  
CTCCCAGATTTGTATGACTACAAAAGAGAACCGATTCTTAAATTTGGAGTGACACGGAGGGAAGTTTACATACTATC  
TGGAGAAGGCCAACAAGATAAAAATCCGAGAAGACACATATTCACATATTCTATTACAGGGGAGGAAATGGCAACCA  
AAGCGGACTACACCTTGATGAAGAAAAGCAGGGCAAGAATTAACCCAGGCTGTTACCATAAGACAGGAAATGGCCA  
GTAGGGGTCTATGGGATTCCTTTCGTCAATCCGAGAGAGGCGAAGAGACAATTGAAGAAAAATTTGAAATCACTGGAA  
CCATGCGCAGACTTGCTGACCAAAGTCTCCACCGAACTTCTCCAGCCTTAAAACTTTAGAGCCTATGTGGATGGATTC  
GAACCGAACGGCTGCATTGAGGGCAAGCTTTCTCAAATGTCAAAGAAGTGAATGCTAGAATTGAGCCATTTTTGAAGA  
CAACGCCACGCCCTCTCAGATTACCTGATGGGCCTCCTTGTCTCAGCGTGCAGAAATCCTGCTGATGGATGCCCTAAA  
TTAAGTATCGAAGACCCGAGTCATGAGGGGGAGGGGATACCCTATACGATGCAATCAAATGCATGAAGACATTTTTT  
GGGTGGAAGGAGCCCAACATCGTGAACACATGAAAAGGGTATAAACCCCAATTACCTCCTGACTTGAAGCAAGTG  
CTGGCAGAACTCCAAGATATTGAAAATGAGGAGAAAATCCCAAAAACAAGAATGAAAAAACAAGCCAGTTGAGG  
TGGGCACTCGGTGAGAATGACCAGAGAAAGTAGACTTTGAGGACTGCAAAGATGTTAGCGATTAAGACAGTAT  
GACAGTGTGAACAGAAATCTAGATCACTAGCAAGCTGGATTGAGAGTGAATCAACAAGGCATGTGAATTGACAGAC  
TCGAGTTGGATTGAACTTGTGAATAGGAGAGGATGTTGCTCCAATTTGAACACATTGCAAGTATGAGAAGGAACTATT  
TTACAGCGAAGTATCCATTGACAGAGCCACTGAATACATAATGAAGGGAGTGTACATAAACACAGCCCTGTTGAATGC  
ATCCTGTGACGCCATGGATGACTTTCAACTGATTTCAATGATAAGCAAATGCAGAACCAAGAAGGAAGACGGAAAAC  
AATCTGTATGGATTCATTATAAAAAGGAAGATCCCCTTGGAGGAATGATACCGATGTGGTAAATTTTGTGAGTATGGAAT  
TCTCTTACTGATCCGAGATTGGAGCCACACAAGTGGGAAAAGTACTGTGTCCTCGAGATAGGAGACATGCTCCTCCG  
GACTGCAGTAGGTCAAGTTTCAAGGCCATGTTCTGTATGTGAGAACCAACGGAACCTCCAAGATCAAAAATGAAATGG  
GGCATGGAATGAGACGATGCCTTCTTCAATCCCTTCAACAAATGAAAGCATGATTGAAGCCGAATCTTCTGTTAAAGA  
GAAGGACATGACCAAGAATCTTTGAAAACAAATCTGAAACATGGCCGATCGGAGAATCCCCCAAGGAGTGGAGGA  
AGGCTCATTGGAAGGTGTGAGAACCTTGTGGCGAAGTCTGTGTTCAACAGTTTATATGCATCTTCAAACTCGAG  
GGTTTTTCACTGAAATCAAGAAAATTTGCTTCTATTGCTCAGGCACTTAGGGACAACCTGGAACCTGGGACCTTCGATCT  
TGGAGGGCTATATGAAGCAATTGAGGAGTGCCTGATTAACGATCCCTGGGTTTTGCTTAATGCGTCTTGGTTCAACTCT  
TCCTCGCATGCACTGAAATAG

## Sequenzdaten der untersuchten H5N1-Isolate

---

### HA

TGCTTCTTTTTGCAATAGTCAGTCTTGTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTACCATGCAAACAACCTCGACAGAGCAG  
GTTGACACAATAATGGAAAAGAACGTCACCTGTTACACACGCCCAAGACATACTGGAAAAGACACACAACGGGAAGCTC  
TGCGATCTAAATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTAAAGAGATTGTAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGGAAACCAATGTGTG  
ACGAATTCCTCAATGTGCCGAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGATCAATCCAGCCAATGACCTCTGTTACCCAGGGAA  
TTTCAACGACTATGAAGAACTGAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCATTTTGAGAAAATTCAGATCATCCCCAAAAGTT  
CTTGGTCAGATCATGAAGCCTCATCAGGGGTGAGCTCAGCATGTCCATACCAGGGGAAGGTCCTCTTTTTTAGAAATGT  
GGTATGGCTTATCAAAAAGGACAATGCATACCCAACAATAAAGAGAAGTTACAATAATACCAACCAAGAAGATCTTTTG  
GTACTGTGGGGGATTACCATCCAAATGATGCGGCAGAGCAGACAAGGCTCTATCAAAACCAACCACCTATATTTCCG  
TTGGGACATCAACTAAACCAGAGATTGGTACCAAAAATAGCTACTAGATCCAAGGTAACCGGGCAAAGTGGAAGGA  
TGGAGTTCTTTTGGACAATTTTAAAACCGAATGATGCAATAAACTTTGAGAGTAATGGAAATTTTCATTGCTCCAGAAAAAT  
GCATACAAAATTGTCAAGAAAGGGGACTCAACAATTATGAAAAGTGAATTGGAATATGGTAACTGCAACACCAAGTGTG  
AACTCCAATAGGGGCGATAAATCTAGTATGCCATTTCCACAACATCCACCCTCTCACCATCGGGGAATGCCCAAATAT  
GTGAAATCAAACAGATTAGTCTTTGCGACTGGGCTCAGAAATAGCCCTCAAGGAGAGAGAAGAAGAAAAAGAGAGG  
ACTATTTGGAGCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACCACCATAG  
CAACGAGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAAGAAATCCACTCAAAAGGCAATAAATGGAGTCACCAATAAGGTCA  
ACTCGATCATTAACAAAATGAACACTCAGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAATTTAATAACTTAGAAAAGGAGAATAGAAAA  
TTTAAACAAGAAGATGGAAGACGGATTCTAGATGTCTGGACTTATAATGCTGAACTTCTGGTTCTCATGGAAAATGAG  
AGAACTCTAGACTTTTCATGACTCAAATGTCAAGAACCTTACGACAAGGTCGACTACAGCTTAGGGATAATGCAAAGG  
AGCTTGGTAAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCACAGATGTGATAATGAATGCATGGAAAAGTGTAAAGAAACGGATCGTATGA  
CTACCCGAGTATTCAGAAGAAGCAAGATTA AAAAGAGAGGAAATAAGTGGAGTAAAATTGGAATCAATAGGAACCTA  
CCAAATACTGTCAATTTATTCAACAGTGGCGAGCTCCCTAGCACTGGCAATCATGGTGGCTGGTCTATCTTTATGGATGT  
GCTCCAATGGATCGTTACAATGCAGAATTTGCATTTAAATTTGGAGTTCAGATTGA

### NA

ACCATCGGATCAATCTGTATGGTAATTGGAATAGTTAGCTTAATGTTACAAATTGGGAACATGATCTCAATATGGGTGAG  
TCATTCAATTCAGACAGGGAATCAACGCCAAGCTGAACCAATCAGCAATACTAAATTTCTACTGAGAAAAGCTGTGGCTT  
CAGTAACATTAGCGGGCAATTCATCTTTGCCCATAGCGGATGGGCTGTATACAGTAAGGACAACAGTATAAGGAT  
CGGTTCCAGGGGGGATGTGTTTGTATAAGAGAGCCGTTTCATCTCATGCTCCCACTTGGAAATGCAGAATTTCTTTTTGA  
CTCAGGGAGCCTTGCTGAATGACAAGCACTCCAATGGGACTGTCAAAGACAGAAGCCCTCACAGAACATTAATGAGTTG  
TCCTGTGGGTGAGGCTCCCTCCCATATAACTCAAGTTTTGAGTCTGTTGCTTGGTCAGCAAGTCTTGCCATGATGGCA  
CCAGTTGGTTGACAATTGGAATTTCTGGTCCAGACAATGGGGCTGTGGCTGTATTGAAATACAATGGCATAATAACAGA  
CACCATCAAGAGTTGGAGGAACAACATACTGAGAACTCAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAATGGCTCTTGCTTTACT  
GTAATGACTGATGGACCAAGTAATGGGCAGGCATCATATAAGATCTTCAAATGGAAAAAGGGAAAGTGGTTAAATCA  
GTCGAATTGGATGCTCCTAATTATCACTATGAGGAGTGCTCCTGTTATCCTGATGCCGGCGAAATCACATGTGTGTGCAG  
GGATAATTGGCATGGCTCAAATAGGCCATGGGTATCTTTCAATCAAAATTTGGAGTATCAAATAGGATATATATGCAGT  
GGAGTTTTCGGAGACAATCCACGCCCAATGATGGAACAGGTAGTTGTGATCCGGTGTCCCTAACGGGGCATATGGG  
GTAAAAGGGTTTTCAATTAATAACGGCAATGGTGTCTGGATCGGGAGAACCAAAAGCACTAATCCAGGAGCGGCTTTG  
AAATGATTTGGGATCCAAATGGGTGGACTGGAACGGACAGTAGCTTTTCGGTGAAGCAAGATATCGTAGCAATAACTG  
ATTGGTCAGGATATAGCGGGAGTTTTGTCCAGCATCCAGAACTGACAGGATTAGATTGCATAAGACCTTGTTTCTGGGT  
TGAGTTAATCAGAGGGCGCCTAAAGAGAGCACAATTTGGACCAGTGGGAGCAGCATATCTTTTTGTGGTGTAAATAG  
TGACACTGTTAGTTGGTCTTGGCCAGACGGTGTGAGTTGCCATTACCATTGACAAGTAGTTGTTCAAAAAA

### M

ATGAGTCTTCTaACCGAGGTCGAAACGTACGTTCTCTATCATCCCCTCAGGCCCCCTCAAAGCCGAGATCGCGCAGAA  
ACTTGAAGATGTCTTTGCAGGAAAGAACCAGATCTCGAGGCTCTCATGGAGTGGCTAAAGACAAGACCAATCCTGTCA  
CCTCTGACTAAAGGGATGTTGGGATTTGTATTACGCTCACCGTGCCAGTGAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGCTTTG  
TCCAGAATGCCCTAAATGGAAATGGAGATCCAAATAATATGGATAGGGCAGTTAAGCTATATAAGAAAGCTGAAAAGAG  
AAATAACATTCCATGGGGCTAAGGAGGTCGCACTCAGCTACTCAACCGGTGCACTCGCCAGTTGCATGGGTCTCATATA  
CAACAGAATGGGCACAGTGAACGGAAGTGGCTTTTGGCCTAGTGTGTGCCACTTGTGAGCAGATTGCAGATTCACAG  
CATCGGTCTCACAGACAGATGGCAACTATACCAACCCACTAATCAGGCATGAGAACAGAATGGTGTGCGCCAGCACTA  
CAGCTAAGGCTATGGAGCAGATGGCGGGATCAAGTGAAGCAGGCAGCGGAAGCCATGGAGGTCGCTAATCAGGCTAGG  
CAAATGGTGCAGGCAATGAGAACAATTGGGACTCATCCTAATCTAGTGTGCTGAGAGATAACCTTCTGAAAAT  
TGCAGGCCTACCAGAAACGAATGGGAGTGCAGATGCAGCGATTCAAGTATCCTCTTGTGTTGTTGCCGCAAGTATCATTG  
GGATCTTGCACTTGATATTATGGATTCTTGATCGTCTTTTCTTCAAATGCATTTATCGTCGCCTTAAATACGGTTTGAAAA

## Sequenzdaten der untersuchten H5N1-Isolate

---

GAGGGCCTTCTACGGAAGGAGTACCTGAGTCTATGAGGGAAGAGTATCGGCAGGAACAGCAGAATGCTGTGGATGTT  
GACGATGGTCATTTTGTCAACATAGAATTGGAGAAAAAA

### NS

ATGGATTCCAACACTGTGTCAAGCTTTCAGGTAGACTGCTTTCTTTGGCATGTCCGCAAACGATTTGCAGACCAAGA  
GGGTGATGCCCCATTCCTTGACCGGCTTCGCCGAGATCAGAAGTCCCTAAGAGGAAGAGGCAACACTCTTGGTCTGGAC  
ATCGAAACAGCTACTCGTGCGGGAAAGCAGATAGTGGAGCGAATTCTGGAGGAGGAGTCTGATGAGGCACTTAAAT  
GCCAGCTTCACGCTACCTAACTGATATGACTCTCGAGGAAATGTCAAGGGACTGGTTCATGCTCATGCCCAAGCAGAAA  
GTGACAGGTTCCCTTTCATCAAAATGGACCAGGCAATAATGGATAAAACCATCATATTGAAAGCAAACCTCAGTGTGA  
TTTATGACCGTTAGAGACCCTAATACTACTTAGAGCTTTCACAGAAGAAGGAGCAATCGTGGGAGAAATCTCACCATT  
ACCTTCTCTCCAGGACATACTAATGAGGATGTCAAAAATGCAATTGGCGTCCTCATCGGAGGACTTGAATGGAATGAT  
AACACAGTTCGAATCTCTGAAATTATACAGAGATTCGCTTGGAGAAGCATTGATGAGGATGGGAGACTTCCACTCCCTC  
CAGATCAGAAACGAAAAATGGCGAGAACAATTGAGTCAAAGTTTGAAGAAATAAGGTGGCTGATTGAAGAAATACG  
ACATAGATTGAAAATTACAGAAAACAGCTTCGAACAGATAACGTTTATGCAAGCCTTACAACACTGCTTGAAGTGGAG  
CAAGAGATAAGAACCTTCTCGGGTCAGCTTATTTAA

### ***Danksagung***

An dieser Stelle sei all jenen gedankt, die zum Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere möchte ich mich bei PD. Dr. Thorsten Wolff bedanken, der diese Arbeit betreute, auf dessen Unterstützung ich immer zählen und auf dessen Rat ich mich immer verlassen konnte.

Prof. Dr. Sven-Erik Behrens danke ich sehr für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit seitens der Universität Halle, seine stets offene ‚zweite‘ Meinung und die wertvollen Hinweise und Impulse, die er mir in unseren Diskussionen zu dieser Arbeit gab.

Ich habe mich sehr darüber gefreut, dass Prof. Dr. Stefan Ludwig die Funktion des dritten Gutachters übernommen hat und bin ihm dafür sehr dankbar.

Des Weiteren möchte ich mich bei denen bedanken, deren Rat und/oder Reagenzien wesentlich zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben: PD. Dr. Bastian Opitz und Dr. Vincent von Laak, sowie Prof. Dr. Stefan Hippenstiel und Anne Becher vom Charité-Klinikum, Berlin; Dr. Eva-Katharina Pauli, Universität Münster; Dr. Marion Abt, Dr. Daniel Voss, Dr. Barbara Biere, Alexander Radonic und Katharina Achatzi vom Robert Koch-Institut, Berlin.

Bei allen Mitgliedern der Projektgruppe 15/FG 17 bedanke ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Gudrun und Andrea, vielen Dank für die vielen Reagenzien die ich von Euch verbrauchen durfte und für das ständige Für-Nachschub-sorgen. Für die äußerst tatkräftige Unterstützung bei den Sequenzierungen und für die effektive Zusammenarbeit bei den Experimenten mit den Lungenstücken, möchte ich mich nochmals herzlich bei Andrea und Viola bedanken.

Ein großes ‚Danke‘ an Daniel, Marion, Richard und Viola für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

## **Tabellarischer Lebenslauf**

**Name:** Markus Matthaei  
**Anschrift:** Torfstr. 10  
13353 Berlin  
**Geburtsdatum/-ort:** 27.07.1979 in Frankfurt (Oder)  
**Familienstand:** ledig  
**Staatsangehörigkeit:** deutsch

### **Akademischer Werdegang:**

09/2006-12/2009 Promotion am Robert Koch-Institut, Berlin, bei PD. Dr. Thorsten Wolff, Thema: *Induktion und Blockade des Typ I Interferonsystems durch (H5N1) Influenza A Viren*

10/2004-06/2006 Eberhardt Karls-Universität Tübingen  
- Diplomprüfung in Biochemie, Physikalischer Chemie und Virologie  
- Diplomarbeit: *Untersuchungen zur Funktion des Cottontail rabbit Papillomvirus E6-Proteins*, Arbeitsgruppe Prof. Dr. T. Iftner, Experimentelle Virologie des Universitätsklinikums Tübingen

10/2003-09/2004 Münchner Studienjahr für Tübinger Biochemie-Studenten an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Praktika (6-wöchig) in den Arbeitsgruppen von:  
- Prof. Dr. G. Gerisch, MPI Biochemie, Martinsried  
- Prof. Dr. W. Neubert, MPI Biochemie, Martinsried  
- Prof. Dr. P. Cramer, Genzentrum LMU, München  
- Prof. Dr. E. Nigg, AG. Dr. A. Gartner, MPI Biochemie, Martinsried  
- Prof. Dr. W. Neupert, Abt. Physiologische Chemie, LMU, München, AG. PD. Dr. J. Hermann  
- Dr. L. Hengst, MPI Biochemie, Martinsried

04/2003 Studienortwechsel an die Eberhardt Karls-Universität, Tübingen

10/2000-03/2003 Studium der Biochemie, Universität Bielefeld,  
Vordiplom: 08.10.2002

### **Schulbildung:**

08/1992 – 06/1999 Carl-Friedrich-Gauss-Gymnasium Frankfurt (Oder)  
08/1990 – 08/1992 Realschule Alt-Zeschdorf  
09/1986 – 08/1990 Grundschule Falkenhagen

### **Sonstiges:**

11/1999 – 08/2000 Grundwehrdienst, Luftwaffe

Berlin, 01.07.2010, \_\_\_\_\_

***Eidesstattliche Versicherung***

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Dazu habe ich keine als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und inhaltlich oder wortwörtlich wiedergegebene Literaturquellen als solche gekennzeichnet.

Berlin, 01.07.2010,

\_\_\_\_\_

Markus Matthaei

## **Publikationen, Tagungsbeiträge und Förderung**

### **Publikationen**

- Ganzenmueller, T., **Matthaei, M.**, Muench, P., Scheible, M., Iftner, A., Hiller, T., Leiprecht, N., Probst, S., Stubenrauch, F. & Iftner, T. **(2008)**. The E7 protein of the cottontail rabbit papillomavirus immortalizes normal rabbit keratinocytes and reduces pRb levels, while E6 cooperates in immortalization but neither degrades p53 nor binds E6AP. *Virology* 372, 313-324.
- Wolff, T., Zielecki, F., Abt, M., Voss, D., Semmler, I. & **Matthaei, M.** **(2008)**. Sabotage of antiviral signaling and effectors by influenza viruses. *Biological chemistry* 389, 1299-1305.
- **Matthaei, M.** and Wolff, T., IFN $\alpha/\beta$  induction by highly pathogenic H5N1 influenza A viruses varies between strains despite functional NS1 proteins (in Vorbereitung).

### **Tagungsbeiträge**

- Posterpräsentation auf Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, 2008 und 2009
- Vortrag auf dem FLUNET-Meeting, 2008
- Vortrag auf der 3. Internationalen Orthomyxovirus Konferenz, 2009. (Young Scientists Meeting Grant der Europäischen Gesellschaft für Mikrobiologie, FEMS)
- Vortrag auf dem Nationalen Symposium für Zoonosen, 2009.
- Vortrag auf dem Nationalen Symposium zur Influenzaforschung, Jahresversammlung des Forschungsfortprogrammes Influenza und des Flu-Research-Nets, 2009.

### **Förderung**

Die Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation wurden finanziell von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen des Antrages Wo554/3-2 gefördert.