

Untersuchungen zur Rolle der Importin- α Proteine bei der Replikation von Influenza A Viren im Respirationstrakt des Säugers

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

des Fachbereichs Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Swantje Thiele
aus Preetz

Hamburg 2013

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Frau Priv.-Doz. Dr. G. GABRIEL
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Professor Dr. T. DOBNER
Tag der Disputation: 13. September 2013

Hamburg, den 30. August 2013



Professor Dr. C. Lohr
Vorsitzender des
Fach-Promotionsausschusses Biologie

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Juni 2009 bis Juli 2013 im Heinrich-Pette-Institut, Institut für Experimentelle Virologie (Direktor: Prof. Dr. T. Dobner), Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg unter Leitung von PD Dr. G. Gabriel durchgeführt.

Angenommen vom Fachbereich Biologie der Universität Hamburg als Dissertation am:

30.08.2013

Erstgutachter: PD Dr. Gülşah Gabriel

Zweitgutachter: Prof. Dr. Thomas Dobner

Tag der mündlichen Prüfung am:

13.09.2013

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Wolfram Brune

Prof. Dr. Julia Kehr

PD Dr. Hartwig Lüthen

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Biologie der Influenza A Viren.....	1
1.1.1	Taxonomie.....	1
1.1.2	Ökologie und Evolution.....	2
1.1.3	Epidemiologie und Pathogenese von Influenza A Viren	3
1.1.4	Morphologie.....	11
1.1.5	Genomaufbau.....	12
1.1.6	Der virale Ribonukleoproteinkomplex (vRNP).....	12
1.1.7	Replikationszyklus	17
1.1.8	Determinanten des Wirtsspektrums und der Pathogenität.....	21
1.1.9	Das HPAIV SC35 (H7N7) und seine mausadaptierte Variante SC35M	27
1.2	Nukleozytoplasmatischer Transport.....	29
1.2.1	Importin- α/β vermittelter Kernimport.....	32
1.2.2	Die Importin- α Proteinfamilie	33
1.2.3	Die funktionellen Domänen von Importin- α und Aufbau des Importin- α/β Heterodimers.....	35
1.2.4	Importin- α Funktionen	36
1.2.5	Kerntransport der Untereinheiten des viralen RNP-Komplexes.....	39
1.3	Zielsetzung	41
2	Material	43
2.1	Puffer, Lösungen und Chemikalien	43
2.2	Fertige Lösungen und Reaktionssysteme (Kits).....	45
2.3	Verbrauchsmaterial und Glaswaren.....	47
2.4	Zellkulturmedien & -zusatzstoffe.....	48
2.5	Eukaryotische Zelllinien	49
2.6	Eukaryotische Primärzellen	50
2.7	Bakterienmedien.....	50
2.8	Bakterienstämme.....	51
2.9	Virusstämme.....	51

2.10	DNA- und Protein-Größenstandards.....	51
2.11	Enzyme	51
2.12	Plasmide und Vektoren.....	52
2.13	DNA-Oligonukleotide	52
2.13.1	DNA-Oligonukleotide für Sequenzierreaktionen	52
2.13.2	DNA-Oligonukleotide (RT-PCR).....	53
2.13.3	DNA-Oligonukleotide (RT-qPCR: human / murin).....	54
2.13.4	RNA-Oligonukleotide.....	56
2.14	Primäre Antikörper.....	56
2.15	Sekundäre Antikörper	57
2.16	Blockingpeptide der Importin- α Antikörper in der IHC-P.....	58
2.17	Narkotika & Analgetika	58
2.18	Geräte und Werkzeuge.....	58
3	Methoden.....	61
3.1	Mikrobiologische Methoden	61
3.1.1	Transformation kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Bakterien.....	61
3.1.2	Plasmid-DNA-Amplifikation	61
3.1.3	Herstellung von Bakterien-Kryostocks	61
3.1.4	Plasmidpräparation.....	61
3.2	Zellkultur-Methoden	62
3.2.1	Kultivierung eukaryotischer Zelllinien	62
3.2.2	Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zelllinien.....	62
3.3	Nukleinsäuretechniken	63
3.3.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	63
3.3.2	Sequenzierung von Plasmid-DNA.....	63
3.3.3	Gesamt-RNA Isolierung.....	63
3.3.4	Design von PCR-Primern	66
3.3.5	Validierung der RT-qPCR Primer in einer <i>One-Step</i> RT-PCR Reaktion.....	67
3.3.6	Quantitative <i>Real-time</i> PCR (RT-qPCR)	68
3.3.7	DNA- und siRNA-Transfektion	75
3.4	Proteinbiochemische Methoden.....	76

3.4.1	Gesamtproteinextraktion aus eukaryotischen Zellen	76
3.4.2	SDS-PAGE und Western-Blot	76
3.4.3	Analyse von Polymeraseaktivitäten.....	77
3.5	Virologische Methoden	77
3.5.1	Virusanzucht im embryonierten Hühnerei	77
3.5.2	Hämagglutinationstest (HA-Test)	78
3.5.3	Virustiterbestimmung mittels Plaquetest	79
3.5.4	Analyse des viralen Wachstumsverhaltens in Importin- $\alpha^{-/-}$ MEF-Zellen.....	80
3.6	Histologische Methoden.....	80
3.6.1	Präparation von Mausorganen und humanem Biopsiematerial zur Herstellung von FFPE-Gewebeschnitten	80
3.6.2	Herstellung von FFPE-Gewebeschnitten am Mikrotom	81
3.6.3	Entparaffinierung und Rehydrierung von FFPE-Gewebeschnitten	81
3.6.4	Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	82
3.6.5	Immunhistochemische Färbung von FFPE-Gewebeschnitten (IHC-P).....	83
3.6.6	Bildaufnahme der histologischen und immunhistologischen Färbungen	84
3.6.7	<i>Laser Microbeam</i> -Mikrodissektion (LMM)	85
3.7	Tierversuche.....	85
3.7.1	Narkose und Infektion.....	86
3.7.2	Überlebensversuch (MLD ₅₀ -Bestimmung).....	86
3.7.3	Organentnahme und Töten der Versuchstiere	86
3.7.4	Intrakardiale Perfusion.....	87
3.7.5	Präparation von murinen Organen für Folgeuntersuchungen.....	88
3.8	Statistische Auswertungen.....	88
4	Ergebnisse	89
4.1	Einfluss des Importin- $\alpha 3$ Gens auf die Influenza A Virus Replikation <i>in vitro</i>	89
4.2	Wachstumsverhalten von H7N7-Viren in murinen Importin- α <i>knockout</i> Zellen	92
4.3	Bestimmung der Importin- α mRNA-Expressionslevel.....	94
4.3.1	Importin- α mRNA-Expressionslevel in humanen und murinen Zelllinien	94
4.3.2	Importin- α mRNA-Expressionslevel muriner Organe	96
4.4	Importin- α Isoformen im Respirationstrakt des Säugers.....	97
4.4.1	Importin- α Vorkommen im Respirationstrakt des Säugers	98

4.4.2	Importin- α mRNA-Expressionslevel im oberen und unteren Respirationstrakt des Säugers	101
4.4.3	Importin- α mRNA-Expressionslevel in der murinen Lunge nach Infektion mit aviärem und säugeradaptiertem HPAIV H7N7	105
4.4.4	Korrelation der Importin- α mRNA-Expressionslevel der infizierten Lunge mit dem Organtropismus der H7N7-Viren in der Maus	108
4.5	Pathogenität und Organtropismus von H7N7-Viren verschiedener Wirtsspezifitäten im Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mausmodell	110
4.5.1	Zelltropismus von H7N7 Influenza A Viren unterschiedlicher Importin- α Abhängigkeiten im Respirationstrakt der Maus	111
4.5.2	Organtropismus von aviären und säugeradaptierten H7N7 Influenza A Viren im Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mausmodell	113
4.5.3	Virulenz von H7N7-Viren verschiedener Wirtsspezifitäten im Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mausmodell.....	114
5	Diskussion.....	118
5.1	Importin- $\alpha 3$: ein negativer Regulator der Polymeraseaktivität und des Wachstumsverhaltens von H7N7 Viren <i>in vitro</i>	118
5.2	Die Importin- α Isoformen besitzen differenzielle Expressionsmuster in Säugerzellen und -organen	122
5.3	Importin- $\alpha 3$ ist die dominierende Isoform im Respirationstrakt des Säugers	124
5.4	Die Herabregulierung der Importin- $\alpha 3$ Expression in der Lunge durch säugeradaptierte Influenza A Viren korreliert mit systemischer Virusausbreitung in der Maus	126
5.5	Das Fehlen des Importin- $\alpha 3$ Gens erhöht die Pathogenität von H7N7 Viren im Mausmodell.....	129
5.6	Modell: Die differenzielle Expression der Importin- α Isoformen in der Lunge stellt einen Selektionsdruck bei der Säugeradaptation von Influenza A Viren dar.	133
6	Zusammenfassung	135
7	Summary	137
8	Literaturverzeichnis.....	139

9	Abbildungsverzeichnis.....	152
10	Tabellenverzeichnis.....	154
11	Abkürzungsverzeichnis.....	155
12	Veröffentlichungen, Vorträge und Posterpräsentationen	158
	Eidesstattliche Versicherung	160
	Danksagung.....	161
	<i>Curriculum Vitae</i>	162

1 Einleitung

1.1 Biologie der Influenza A Viren

1.1.1 Taxonomie

Influenza A Viren (IAV) sind Vertreter der Familie der *Orthomyxoviridae*. Sie gehören zu den umhüllten Viren, die ein RNA-Genom mit negativer Orientierung besitzen. Dieses liegt in den infektiösen Viruspartikeln, im Gegensatz zu den meisten Negativstrang-RNA-Viren, segmentiert und nicht als kontinuierliches Molekül vor (Modrow *et al.*, 2003). Die Familie der *Orthomyxoviridae* gliedert sich in sechs Gattungen (Tab. 1):

Tab. 1: Die Gattungen der *Orthomyxoviridae* und ihre Wirte

Gattung	Mensch	Tier
Influenza A Virus	Influenza A Viren	Influenza A Viren (Wasservögel, Geflügel, Schweine, Pferde, Seehunde, Fledermäuse ¹ ...)
Influenza B Virus	Influenza B Viren	Influenza B Virus (Seehunde)
Influenza C Virus	Influenza C Viren	Influenza C Virus (Schweine)
Thogotovirus	Dhorivirus ²	Thogotovirus, Dhorivirus, Aragarivirus (Zecken, Nagetiere, Schafe, Ziegen, Rinder)
Isavirus		Virus der infektiösen Anämie der Lachse (<i>Infectious Salmon Anemia Virus</i>)
bisher unbenannt ³	Quaranfilvirus ³	Quaranfilvirus ³ (QRFV; Zecken, Vögel) Lake Chad-Virus ³ (LKCV; Vögel) Johnston-Atoll-Virus ⁴ (JAV; Zecken, Vögel)

¹ Tong *et al.*, 2012, ² Butenko *et al.*, 1987, ³ Presti *et al.*, 2009, ⁴ Clifford *et al.*, 1968. modifiziert nach Modrow *et al.*, 2003.

Aufgrund verschiedener molekularer Eigenschaften und der serologischen Charakteristika ihrer Nukleoproteine (NP) und Matrixproteine werden die Influenzaviren drei unterschiedlichen Gattungen zugeordnet, die als Typ A, B und C klassifiziert werden. Sie unterscheiden sich hauptsächlich darin, dass Influenza A und B Viren je acht Genomsegmente aufweisen, während Influenza C Viren nur sieben Genomsegmente besitzen. Influenza C Viren enthalten statt je einem Segment für das Hämagglutinin (HA) und die Neuraminidase (NA) ein kombiniertes, sogenanntes Hämagglutinin-Esterase-Fusionsprotein (HEF-Protein). Zusätzlich unterscheiden sich die verschiedenen Gattungen in ihrem Wirtsspektrum, wobei die Influenza A Viren eine große Breite von unterschiedlichen Spezies infizieren können (Tab. 1; Modrow *et al.*, 2003). Die Influenza A Viren werden weiterhin anhand ihrer beiden Oberflächenglykoproteine, dem HA und NA, charakterisiert. Es

wurden bisher 17 verschiedene HA- und 9 NA-Subtypen für Influenza A Viren beschrieben. Der H17-Subtyp wurde erst vor Kurzem aus guatemalischen Gelbschulterfledermäusen (*Sturnira lilium*) sequenziert (Tong *et al.*, 2012). Zur Klassifizierung der Influenzaviren wird eine Standardnomenklatur verwendet. Der vollständige Name eines Virus setzt sich aus dem Virustyp, der Spezies, aus der es isoliert wurde (außer bei humanen Isolaten), dem Isolationsort, der Isolatnummer, dem Isolationsjahr und dem HA- und NA-Typ zusammen (Bouvier und Palese, 2008). So ist z.B. A/Duck/Alberta/35/76 (H1N1) ein Influenza A Virus, das 1976 in Alberta aus einer Ente isoliert wurde, die Isolatnummer 35 erhielt und dessen HA und NA beide dem Subtyp 1 angehören. Von diesen verschiedenen HA- und NA-Subtypen haben bisher drei HA- (H1, H2 und H3) und zwei NA-Subtypen (N1 und N2) Pandemien in der menschlichen Bevölkerung ausgelöst und sich im Menschen etablieren können (Bouvier und Palese, 2008). Das erste Influenza A Virus wurde 1930 von Richard Shope aus dem Schwein isoliert (A/Swine/Iowa/30 (H1N1); Shope, 1931). Drei Jahre später isolierten Wilson Smith, Sir Christopher Andrewes und Sir Patrick Laidlaw das erste humane Influenza A Virus (A/Wilson-Smith/33 (H1N1); Smith *et al.*, 1933).

1.1.2 Ökologie und Evolution

Das natürliche Reservoir der Influenza A Viren befindet sich in wildlebenden Wasservögeln (Ordnungen: *Anseriformes*, *Charadriiformes*). Der vorhandene Genpool der Influenzaviren in diesen Wirten liefert eine hohe genetische Diversität, wodurch es durch Interspeziesstransmissionen zum Auftreten von Infektionen mit neuen Influenzaviren im Menschen, bzw. Land- und Meeressäugern kommt (Webster *et al.*, 1992). Handelt es sich hierbei um einen antigenisch neuen Virussubtyp gegenüber dem die Bevölkerung empfänglich und immunologisch naiv ist, so kann dies zum Auftreten einer Pandemie führen (Neumann *et al.*, 2009). Dies war zuletzt während der Pandemie in 2009 zu beobachten, die durch ein Influenza A Virus des H1N1 Subtyps (pH1N1) verursacht wurde. Bei Adaptation an den neuen Wirt kann sich das neue Virus zudem auch als stabiler Subtyp in diesem etablieren. Influenza A Viren zeigen in Menschen, Schweinen und Pferden eine hohe genetische Variabilität, während sie in Wasservögeln eine evolutionäre Stasis erlangt haben (Webster *et al.*, 1992). Die Oberflächenglykoproteine der Influenzaviren sind dabei der stärksten Evolution unterworfen, jedoch finden sich auch in den anderen Gensegmenten wirtsadaptive Mutationen (Webster *et al.*, 1992). Diese genetische Variabilität der Influenzaviren resultiert aus der Akkumulation von Mutationen in den acht viralen Gensegmenten, die durch verschiedene Mechanismen eingebracht werden und allesamt zur Evolution des Virus beitragen. So induzieren die antigenen Bereiche der viralen Oberflächenglykoproteine HA und NA im Infektionsverlauf eine neutralisierende Immunreaktion durch Antikörper, die einen Selektionsdruck auf das Virus ausüben (Modrow

et al., 2003). Dieser äußert sich in dem Auftauchen von Punktmutationen (Substitutionen, Deletionen, Insertionen) in den oberflächenexponierten Bereichen der HA- und NA-Proteine und wird als *antigenic drift* bezeichnet (Modrow *et al.*, 2003). Das Fehlen einer Korrekturlesefunktion der viralen RNA-Polymerase trägt maßgeblich zum *antigenic drift* bei. Bei der Replikation des Virusgenoms werden Fehler in einer Größenordnung von 10^{-4} Basen verursacht, die im Gegensatz zu der Fehlerrate von DNA-Polymerasen (10^{-9} Basen pro Replikationszyklus) sehr hoch sind (Webster *et al.*, 1992). Jeder Replikationszyklus eines RNA-Virus resultiert damit in einer gemischten Population von Virusnachkommen mit vielen verschiedenen Varianten, von denen die meisten nicht wachstumsfähig sind. Einige besitzen jedoch potenziell vorteilhafte Mutationen, die unter den richtigen Selektionsbedingungen dominant werden können (Webster *et al.*, 1992). Ein weiterer Mechanismus der Virusevolution ist der *antigenic shift*. Durch Punktmutationen oder Reassortierung verändert sich hierbei das Virus dahingehend, dass sich die Antigenität verschiebt. So entsteht ein neues Influenzavirus, gegen das die Bevölkerung keine oder keine ausreichende Immunität besitzt. Im Falle der Reassortierung werden dabei einzelne Gensegmente zwischen verschiedenen Subtypen ausgetauscht. Solche Reassortanten können bei Infektion der gleichen Zelle mit zwei oder mehr verschiedenen Virussubtypen zum gleichen Zeitpunkt entstehen. Der *antigenic shift* ist Voraussetzung für das Auftreten von Pandemien in der Bevölkerung (Webster *et al.*, 1992).

1.1.3 Epidemiologie und Pathogenese von Influenza A Viren

Mitunter werden aviäre Influenzaviren aus Wasservögeln auch über Artgrenzen hinweg auf andere Vögel (insbesondere Geflügel), Meeres- (Seehunde, Delphine, Wale) oder Landsäugetiere (Schweine, Pferde, Nerze, etc.) übertragen. Eine Übertragung von Influenzaviren auf den Menschen geschieht hauptsächlich durch infiziertes Geflügel (Naffakh *et al.*, 2008; Subbarao und Katz, 2000) oder indirekt durch infizierte Schweine (Ma *et al.*, 2008). Alle Influenzaviren besitzen damit, neben ihrer Bedeutung als Krankheitserreger, ein zoonotisches Potenzial (Modrow *et al.*, 2003). Das Schwein wird dabei als sogenanntes *mixing vessel* diskutiert, da es sowohl durch aviäre als auch humane Influenzaviren infiziert werden kann. Daher können im Schwein durch Reassortierung neue Subtypen aus Viren beider Wirtshintergründe entstehen (Ma *et al.*, 2008). Influenzaviren führen auch in Nutztieren zu Atemwegserkrankungen (Schwein, Pferd) oder speziell im Geflügel zu systemischen Infektionen mit hohen Sterblichkeitsraten und sind somit auch von großer ökonomischer Bedeutung (Naffakh *et al.*, 2008).

Influenza ist das Musterbeispiel einer viralen Infektion, bei der die fortwährende Evolution des Virus für das Auftreten der alljährlichen Epidemien und der gelegentlich auftretenden

Pandemien verantwortlich ist und eine beträchtliche Auswirkung auf die menschliche Gesundheit hat (Webster *et al.*, 1992). Während der jährlichen Epidemien sind laut der World Health Organization (WHO) weltweit etwa 3 bis 5 Millionen schwere Fälle zu verzeichnen und etwa 250 000 bis 500 000 Todesfälle (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/index.html>, abgerufen am 02.07.2013). Besonders während der Pandemien von 1918, 1957 und 1968 waren Influenzaviren für eine hohe Morbidität und Mortalität in der Bevölkerung mit etwa 1 bis 50 Millionen Toten weltweit verantwortlich (Naffakh *et al.*, 2008).

1.1.3.1 Aviäre Influenza A Viren

Die Infektion von Wasservögeln mit Influenzaviren verläuft, aufgrund der vollständig vollzogenen Wirtsadaptation an ihr natürliches Reservoir, zumeist asymptomatisch. Die Verbreitung der Viren erfolgt über infektiöse Exkreme, während sie oral über kontaminiertes Wasser oder Futter aufgenommen werden (Webster *et al.*, 1978). Dabei repliziert das Virus im Wasservogel primär in den Epithelzellen des Intestinaltraktes (Naffakh *et al.*, 2008; Webster *et al.*, 1992). Die Krankheitssymptome einer Influenzavirus Infektion in anderen Vogelspezies variieren stark und sind abhängig vom Virusstamm. Im Falle einer Infektion mit niedrigpathogenen aviären Influenza A Viren (LPAIV) verläuft die Infektion zumeist asymptomatisch, während die Infektion mit hochpathogenen aviären Influenza A Viren (HPAIV) in einer systemischen, hochletalen Infektion resultiert (Webster *et al.*, 1992). Die Hauptunterscheidungsmerkmale zwischen LPAIV und HPAIV sind der Krankheitsverlauf im Vogel sowie die Spaltbarkeit des viralen HA₀-Vorläufermoleküls durch zelluläre Proteasen des Wirtes (Webster und Rott, 1987).

Die Vertreter der LPAIV zeichnen sich durch eine geringe Virulenz, eine Vielzahl verschiedener HA-Subtypen (H1-H16) und einen nichtletalen Infektionsverlauf im Geflügel aus (Webster *et al.*, 1992). Das HA₀ der LPAIV besitzt ein einzelnes Arginin an der monobasischen Spaltstelle. Es kann nur durch trypsinartige Proteasen des Wirtes, die nur in bestimmten Geweben vorkommen (z.B. im Epithel des Intestinaltraktes), in das aktive HA-Molekül bestehend aus HA₁ und HA₂ gespalten werden (Klenk *et al.*, 2008).

Die Gruppe der HPAIV umfasst die Influenzaviren des H5- und H7-Subtyps (z.B. A/FPV/Dutch/27 (H7N7) und A/Chicken/Korea/IS/06 (H5N1)), die sich durch eine hohe Letalität auszeichnen und innerhalb von wenigen Tagen nach der Infektion zum Tod des Geflügels führen (Jeong *et al.*, 2009; Webster *et al.*, 1992). Die HPAIV wurden als Erreger der klassischen Geflügelpest bekannt, bis sie 1955 als Influenzaviren identifiziert wurden (Schäfer, 1955). Eine HPAIV Infektion im Geflügel äußert sich in Atemwegserkrankungen, Sinusitis, stark erhöhtem Tränenfluss, Diarrhöe, einer verringerten Eiproduktion, Zyanose (insbes. der Kämme und Kehllappen), Ödemen, gesträubtem Federkleid und neurologischen

Störungen (Webster *et al.*, 1992). Das HA₀ der HPAIV weist eine multibasische Spaltschnelle (R-X-K/R-R) auf, die durch Furin und furinähnliche Proteasen gespalten werden kann. Das ubiquitäre Vorkommen dieser Proteasen bedingt die systemische Infektion und dadurch die hohe Pathogenität im Geflügel (Klenk *et al.*, 2008).

1.1.3.2 Humane Influenza

Influenzaviren sind im Menschen als Erreger von hochfieberhaften Erkrankungen der Atemwege bekannt und verursachen die klassische Virusgrippe bzw. Influenza (Modrow *et al.*, 2003).

Pathogenese der humanen Influenza

Die Übertragung von Influenzaviren erfolgt im Menschen durch virushaltige Aerosole bzw. Schmier- und Tröpfcheninfektion. Nach der Infektion kann die Inkubationszeit 1 bis 5 Tage betragen. Zu den Symptomen zählen das plötzliche Einsetzen von Kopfschmerzen, Schüttelfrost und Husten. Hierauf folgen zumeist hohes Fieber (bis 41 °C), Muskelschmerzen, Appetitlosigkeit und allgemeines Schwächegefühl (Modrow *et al.*, 2003). Weiterhin können Übelkeit, Erbrechen und Durchfall auftreten. Nach durchschnittlich drei Tagen geht das Fieber zurück, während der Husten mehrere Wochen anhalten kann. Die Virusausscheidung dauert durchschnittlich etwa bis zu einer nach Woche nach Auftreten der ersten Symptome an (Modrow *et al.*, 2003). Eine lebensbedrohliche Virusgrippe liegt dann vor, wenn sich im Anschluss an die beschriebenen Symptome eine primäre virale, interstitielle und teilweise hämorrhagische Lungenentzündung entwickelt. Dies tritt vor allem in den Influenza-Risikogruppen (>65 Jahre, Schwangere, Immunsupprimierte oder chronisch Kranke, Kleinkinder) aber auch bei etwa 25 % der Patienten ohne zugrunde liegende Krankheiten auf. Kommen zusätzlich Kreislaufschäden und Myokarditis hinzu, kann dies innerhalb weniger Tage zum Tod führen (Modrow *et al.*, 2003). Die Influenzaviren gelangen über die Atemwege in den Organismus und infizieren die Epithelzellen der Mund-, Nasen- und Rachenschleimhaut des oberen Respirationstraktes (ORT). Von hier aus breiten sie sich in den unteren Respirationstrakt (URT) aus und führen zur Zerstörung der Flimmerepithelien und der schleimproduzierenden Hautschichten des Respirationstraktes (Modrow *et al.*, 2003). Bildet sich eine Pneumonie aus, kann das Virus auf das Lungenparenchym übergreifen. Dies hat Nekrosen, Blutungen und Risse in den Alveolar- und Bronchialwänden zur Folge. Ein Eintritt des Virus in die Blutbahn kann zudem zu virämischen Phasen führen (Likos *et al.*, 2007). Bakterielle Koinfektionen, meistens verursacht durch *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* oder *Streptococcus pyogenes*, können synergistisch zur Entstehung von Lungenentzündungen beitragen (Chertow und Memoli, 2013; Modrow *et al.*, 2003).

Epidemische und pandemische Influenza (H1, H2, H3)

Durch Influenzaviren werden die jährlich wiederkehrenden, lokal begrenzten Epidemien ausgelöst und auch die sporadisch auftretenden Pandemien (Neumann *et al.*, 2009). Bei den global auftretenden Pandemien handelt es sich um Übertragungen von Influenzaviren aus aviären Wirten oder dem Schwein auf den Menschen (Modrow *et al.*, 2003). Nachfolgende Epidemien kleineren Ausmaßes werden größtenteils durch den Mechanismus des *antigenic drift* hervorgerufen und sind durch dauerhafte und weitverbreitete interhumane Transmission gekennzeichnet (Bouvier und Palese, 2008; Modrow *et al.*, 2003). Zu den derzeit saisonal zirkulierenden Influenzastämmen der nördlichen Hemisphäre gehören Influenza A Viren des H3 und 2009 pH1N1 Subtyps und Influenza B Viren der Yamagata- und Victoria-Linien (WHO: <http://gamapserver.who.int/gareports/Default.aspx?ReportNo=5&Hemisphere=Northern> ; abgerufen am 06.07.2013).

In diesem und dem vergangenen Jahrhundert traten vier Influenzapandemien auf. Von 1918-1919 tötete die als Spanische Grippe (H1N1) bekannte Pandemie etwa 50 Millionen Menschen weltweit und ist damit bis heute in ihrer Schwere unübertroffen. Ungewöhnlich war dabei die hohe Mortalität bei jungen Erwachsenen, deren Grund bis heute nicht eindeutig geklärt ist. Die Infektion mit der Spanischen Grippe führte zu schweren, primär viralen Pneumonien (Kobasa *et al.*, 2007). Ein erheblicher Teil der Patienten verstarb jedoch in den Kriegsjahren 1918/19 zusätzlich an einer sekundären, bakteriellen Pneumonie, die durch den Mangel an Antibiotika nicht behandelt werden konnte (Morens *et al.*, 2008). Die Genomsequenz des 1918-Virus wurde erst 1997 nachträglich mittels reverser Genetik bestimmt und enthüllte ein aviärähnliches H1N1 Virus, das in einigen Proteinen humanähnliche Signaturen aufwies (Abb. 1A; Neumann *et al.*, 1999; Reid *et al.*, 1999; Taubenberger *et al.*, 1997; Tumpey *et al.*, 2005). Zur Virulenz des 1918 H1N1 Virus trugen u.a. das HA-Protein (Kobasa *et al.*, 2004; Tumpey *et al.*, 2002; Tumpey *et al.*, 2004), der Replikationskomplex (Tumpey *et al.*, 2005; Van Hoesen *et al.*, 2009; Watanabe *et al.*, 2009), das NS1-Protein (Geiss *et al.*, 2002) und das PB1-F2-Protein bei (McAuley *et al.*, 2007). Dabei waren das monobasische HA (Reid *et al.*, 1999) und das PB2-Protein essentiell für die Transmissibilität des Virus von Mensch-zu-Mensch (Van Hoesen *et al.*, 2009). Auf die Spanische Grippe folgte die Asiatische Grippe (H2N2, 1957-1958), die ihren Ursprung im südlichen China hatte, von wo aus sie sich nach Singapur, Hong Kong, Japan, Großbritannien und in die USA ausbreitete. Weltweit war sie für etwa 1 bis 1,5 Millionen Todesfälle verantwortlich (Potter, 2001). Diese Reassortante aus einem humanen und aviären Virus führte die aviären H2- und N2-Subtypen erstmals in die Bevölkerung ein. Ihr PB1-Gen war ebenfalls aviären Ursprungs, die restlichen Segmente humanähnlich (Abb. 1A; Neumann *et al.*, 2009). Die dritte Pandemie des 20. Jahrhunderts war die Hong Kong Grippe (H3N2) von 1968-1970. Diese human-aviäre H3N2-Reassortante mit aviären H3- und PB1-

Genen verdrängte die Viren des H2N2-Subtyps (Abb. 1A). Weltweit führte die H3N2-Pandemie zu etwa 750 000 bis 1 Million Todesfällen (Neumann *et al.*, 2009; <http://asianhistory.about.com/od/asianenvironmentalhistory/p/flupandemics.htm>; http://www.calverthealth.org/_pdf/Pan_Flu_Fact_Sheet.pdf).

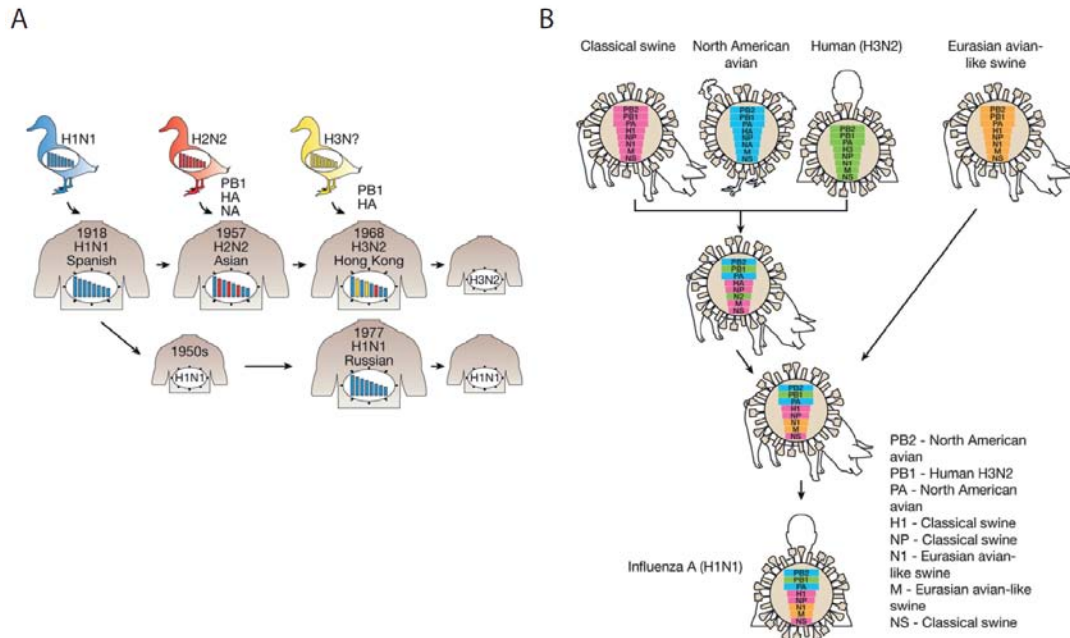


Abb. 1: Auftreten pandemischer Influenza A Viren. (A) Die Spanische Grippe wurde vermutlich durch die Transmission eines aviären Influenzavirus auf den Menschen ausgelöst. 1957 resultierte die Einführung der HA-, NA- und PB1-Gene eines aviären H2N2-Subtyps in die Bevölkerung in der Asiatischen Grippe. Ähnlich führte die Einführung des HA- und PB1-Gens eines aviären H3-Virus 1968 zur Hong Kong Grippe (H3N2). 1977 traten in einer Pseudopandemie wieder lokal H1N1 Viren auf, die den Mitte der 1950er Jahre zirkulierenden Stämmen sehr ähnelten (Kilbourne, 2006). (B) Entstehung des pandemischen pH1N1 Virus von 2009. In den späten 1990er Jahren entstanden tripelreassortierte H3N2 und H1N2 Schweineinfluenzaviren aus humanem H3N2 Virus, nordamerikanischen aviären Schweineviren und klassischen Schweineviren, die seitdem in den Schweinepopulationen zirkulierten. Eine solche Tripelreassortante reassortierte mit einem eurasischen, aviärähnlichen Schweinevirus, woraus das 2009er pH1N1 Virus entstand (modifiziert nach Neumann *et al.*, 2009).

Im Mai 1977 wurde eine Pseudopandemie durch ein H1N1 Virus ausgelöst, die altersbeschränkt nur in Jugendlichen und hauptsächlich in der nördlichen Hemisphäre auftrat (Kilbourne, 2006; Nakajima *et al.*, 1978; Neumann *et al.*, 2009). Das Virus dieser Russischen Grippe ähnelte den zirkulierenden Viren der frühen 1950er Jahre sehr und sein Auftauchen deutete auf ein unbeabsichtigtes Freisetzen des Virus hin (Abb. 1A; Nakajima *et al.*, 1978). Die erste Pandemie des 21. Jahrhunderts wurde ebenfalls durch ein H1N1 Virus ausgelöst und wird als Mexikanische Grippe bzw. 2009er pandemische H1N1-Influenza (pH1N1) bezeichnet. Im April 2009 wurde das pH1N1 Virus in den USA zum ersten Mal aus zwei Kindern isoliert (Dawood *et al.*, 2009), bevor in Mexiko weitere Krankheitsfälle identifiziert wurden, die durch dasselbe Virus ausgelöst worden waren (Echevarría-Zuno *et al.*, 2009). Es enthält sechs Genomsegmente einer Tripelreassortante der nordamerikanischen Schweineviruslinie und zwei Segmente der Eurasischen aviärähnlichen Schweineviruslinie (Abb. 1B; Fraser *et al.*, 2009; Garten *et al.*, 2009). Die meisten Krankheitsverläufe waren

mild bis mäßig, wobei als Symptome Atemwegsinfektionen des ORT und häufig gastrointestinale Beschwerden (Übelkeit, Erbrechen, Durchfall) auftraten (Dawood *et al.*, 2009; Riquelme *et al.*, 2009). Es waren jedoch auch schwere und tödliche Krankheitsverläufe zu verzeichnen (Jain *et al.*, 2009; Louie *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2009). Mittlerweile wird für den Zeitraum der pH1N1-Pandemie von April 2009-August 2010 von insgesamt etwa 300 000-500 000 Todesfällen ausgegangen. Diese traten v.a. in Patienten mit vorausgegangenen Grunderkrankungen auf (Dawood *et al.*, 2012; Shieh *et al.*, 2010). Im Anschluss an die Pandemie verdrängte das 2009 pH1N1 Virus saisonal zirkulierende Stämme. Inzwischen ist es in der Bevölkerung etabliert und zusammen mit Influenza A Viren des H3 Subtyps und Influenza B Viren Auslöser der saisonalen Influenza.

Übertragung von HPAIV (H5, H7) auf den Menschen

Für die sporadische Übertragung von HPAIV auf den Menschen gelten Lebendgeflügelmärkte in großen Städten als unmittelbarer Ursprung (Webster *et al.*, 1992). 1997 wurden die ersten Übertragungen von H5N1 Viren auf den Menschen gemeldet. Die H5N1 Infektionen wiesen schwere Krankheitsverläufe auf und gingen mit akutem Atemnotsyndrom (ARDS, *acute respiratory distress syndrome*) und einer hohen Mortalität einher (sechs Tode bei 18 Fällen; Claas *et al.*, 1998a; 1998b; Subbarao *et al.*, 1998). Dieser H5N1-Ausbruch wurde durch das Keulen des Tierbestandes auf Geflügelmärkten in Hong Kong unter Kontrolle gebracht (Neumann *et al.*, 2009). Seit 2003 wird eine weitflächige Zirkulation von H5N1-Viren in Südostasien, dem mittleren Osten, Afrika und Europa gemeldet (Chen *et al.*, 2006c; Guan *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2006). Von 2003 bis heute wurden der WHO aus 15 Ländern 630 humane H5N1-Fälle gemeldet, von denen 375 zum Tod des Patienten führten (http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/Influenza_Summary_IRA_HA_interface_04Jun13.pdf, abgerufen am 19.06.2013). Zudem sind die H5N1-Viren inzwischen in vielen Geflügelpopulationen in Südostasien endemisch (Neumann *et al.*, 2009) und treten in einer hohen genetischen Diversität auf (Chen *et al.*, 2006c; Guan *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2006). Zu den bemerkenswerten Charakteristika der H5N1-Viren zählt, dass sie auch in Wasservögeln teilweise letal sein können. Weiterhin führen H5N1 Infektionen in einer Breite von Säugerspezies zu einer hohen Pathogenität und Letalität. Nur in einigen wenigen Fällen wurde von einer limitierten Mensch-zu-Mensch-Übertragung von H5N1-Viren berichtet (Ungchusak *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008). 2012 wurden zwei unabhängige Studien publiziert, in denen H5N1-Viren durch künstliche Adaptation an den Säuger die Fähigkeit zur Transmission erlangten. Dabei konnte gezeigt werden, dass im Frettchentransmissionsmodell die Fähigkeit über die Luft zu transmittieren mit Einbußen bei der Pathogenität einhergeht (Herfst *et al.*, 2012; Imai *et al.*, 2012). In der Studie von Herfst *et*

al. waren vier Mutationen im HA und eine in der Polymeraseuntereinheit PB2 nötig, um das H5N1-Virus zur Aerosolübertragung zu befähigen (Herfst *et al.*, 2012). Imai *et al.* beschrieben unabhängig davon ebenfalls vier Mutationen im HA, die für die Transmission nötig waren (Imai *et al.*, 2012). Die Ergebnisse demonstrierten zudem, dass fünf bis neun Aminosäureaustausche ausreichen, um ein H5N1 HPAIV im Frettchen über die Luft übertragbar werden zu lassen. Allerdings sind dies Befunde in Tiermodellen und lassen keine direkten Rückschlüsse hinsichtlich der Aerosolübertragbarkeit dieser adaptierten H5N1-Viren zwischen Menschen zu. Dennoch sind diese Befunde besorgniserregend, wenn man bedenkt, dass nur wenige Mutationen das Virus über die Luft übertragbar machen und damit die Voraussetzung für eine pandemische Ausbreitung in der menschlichen Bevölkerung erfüllen könnten.

Auch Übertragungen von HPAIVs des Subtyps H7N7 auf den Menschen wurden mehrfach beobachtet (Kurtz *et al.*, 1996; Webster *et al.*, 1981a). 2003 wurde in den Niederlanden eine Geflügelpest durch ein H7N7 Virus verursacht (Fouchier *et al.*, 2004; Koopmans *et al.*, 2004). Dieses Virus wurde daraufhin in 89 Personen detektiert, von denen 78 eine Konjunktivitis und fünf zusätzlich grippeähnliche Krankheitssymptome aufwiesen. Die Infektionen verliefen generell mild, nur in einem Fall trat eine Pneumonie in Kombination mit ARDS auf, die zum Tode führte. Der Patient dieses letalen Falles hatte als Veterinär direkten Kontakt zu infiziertem Geflügel, wobei wahrscheinlich die Exposition gegenüber einer hohen Viruslast für die direkte Übertragbarkeit verantwortlich war. Bis auf das Virus des letalen Falles, das 14 Aminosäureaustausche aufwies, zeigte keins der humanen Isolate eine Akkumulation signifikanter Mutationen (Fouchier *et al.*, 2004).

Erst kürzlich wurde die Übertragung eines neuen, bislang in der menschlichen Bevölkerung, unbekanntem Influenzavirus aviärer Herkunft des H7N9 Subtyps auf den Menschen gemeldet. Das H7N9 Virus trat erstmalig Ende Februar/Anfang März 2013 in der chinesischen Bevölkerung auf (Gao *et al.*, 2013). Es konnte aus Atemwegsproben von drei Patienten isoliert werden, in denen es zu rasch voranschreitenden und schweren Infektionen des unteren Respirationstraktes geführt hatte, die zudem tödlich verliefen. Zu den Krankheitssymptomen der H7N9 Infektion zählen Atemnot, ARDS, Fieber, Husten und Multiorganversagen (Gao *et al.*, 2013). Der WHO wurden seit dem ersten Auftreten Ende Februar 2013 bis heute 132 H7N9-Fälle gemeldet, von denen 37 einen tödlichen Ausgang hatten (http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/influenza_h7n9/Data_Reports/en/index.html, abgerufen am 19.06.2013). Eine Sequenzanalyse zeigte, dass es sich bei den humanen H7N9-Isolaten um eine Reassortante mit sechs internen Genen aus zwei aviären H9N2-Viren, sowie dem monobasischen H7-HA eines H7N3 Virus aus Wildenten und dem N9-NA eines H7N9 Virus aus Wildvögeln handelt (Gao *et al.*, 2013). In entsprechenden

humanen H7N9 Isolaten wurden u.a. die Mutationen in der Polymeraseuntereinheit PB2 (E627K, D701N) und im HA (Q226L, T160A) nachgewiesen, die mit der Adaptation an den Menschen einhergehen (Gao *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013; Watanabe *et al.*, 2013).

Prävention und Therapie

Die Impfung stellt die wichtigste Maßnahme gegen eine Infektion mit Influenzaviren dar. Die verfügbaren Impfstoffe sind größtenteils gegen die saisonalen Influenzaviren gerichtet. Aufgrund der durch den *antigenic drift* hervorgerufenen, hohen Variabilität in den HA- und NA-Proteinen müssen diese Impfstoffe zudem jährlich an die aktuell zirkulierenden Virussubtypen bzw. Subtypvarianten und damit an die aktuelle epidemiologische Situation angepasst werden (Modrow *et al.*, 2003). Für die aktuellen trivalenten Impfstoffe (Saison 2013/14, nördliche Hemisphäre) wird empfohlen, dass sie ein A/California/7/2009 (pH1N1)-artiges Virus (A/Christchurch/16/2010 (pH1N1)), ein A(H3N2)-Virus (A/Texas/50/2012 (H3N2)¹) und ein B/Massachusetts/2/2012-ähnliches Virus (B/Wisconsin/1/2010) enthalten (http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2013_14_north/en/index.html, abgerufen am 19.06.2013). Größtenteils sind die verwendeten Impfstoffe inaktivierte Totimpfstoffe, teils jedoch auch lebendattenuierte Impfstoffe. Die inaktivierten Totimpfstoffe werden in Spaltimpfstoffe und Untereinheitenimpfstoffe, die nur die Oberflächenantigene der aktuell zirkulierenden Influenzastämme enthalten, unterteilt (Neumann *et al.*, 2009). Die inaktivierten, zumeist im embryonierten Hühnerei generierten, Influenzaimpfstoffe werden intramuskulär oder subkutan verabreicht. Sie zeigen in Kindern und jungen Erwachsenen eine Wirksamkeit von 60-80 %, während diese in Personen über 60 niedriger ist (Neumann *et al.*, 2009). Im Falle einer Pandemie und auch der jährlichen Epidemien, werden Impfstoffe gegen den neuen Subtyp benötigt, deren Produktion jedoch eine gewisse Zeit dauert. Daher liegen zur Behandlung der Influenzainfektion und zur Begrenzung der weiteren Ausbreitung therapeutisch wirksame, antivirale Medikamente vor. Hierbei sind zwei Klassen von Medikamenten hervorzuheben, die zur Behandlung genehmigt sind: Die Ionenkanalinhibitoren (Amantadin, Rimantadin) und die Neuraminidaseinhibitoren (Oseltamivir, Zanamivir). Die Adamantanderivate blockieren den Protoneneinstrom durch den Ionenkanal des viralen M2-Proteins, der für die anschließende Freisetzung der viralen Ribonukleoproteinkomplexe ins Zytoplasma essentiell ist (1.1.7.2; Davies *et al.*, 1964; Neumann *et al.*, 2009). Dadurch wird die Ansäuerung des Virions, die für die Freisetzung der viralen Ribonukleoproteinkomplexe in das Zytoplasma der Wirtszelle notwendig ist, verhindert. Jedoch treten durch Mutationen im Transmembranbereich des M2-Proteins schnell und häufig Resistenzen gegen die Adamantane auf. Aktuell zirkulierende

¹ entspricht antigenisch dem in Zellen propagierten Prototypvirus A/Victoria/361/2011 (H3N2)

Influenzaviren sind bereits gegenüber den Adamantanen komplett resistent und ihre Anwendung wird daher nicht mehr empfohlen (Bright *et al.*, 2006; Dawood *et al.*, 2009; Neumann *et al.*, 2009). Die NA-Inhibitoren hemmen durch kompetitive Inhibierung die enzymatische Aktivität des NA-Proteins und verhindern dadurch die effiziente Freisetzung neusynthetisierter Viruspartikel von der Zelloberfläche. Auch die Resistenz gegen die NA-Inhibitoren ist in den letzten Jahren weltweit stark angestiegen (Poland *et al.*, 2009), so dass alternative Antiviralia gegen konservierte Viruskomponenten, wie z.B. die Polymerase, dringend benötigt werden. Neue antivirale Medikamente, die die Neuraminidase oder die Polymerase des Virus als Angriffsziel haben, sind derzeit in unterschiedlichen Phasen der klinischen Studien (Neumann *et al.*, 2009).

1.1.4 Morphologie

Influenza A Viren sind umhüllte sphärische oder filamentöse Viruspartikel. In der sphärischen Form haben sie einen Durchmesser von 80-120 nm (Abb. 2; Bouvier und Palese, 2008; Webster *et al.*, 1992), während die filamentösen Partikel bis zu 300 nm lang sein können. In die Lipidhülle des Virus, die sich von der Doppellipidmembran der Wirtszelle ableitet, sind die beiden viralen Oberflächenglykoproteine eingebettet. Das Hämagglutinin (HA) und die Neuraminidase (NA) kommen in einem Verhältnis von etwa 4:1 im Virion vor und ihre Glykoproteinfortsätze ragen aus seiner Lipidhülle heraus (Abb. 2; Knipe und Howley, 2006). Eine geringe Anzahl von Matrix- (M2) Ionenkanälen durchzieht die Hüllmembran des Virus mit einem M2 zu HA-Verhältnis von 1:100 (Zebedee und Lamb, 1988).

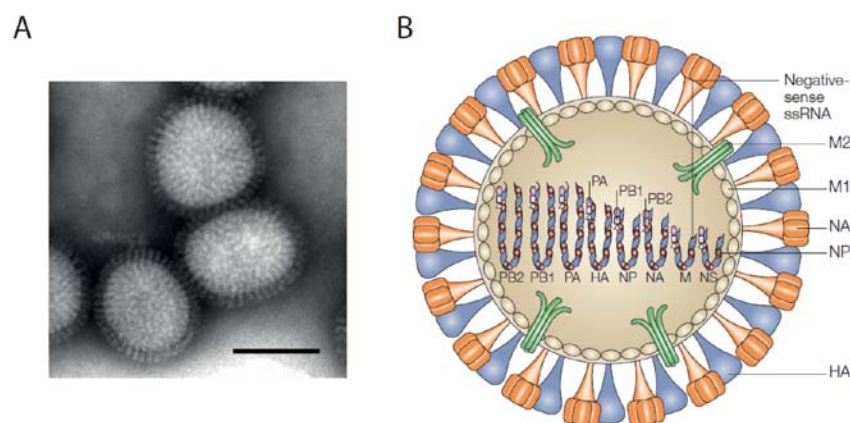


Abb. 2: Morphologie des Influenza A Virions. (A) Aufgereinigte Influenzaviruspartikel visualisiert durch Negativkontrast-Elektronenmikroskopie. Die sphärischen Virionen haben einen Durchmesser von ca. 120 nm und sind von den Glykoproteinfortsätzen der HA- und NA-Proteine bedeckt. Maßstab: 100 nm. (B) Schematische Darstellung eines Influenzaviruspartikels. Die zwei Oberflächenglykoproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) sowie der M2-Ionenkanal sind in die Virushülle, die von der Doppellipid-Plasmamembran der Wirtszelle abgeleitet ist, eingebettet. Jeder Ribonukleoproteinkomplex (vRNP) enthält ein virales RNA-Segment, das von vielen Nukleoproteinmonomeren (NP) enkapsidiert ist (Baudin *et al.*, 1994; Compans *et al.*, 1972; Murti *et al.*, 1988). An die Enden jedes viralen RNA-Segments ist die heterotrimäre virale Polymerase (PB1, PB2 und PA) assoziiert (Compans *et al.*, 1972; Horimoto und Kawaoka, 2005; Tao und Zheng, 2012). Das Matrixprotein M1 ist sowohl mit den vRNP-Komplexen, als auch mit der Virushülle verbunden. Eine kleine Menge nichtstrukturellen NS2/NEP-Proteins ist ebenfalls vorhanden, wobei die genaue Lokalisation unbekannt ist. (modifiziert nach Horimoto und Kawaoka, 2005 und Noda und Kawaoka, 2010).

Die Virushülle aus HA, NA und M2 überlagert eine Matrix des M1-Proteins, die den Viruskern umschließt. Im Kern des Virions befinden sich die acht viralen Ribonukleoproteinkomplexe (vRNP-Komplex) sowie das Kernexportprotein (NEP, auch Nichtstrukturprotein 2 (NS2)). Die vRNPs bestehen aus den viralen, von vielen Nukleoproteinmonomeren (NP) umhüllten RNA-Segmenten an deren Enden die heterotrimäre RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP), bestehend aus den Untereinheiten PB1, PB2 und PA, assoziiert ist (Abb. 2B; Bouvier und Palese, 2008).

1.1.5 Genomaufbau

Das Influenza A Virusgenom ist etwa 13,6 kb groß und besteht aus acht individuellen Segmenten negativorientierter, einzelsträngiger RNA (-ss-RNA-Genom), die damit komplementär zur mRNA (+ss-RNA) vorliegen. Ein derart segmentiertes Genom ermöglicht es dem Influenzavirus durch Reassortierung RNA-Segmente eines anderen Subtyps zu erhalten (*antigenic shift*; Bouvier und Palese, 2008). Die acht Genomsegmente, die nach ihrer Länge durchnummeriert sind, kodieren nach aktuellem Kenntnisstand für mindestens 13 virale Proteine (Tab. 2; Jagger *et al.*, 2012).

1.1.6 Der virale Ribonukleoproteinkomplex (vRNP)

Für die Synthese viraler mRNA und die Replikation ihres -ssRNA-Genoms benötigen Influenzaviren eine RNA-abhängige RNA-Polymerase. Bei der Infektion gelangt diese in Form des viralen Ribonukleoproteinkomplexes (vRNP-Komplex) zusammen mit weiteren Viruskomponenten in die Zelle (Modrow *et al.*, 2003). Jeder vRNP besteht aus den viralen -ssRNA-Segmenten, die vom Nukleoprotein in stöchiometrischem Verhältnis umhüllt sind, und an deren zu einer doppelhelikalen Haarnadelstruktur gewundenen 5'- und 3'-Enden die virale RNA-Polymerase assoziiert ist (Abb. 3A, C; Resa-Infante *et al.*, 2011). Diese heterotrimäre Polymerase ist ein 250 kDa großer, multifunktionseller Enzymkomplex und setzt sich aus den beiden basischen Polymeraseproteinen PB1 und PB2 und dem sauren Polymeraseprotein PA zusammen (Bouvier und Palese, 2008; Resa-Infante *et al.*, 2011). Die 5'- und 3'-Enden sind nichtkodierende Bereiche unterschiedlicher Länge, wobei die äußersten Enden in allen Segmenten hochkonserviert und teils komplementär zueinander sind (Hsu *et al.*, 1987; Klumpp *et al.*, 1997). Diese 12-13 nt langen, korkenzieherförmigen Duplex-vRNA-Regionen fungieren als Bindestellen und Promotoren für die virale RNA-Polymerase bei der vRNA-Replikation und -Transkription (Flick und Hobom, 1999; Naffakh *et al.*, 2008). Außerdem enthalten sie Signale für die mRNA-Polyadenylierung und den Viruszusammenbau. Kürzlich wurde erstmals die Struktur von vRNPs mittels Kryo-EM-Rekonstruktionen aufgeklärt und charakterisiert (Abb. 3D-G; Arranz *et al.*, 2012; Moeller *et al.*, 2012).

Tab. 2: Die Genomsegmente von Influenza A Viren und ihre Genprodukte

Segment	Länge	Protein	Molekulargewicht	Proteinfunktion
1	2341 bp	PB2	80 kDa	basisches Polymeraseprotein 2: Komponente des RNP- und Polymerasekomplexes: Erkennung und Binden der 5'-Cap-Struktur der zellulären mRNA
2	2341 bp	PB1	90 kDa	basisches Polymeraseprotein 1: Komponente des RNP- und Polymerasekomplexes: RNA-abhängige RNA-Polymerase: Elongation
		PB1-F2	10 kDa	reguliert Apoptose und virale Polymeraseaktivität (Chen <i>et al.</i> , 2001; Knipe und Howley, 2006)
		PB1-N40	82 kDa	unbekannte Funktion (Wise <i>et al.</i> , 2009)
3	2233 bp	PA	83 kDa	saures Polymeraseprotein: Komponente des RNP- und Polymerasekomplexes, Endonukleaseaktivität, Serinproteaseaktivität
		PA-X	29 kDa	enthält Endonukleasedomäne des PA-Proteins fusioniert mit einer C-terminalen Domäne des X-ORF; moduliert Immunantwort des Wirtes (Jagger <i>et al.</i> , 2012)
4	1778 bp	HA	77 kDa	Hämagglutinin: Oberflächenglykoprotein, Induktion neutralisierender Antikörper, Rezeptorbindung, Fusion
5	1565 bp	NP	55 kDa	Nukleoprotein: Komponente des RNP-Komplexes, RNA-Bindung, RNA-Synthese, Kernimport
6	1413 bp	NA	56 kDa	Neuraminidase: Oberflächenglykoprotein, Sialidaseaktivität, Funktion bei Virusfreisetzung, Induktion von Antikörpern
7	1027 bp	M1	28 kDa	Matrixprotein 1: vRNP-Interaktion, RNP-Kernexport, Abknospung und Virusfreisetzung
		M2	15 kDa	Matrixprotein 2: Membranprotein & Ionenkanal, vermittelt Freisetzung der vRNPs ins Zytoplasma und den Viruszusammenbau
8	890 bp	NS1	26 kDa	Nichtstrukturprotein 1: Multifunktionelles Protein, Interferonantagonist, Regulierung der zellulären Genexpression
		NS2/NEP	11 kDa	Nichtstrukturprotein 2/Kernexportprotein: Regulatorisches Protein, Funktion bei vRNP-Export

Die PB2-, PA-, HA-, NP- und NA-Proteine werden auf je einem separaten RNA-Segment kodiert. M2 und NEP werden beide durch alternativ gespleißte mRNAs exprimiert, während PB1-F2 in einem +1 alternativen offenen Leserahmen (ORF) kodiert ist. PB1-N40 und PA-X werden ebenfalls in alternativen ORFs kodiert, die durch ribosomales *frameshifting* zugänglich werden (modifiziert nach Bouvier und Palese, 2008; Dias *et al.*, 2009; Jagger *et al.*, 2012; Knipe und Howley, 2006; Modrow *et al.*, 2003; Wise *et al.*, 2009).

Bis dahin war lediglich bekannt gewesen, dass vRNPs stabförmige, flexible Strukturen mit einem Durchmesser von etwa 10 nm sind (Moeller *et al.*, 2012). Nach den beiden neuen Studien konnte gezeigt werden, dass vRNPs einen Durchmesser von ~15 nm haben und der M-Segment vRNP ~65 nm lang ist (Arranz *et al.*, 2012). Da sie einen einheitlichen Durchmesser besitzen, korreliert die Länge eines vRNPs (30-110 nm) mit der Größe des assoziierten vRNA-Segments (Zheng und Tao, 2013).

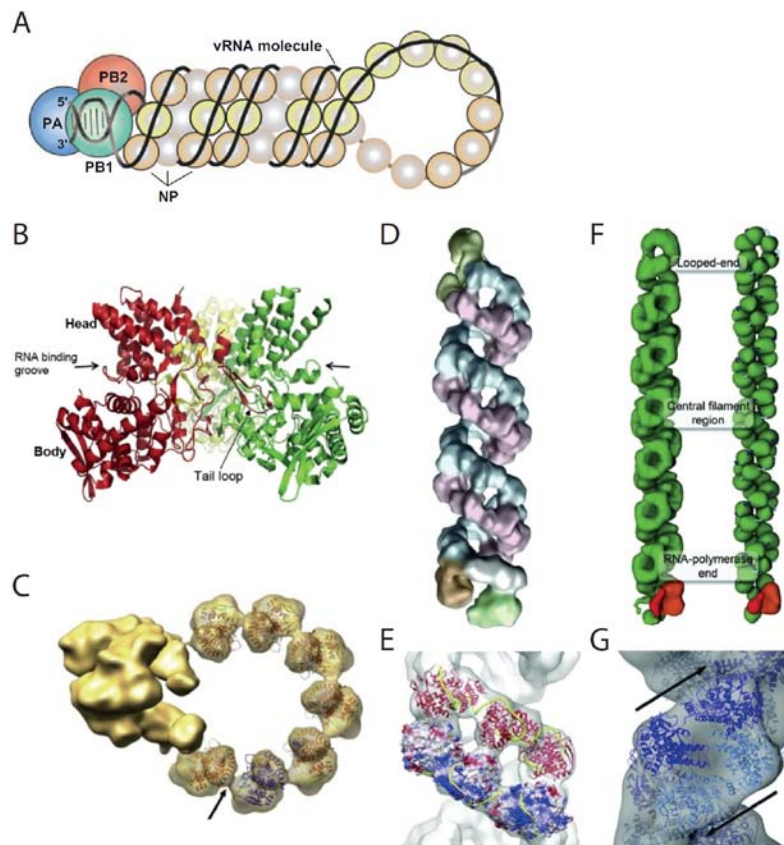


Abb. 3: Die Struktur des Influenza A Virus RNPs. (A) Schematisches Modell der pseudozirkulären Influenzavirus Ribonukleoproteinstruktur (RNP). Die virale -ssRNA (schwarze Linie) ist in einer Haarnadelstruktur gewunden und durch viele argininreiche Nukleoproteinmonomere (NP, gelbe Kugeln) enkapsidiert, wobei die positive Nettoladung das negativgeladene Rückgrat der RNA bindet (Baudin *et al.*, 1994; Compans *et al.*, 1972; Murti *et al.*, 1988). Eine kurze Duplex-vRNA-Region (12-13 nt zwischen den 5'- und 3'-Enden) stellt die Bindestelle der heterotrimeren RNA-abhängigen RNA-Polymerase dar. (B) Röntgenkristallstruktur des homotrimeren Influenzavirus NPs (Ye *et al.*, 2006). (C) Kryo-EM-Rekonstruktion des rekombinanten mini-RNPs. Die NP-Kristallstruktur aus (B) wurde der Elektronendichte überlagert. Pfeile markieren benachbarte Elektronendichten, die vermutlich aus vRNA und der oligomerisierten NP-*tail loop* Domäne bestehen (Area *et al.*, 2004; Coloma *et al.*, 2009; Martín-Benito *et al.*, 2001). (D) Kryo-EM-Rekonstruktion des doppelhelikalen RNPs von Arranz *et al.* (Arranz *et al.*, 2012). Die virale Polymerase befindet sich am unteren Ende des RNPs (grün und orange). Die zwei gegenläufigen NP-RNA-Stränge sind in blau und pink dargestellt, der NP-RNA *turning loop* am oberen Ende des RNP in dunkelgrün. (E) Die helikale Stammregion des RNP aus (D) übereinandergelagert mit der NP-Kristallstruktur und im Komplex mit RNA (gelb) dargestellt. (F) Kryo-EM-Rekonstruktion des RNPs von Moeller *et al.* (Moeller *et al.*, 2012). Das Modell zeigt die RNP-Organisation inklusive der viralen Polymerase (rot). (G) Zentrale Filamentregion aus (F) übereinandergelagert mit NP-Kristallstrukturprotomeren. Pfeile markieren die RNA-Polarität (modifiziert nach Naffakh *et al.*, 2008 und Zheng und Tao, 2013).

Weiterhin besteht der vRNP aus einer doppelhelikalen Struktur mit zwei antiparallelen Strängen (Auflösung: 20 Å; Abb. 3D-G). Nach Moeller *et al.* weist die rechtsgängige, doppelhelikale Stammregion zwischen zwei benachbarten NP-Molekülen eine Steigung von

32,6 Å mit 4,9 NP-Molekülen pro Windung auf (Abb. 3F-G; Moeller *et al.*, 2012). Arranz *et al.* publizierten ähnliche Daten mit einer Steigung von 28,4 Å zwischen benachbarten NPs, einem linksgängigen Rotationswinkel von 60 ° und 6 NP-Monomeren pro Windung auf jedem Strang (Abb. 3D-E; Arranz *et al.*, 2012). In der doppelhelikalen Stammstruktur befinden sich zudem große und kleine Furchen des internen NP-Gerüsts, die auf der äußeren Oberfläche des RNPs lokalisiert sind (Abb. 3D-G; Arranz *et al.*, 2012; Moeller *et al.*, 2012). Vermutlich dient die positivgeladene Furche als putative RNA-Bindestelle für ca. 120-150 RNA-Nukleotide pro helikaler Windung (Arranz *et al.*, 2012; Zheng und Tao, 2013). Die neuen Strukturen bestätigen zudem, dass die Polymerase das offene Ende der Haarnadelstruktur bindet und dort mit den 5'- und 3'-Enden der vRNA interagiert. Am anderen Ende der vRNPs wird die Schlaufe durch eine gekrümmte Anordnung von 3 bis 8 NP-Molekülen geformt (Tao und Zheng, 2012). Frühere EM-Studien hatten ebenfalls auf doppelhelikale Strukturen der RNPs hingedeutet. Die neuen Erkenntnisse konnten nun die strukturelle Basis dieser Strukturen auf der molekularen Ebene aufklären (Tao und Zheng, 2012).

1.1.6.1 Das Nukleoprotein (NP)

Das Nukleoprotein ist das zweithäufigste Protein im Influenzavirion. Bei der Infektion unterliegt es posttranslationalen Modifikationen wie z.B. Phosphorylierung (Bui *et al.*, 2002; Chenavas *et al.*, 2013) und SUMOylierung (Pal *et al.*, 2011). Diese Modifikationen sind abhängig von der Wirtszelle, beeinflussen die Funktion des NPs und spielen eventuell bei der Restriktion des Wirtsspektrums eine Rolle. Die in der infizierten Zelle in großer Menge neu synthetisierten NP-Moleküle stellen nach ihrem Kernimport das Gerüst für die virale RNA (vRNA) und *complementary* RNA (cRNA) und erleichtern so die Bildung der doppelhelikalen RNP-Struktur (Ng *et al.*, 2012; 2008; Ye *et al.*, 2006). Neben dieser strukturellen Hauptfunktion wird vermutet, dass die steigende NP-Konzentration während der Infektion den Wechsel von der Transkription zur Replikation des viralen Genoms auslöst (Webster *et al.*, 1992). Zudem kann die virale Polymerase in Abwesenheit von NP nicht replizieren (Resa-Infante *et al.*, 2011). Das NP interagiert aufgrund seiner Multifunktionalität mit einer Vielzahl viraler (z.B. PB1, PB2, M1) und zellulärer Proteine (z.B. RAF-2p48/UAP56, Tat-SF1, Importin- α Isoformen; Portela und Digard, 2002). Das NP ist weiterhin eines der Hauptangriffsziele der zytotoxischen T-Zellantwort des Wirts (Webster *et al.*, 1992).

1.1.6.2 Das basische Polymeraseprotein PB2

Die PB2-Untereinheit der Polymerase sorgt während des Beginns der viralen mRNA-Transkription für die Erkennung und Bindung der 5'-N7-Methylguanosin-Cap-Struktur (5'-m7G-Cap) der zellulären prä-mRNAs und vermittelt damit den Mechanismus des *Cap-Snatchings*. Diese 5'-Cap-Strukturen werden von der viralen Polymerase als Primer bei der

viralen Transkription benötigt (Dias *et al.*, 2009; Naffakh *et al.*, 2008). Das *Cap-Snatching* hat für das Virus zusätzlich den Vorteil, dass es die zellspezifische Transkription und Translation unterbricht und den Wirtsstoffwechsel auf die Bedürfnisse der Virusinfektion umschaltet. So wird erreicht, dass fast nur noch Virusgene transkribiert und translatiert werden (Modrow *et al.*, 2003). Für die Bindung der 5'-Cap-Strukturen ist die Cap-Bindedomäne (aa318–483) verantwortlich (Abb. 4; Guilligay *et al.*, 2008). Weiterhin findet sich im PB2-Molekül eine Domäne, die bei der Wirtsadaptation von großer Bedeutung ist (aa538–676, siehe 1.1.8.1; Tarendeau *et al.*, 2007) und eine C-terminale NLS-Domäne, die die Bindung an zelluläre Importine vermittelt, für den Kernimport essentiell ist und ebenfalls wichtige wirtsadaptive Signaturen enthält (aa686–757, siehe 1.1.8.2, 1.2.4 und 1.2.5; Tarendeau *et al.*, 2008).

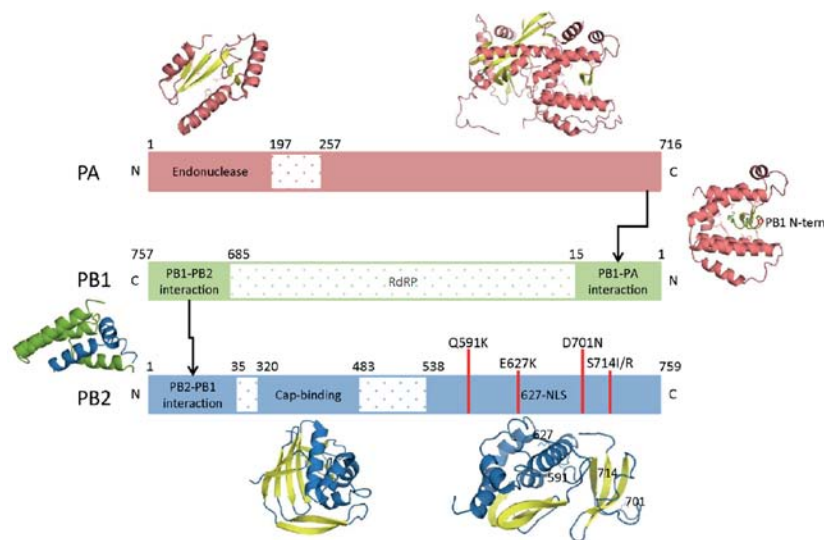


Abb. 4: Struktur und funktionelle Domänen der Influenza A Virus Polymerase. Die einzelnen Untereinheiten sind als Balken dargestellt, in denen die N- und C-terminalen Enden markiert sind. Die drei Untereinheiten bisher bekannter Tertiärstrukturen (schattierte Bereiche und Kristallstrukturen) sind gezeigt. Bei diesen handelt es sich um die Endonukleasedomäne am N-Terminus von PA (Dias *et al.*, 2009), die C-terminale PA-Domäne, die Interaktionsdomänen am C-Terminus von PA und N-Terminus von PB1 (He *et al.*, 2008), die Interaktionsdomänen am C-Terminus von PB1 und N-Terminus von PB2 (Sugiyama *et al.*, 2009), die 5'm7G-Cap-Bindedomäne von PB2 (Guilligay *et al.*, 2008) und die 627-NLS-Domäne von PB2 (Tarendeau *et al.*, 2008). Die wirtsadaptiven Mutationen an der Position 13 von PB1 und den Positionen 591, 627, 701 und 714 von PB2 sind ebenfalls gekennzeichnet (modifiziert nach Gabriel *et al.*, 2013). RdRP, RNA-abhängige RNA-Polymerase.

1.1.6.3 Das saure Polymeraseprotein PA

Die PA-Untereinheit der viralen Polymerase wird zusammen mit PB1 und PB2 sowohl für die virale Transkription, als auch für die Replikation benötigt (Naffakh *et al.*, 2008). Sie besitzt eine 25 kDa große N-terminale Domäne, die beim *Cap-Snatching* die notwendige Endonukleaseaktivität zur Abspaltung der gebundenen, zellulären prä-mRNAs stellt (Dias *et al.*, 2009; Naffakh *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2009). Eine 55 kDa große C-terminale Domäne vermittelt die PA-PB1-Interaktion (Guu *et al.*, 2008; Hara *et al.*, 2006).

1.1.6.4 Das basische Polymeraseprotein PB1

PB1 ist die größte Untereinheit der viralen Polymerase und verantwortlich für die Elongation der entstehenden viralen mRNA, cRNA und vRNA (Naffakh *et al.*, 2008; Webster *et al.*, 1992). Sie beinhaltet sowohl das katalytisch aktive Zentrum der Polymerase (Biswas und Nayak, 1994; Kobayashi *et al.*, 1996; Poch *et al.*, 1989) als auch die spezifischen Domänen zur Bindung der konservierten 5'- und 3'-Enden der vRNA (Fodor *et al.*, 1993). Das N-terminale Ende von PB1 (aa1-25) interagiert im Polymerasekomplex mit PA (He *et al.*, 2008; Obayashi *et al.*, 2008), während das C-terminale Ende zur Interaktion mit dem N-Terminus von PB2 befähigt ist (Sugiyama *et al.*, 2009).

1.1.7 Replikationszyklus

Der Replikationszyklus der Influenzaviren (Abb. 5) gliedert sich in Adsorption, rezeptorvermittelte Endozytose, Freisetzen der vRNPs ins Zytoplasma, Transkription und Replikation des viralen Genoms, Synthese viraler Proteine und neuer genomischer vRNA, Viruszusammenbau und Freisetzung der Nachkommenviren durch Abknospung (Knipe und Howley, 2006; Neumann *et al.*, 2009).

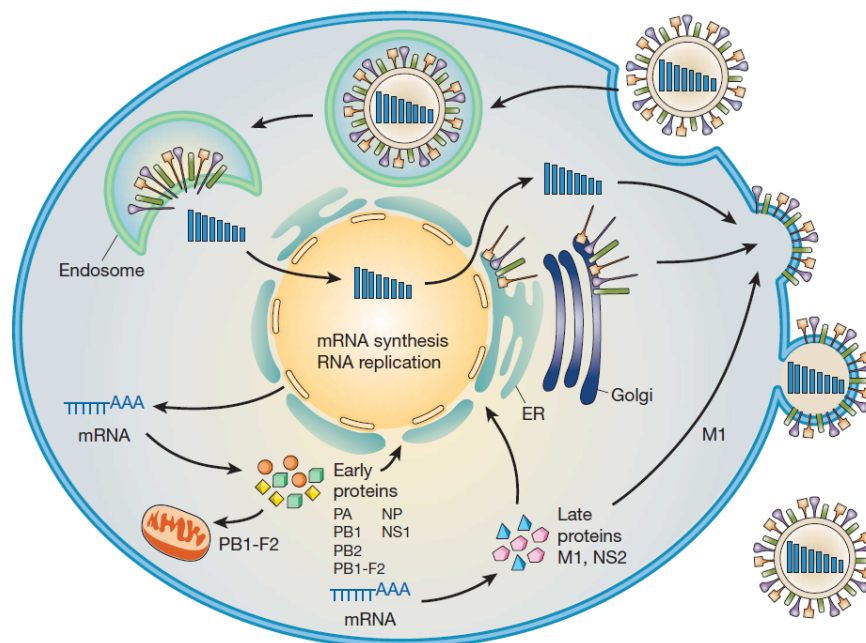


Abb. 5: Schematische Darstellung des Influenza A Virus Replikationszyklus. Nach rezeptorvermittelter Endozytose werden die viralen Ribonukleoprotein-Komplexe (vRNP) in das Zytoplasma freigesetzt und zur Replikation und Transkription in den Nukleus transportiert. mRNAs werden zur Translation ins Zytoplasma exportiert. Die frühen viralen Proteine, die für die Replikation und Transkription benötigt werden, werden zurück in den Nukleus transportiert. Spät während des Replikationszyklus ermöglichen die M1- und NS2-Proteine den Kernexport der neusynthetisierten vRNPs. PB1-F2 assoziiert mit den Mitochondrien. Der Zusammenbau und die Abknospung der Nachkommenviren geschieht an der Plasmamembran (aus Neumann *et al.*, 2009).

1.1.7.1 Adsorption und rezeptorvermittelte Endozytose

Bei der Adsorption des Influenzavirus an die Wirtszelloberfläche bindet das virale, durch proteolytische Spaltung aktivierte Hämagglutinin an endständige, Galaktose-konjugierte N-Acetylneuraminsäuren (Sialinsäuren) zellulärer Glykoproteine oder -lipide (Webster *et al.*, 1992). Nach Bindung des HAs über seine Rezeptorbindedomäne (HA₁) an die Sialinsäuren der Wirtszelle gelangt der Viruspartikel durch rezeptorvermittelte Endozytose in Clathrin-umhüllten Vesikeln in die Wirtszelle (Zheng und Tao, 2013).

1.1.7.2 Membranfusion und vRNP Freisetzung

Als nächstes werden die viralen Genomsegmente aus dem Viruspartikel und Endosom freigesetzt, um ins Zytoplasma der Wirtszelle zu gelangen. Hierfür ist die Ansäuerung des Endosoms entscheidend. Hierdurch wird eine Konformationsänderung des HAs ausgelöst, die in der Exponierung eines C-terminalen Fusionspeptides (HA₂) resultiert. Dieses vermittelt die Fusion der viralen Hüllmembran mit der Endosomenmembran, wodurch eine Pore entsteht (Sieczkarski und Whittaker, 2005; Stegmann, 2000). Die Ansäuerung des Endosoms führt gleichzeitig zu einem Protoneneinstrom durch den viralen M2-Ionenkanal in das Virion. Dadurch werden die Interaktionen der NPs mit den M1-Proteinen gelöst und die Freisetzung der vRNPs von der viralen Matrix ermöglicht. Letztendlich führt dies zur Entlassung der viralen RNPs in das Zytoplasma der Wirtszelle (Martin und Helenius, 1991; Webster *et al.*, 1992).

1.1.7.3 Kernimport der viralen RNP-Komplexe

Im Gegensatz zu den meisten RNA-Viren transkribieren und replizieren Influenzaviren ihr Genom im Zellkern der infizierten Wirtszelle. Hierfür ist ein effizienter Kernimport der aus dem Endosom freigesetzten vRNPs essentiell (Resa-Infante *et al.*, 2011). Die zelluläre Kernimportmaschinerie des Wirts wird für diesen aktiven, über Kernlokalisationssequenzen (NLS) der viralen RNPs und weiterer viraler Proteine vermittelten Transport genutzt, der ausführlicher in 1.2.5 diskutiert wird (Cros und Palese, 2003; Zheng und Tao, 2013).

1.1.7.4 Transkription und Replikation des viralen Genoms

Im Nukleus dienen die vRNPs als aktive Matrizen für die Synthese viraler mRNA (primäre Transkription) und anti-genomischer cRNA in Form von cRNP-Komplexen. Die cRNPs sind Replikationsintermediate positiver RNA-Polarität, die die Synthese neu entstehender genomischer vRNPs in Negativorientierung steuern (Abb. 6). Die Initiierung der mRNA-Synthese durch die RNP-assoziierte virale RNA-Polymerase beginnt mit dem *Cap-Snatching*-Mechanismus (Krug, 1981), bei dem das PB2-Protein die 5'-m7G-Cap-Struktur

zellulärer Prä-mRNAs bindet und diese ans 3'-Ende der viralen RNA-Segmente anlagert (Krug *et al.*, 1979; Modrow *et al.*, 2003; Naffakh *et al.*, 2008). Mit dem terminalen Nukleotid der vRNA-Segmente, das immer ein Uridin ist, hybridisiert ein Adeninrest in den ersten 10-13 Basen der zellulären Prä-mRNA.

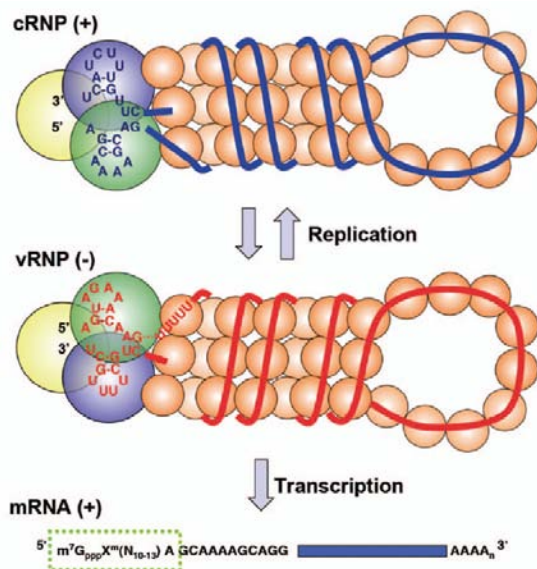


Abb. 6: Strukturelle und mechanistische Unterschiede zwischen der Transkription und Replikation von Influenza A Viren. Der helikale vRNP (Mitte) besteht aus der in negativer Polarität vorliegenden *template*-RNA (rot), den enkapsidierenden NP-Monomeren (orange) und der assoziierten Polymerase aus den Untereinheiten PB1 (blau), PB2 (grün) und PA (gelb). Die Korkenzieherstruktur des Promotors (Flick und Hobom, 1999) inklusive des Polyadenylierungssignals (oligoU) ist gekennzeichnet. Das Transkriptionsprodukt ist mRNA positiver Polarität mit einer 5'-Cap-Struktur (grüne Box) und einem 3'-Poly(A)-Schwanz. Die Struktur des cRNP-Replikationsintermediates, inklusive der Matrizen-cRNA positiver Polarität (blau) und der Promotorelemente, ist zuoberst aufgeführt (aus Resa-Infante *et al.*, 2011).

Eine dem PA eigene Endonukleaseaktivität spaltet die gebundene Prä-mRNA beim Adenin und erzeugt ein freies 3'-OH-Ende, das als Primer für die folgenden Polymerisationsschritte dient (Dias *et al.*, 2009). Anschließend ist die Nukleotidyltransferasedomäne des PB1-Proteins für die Elongation der viralen mRNA verantwortlich, wobei die vRNA als Matrize dient (Ruigrok *et al.*, 2010). Die Terminierung der mRNA-Synthese und die Polyadenylierung finden bei einer oligo(U)-Sequenz nahe dem 5'-Ende der vRNA statt. Im Gegensatz zu zellulären mRNAs, die durch eine spezifische Poly(A)-Polymerase polyadenyliert werden, ist der Poly(A)-Schwanz der viralen mRNA schon in der vRNA negativer Polarität in Form eines Abschnitts von fünf bis sieben Uracilresten kodiert (Li und Palese, 1994; Luo *et al.*, 1991; Robertson *et al.*, 1981). Außer für die Transkription werden die vRNPs auch für die Replikation des viralen Genoms verwendet. Diese ist primerunabhängig und resultiert in der Generierung von cRNA, die wiederum als Matrize für neue vRNA-Moleküle dient (Naffakh *et al.*, 2008). Für die Replikation, die in zwei Phasen stattfindet, werden neusynthetisierte virale Proteine benötigt, da die cRNAs und vRNAs noch während ihrer Entstehung in RNPs enkapsidiert werden (Hay *et al.*, 1977; Zheng und Tao, 2013). Daher werden zuerst cRNAs positiver Polarität synthetisiert, die als Replikationsintermediate zur Synthese großer Mengen von vRNPs dienen. Diese können dann entweder als Matrizen für die späte (sekundäre) Transkription dienen oder nach Kernexport in neu entstehende Virionen an der Plasmamembran inkorporiert werden (Elton *et al.*, 2005; Neumann *et al.*, 2004).

1.1.7.5 Translation viraler Gene und Virusreifung

Zur Translation viraler mRNA positiver Polarität wird die Proteinsynthesemaschinerie der Wirtszelle genutzt. Hierbei spielt auch die Kerntransportmaschinerie des Wirtes eine essentielle Rolle. Sie bewerkstelligt sowohl den Export viraler mRNAs und vRNPs, als auch den Import neu translatierter NP-, PB1-, PB2- und PA-Proteine zur Bildung neuer RNPs im Kern (Resa-Infante *et al.*, 2011; Zheng und Tao, 2013). Durch Interaktion der M1- und NEP-Proteine des Virus mit dem zellulären Exportprotein hCRM1 wird der Export viraler mRNA und vRNPs durch die Kernporen ins Zytoplasma vermittelt (Bouvier und Palese, 2008; Cros und Palese, 2003; Zheng und Tao, 2013). Der Kernexport und die Translation sind dabei nur für polyadenylierte und mit einer 5'm7G-Cap versehene virale mRNAs möglich (Cros und Palese, 2003). Die Proteine der Virushülle, HA, NA und M2, werden an membrangebundenen Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums aus viraler mRNA synthetisiert, gefaltet, im Golgi-Apparat posttranslational modifiziert und zur Zellmembran befördert (Bouvier und Palese, 2008). Alle drei Proteine besitzen apikale Signale für die Beförderung zur Zellmembran und dortigen Verpackung in neue Virionen. Die Interaktion der vRNPs mit M1 verhindert zudem ihren Wiedereintritt in den Nukleus und fördert ihren Transport zur Zellmembran (Bouvier und Palese, 2008). Influenzavirionen sind nur dann infektiös, wenn sie ein vollständiges Genom enthalten. Neue Ergebnisse zeigen, dass der Verpackungsprozess ein selektiver Prozess ist. Dieser spezifische Mechanismus, der über individuelle Verpackungssignale an den Enden aller vRNA-Segmente vermittelt wird, kontrolliert die Verteilung der vRNP-Komplexe (Noda, 2012; Noda und Kawaoka, 2010; Noda *et al.*, 2012). Dabei stellen die Verpackungssignale sicher, dass die Mehrheit der Viruspartikel ein komplettes Genom mit acht Segmenten erhält (Bancroft und Parslow, 2002; Fujii *et al.*, 2003; Noda *et al.*, 2006). Die Abknospung der neuverpackten Influenzavirionen geschieht an der Zellmembran und wird durch eine Akkumulation von M1-Protein auf der zytoplasmatischen Seite der Doppellipidmembran initiiert. Auch nach der Abschnürung bleiben die neuen Viruspartikel über ihre HA-Proteine an die Sialinsäure-Rezeptoren der Zelloberfläche gebunden. Erst durch die Sialidaseaktivität der viralen Neuraminidase wird eine vollständige Freisetzung der Nachkommenviren erreicht (Colman *et al.*, 1983; Varghese *et al.*, 1983). Die NA spaltet dabei die Verbindungen zwischen HA und Sialinsäuren (Els *et al.*, 1989; Lamb und Choppin, 1983; Palese *et al.*, 1974). Durch die Aktivität der NA werden zudem auch von der Virionoberfläche Sialinsäuren entfernt, wodurch eine Aggregation viraler Partikel verhindert und die Infektiösität erhöht wird (Palese und Compans, 1976; Palese *et al.*, 1974).

1.1.8 Determinanten des Wirtsspektrums und der Pathogenität

In Folge einer Interspeziesstransmission müssen sich Influenzaviren an die neue Wirtsumgebung anpassen. Die Evolution des viralen Genoms unterliegt dabei dem in der neuen Wirtsumgebung vorherrschenden Selektionsdruck. Durch den Vergleich von Genomsequenzen aviärer und humaner Viren und Studien zur Adaptation von Influenzaviren konnten bereits spezifische, wirtsadaptive genetische Signaturen des Virus identifiziert und charakterisiert werden (Chen *et al.*, 2006a; Naffakh *et al.*, 2008). Hierbei wurde deutlich, dass der Adaptationsprozess ein multigener Prozess ist (Naffakh *et al.*, 2008). Die Hauptdeterminanten des Wirtsspektrums und der Pathogenität befinden sich im Hämagglutinin und der Neuraminidase, den Oberflächenglykoproteinen des Influenzavirus (Matrosovich *et al.*, 2004a; Ogawa und Ueda, 1981; Rott *et al.*, 1976; Scholtissek *et al.*, 1979; Shinya *et al.*, 2006; Webster und Bean, 1978). Sie dienen der Überwindung der Zellmembran, die die erste Barriere bei der Adaptation darstellt.

Das homotrimäre HA besitzt eine stark konservierte Stielregion (HA₂), die die Fusion der Virushülle mit der Endosomenmembran vermittelt und eine globuläre Kopfreion (HA₁), die die Rezeptorbindestelle und die variablen antigenischen Epitope enthält (Steinhauer, 1999; Wilson *et al.*, 1981). Es vermittelt die Adsorption des Viruspartikels an die Zelle, wobei endständige, an Galaktose konjugierte N-Acetylneuraminsäuren (Sialinsäuren) zellulärer Glykoproteine oder -lipide als Rezeptoren dienen. Das C2-Atom der terminalen Sialinsäure kann mit dem C3- oder C6-Kohlenstoff der Galaktose verbunden sein, was zu α 2,3- oder α 2,6-glycosidischen Bindungen führt (N-Acetylneuraminyl-(α 2,3)-galactose bzw. N-Acetylneuraminyl-(α 2,6)-galactose). Aviäre Influenzaviren besitzen eine Präferenz für α 2,3-verknüpfte Sialinsäuren, während humane Influenzaviren bevorzugt an α 2,6-verknüpfte Sialinsäuren binden. Aufgrund einer differenziellen Expression dieser beiden Rezeptortypen im Vogel und im Säuger werden bestimmte Gewebe bevorzugt infiziert. Im Hauptreplikationsort des aviären Wirts (Wasservogel), dem Intestinaltrakt, sind vornehmlich α 2,3-verknüpfte Sialinsäuren zu finden (Couceiro *et al.*, 1993; Matrosovich *et al.*, 2004a). Die von humanen Viren bevorzugten α 2,6-verknüpften Sialinsäuren, zeigen eine verstärkte Expression in Epithelien des oberen Respirationstrakts des Säugers (Nasenrachenraum, Nasennebenhöhlen, Trachea), während im unteren Respirationstrakt (Bronchiolen, Alveolen) hauptsächlich α 2,3-verknüpfte Sialinsäuren vorkommen. Noch nicht adaptierte aviäre Viren befallen, aufgrund des dortigen α 2,3-Sialinsäurevorkommens, vornehmlich den URT. Dies resultiert in Pneumonien mit teils schweren Krankheitsverläufen, jedoch ineffizienter Mensch-zu-Mensch Transmission. Humanadaptierte Viren infizieren hingegen primär den ORT, was zu einer erfolgreichen Mensch-zu-Mensch Transmission über Tröpfchen bzw. Aerosole führt (Couceiro *et al.*, 1993; Matrosovich *et al.*, 2004a; Shinya *et al.*, 2006; van Riel *et al.*, 2010;

2006, 2007). Somit können Menschen und andere Primaten durch aviäre Influzaviren infiziert werden, wenngleich mit geringerer Effizienz als durch humane Viren (Bouvier und Palese, 2008). Dabei bietet die differenzielle Expression der Sialinsäuren im Respirationstrakt des Säugers eine mögliche Erklärung für die geringe Infektiösität aber dennoch hohe Pathogenität einiger aviärer Stämme (Gambotto *et al.*, 2008). Die HA-Rezeptorspezifität humaner und aviärer Influzaviren ist damit eine Wirts- und Pathogenitätsdeterminante und suggeriert, dass aviäre Viren eine Anpassung an den humanen Rezeptortyp durchlaufen müssen, um eine Pandemie im Menschen auszulösen (Neumann *et al.*, 2009). Weiterhin ist die posttranslationale, proteolytische Spaltung des HA-Polyproteinvorläufermolekül HA₀ in HA₁ und HA₂ für die Infektiösität des Virus essentiell (Hulse *et al.*, 2004; Klenk *et al.*, 1991; Steinhauer, 1999). Die monobasische Spaltstelle des HA₀ der LPAIV und der humanen saisonalen Influzastämme wird durch extrazelluläre trypsinartige Proteasen gespalten. Diese werden im Epithel des Respirations- oder Intestinaltraktes sezerniert (Naffakh *et al.*, 2008; Webster *et al.*, 1992). Die multibasische HA₀-Spaltstelle der H5 und H7 HPAIV-Subtypen wird hingegen intrazellulär im *trans*-Golginetzwerk durch furinähnliche Proteasen gespalten (Garten und Klenk, 1999). Dies erklärt die hohe Pathogenität der HPAIV und ihr Potential zur systemischen Ausbreitung (Naffakh *et al.*, 2008). Damit gehören die Spaltstelle im HA₀, die differenzielle Rezeptorspezifität des HAs humaner und aviärer Viren und die zell- und gewebsspezifische Verteilung der aktivierenden zellulären Proteasen zu den bislang bekannten Hauptfaktoren, die für die Wirtsspezifität, den Gewebetropismus, die systemische Ausbreitung und die Pathogenität von Influzaviren, v.a. im aviären Wirt, verantwortlich sind (Horimoto und Kawaoka, 1994; Hulse *et al.*, 2004; Neumann *et al.*, 2009; Steinhauer, 1999).

Die Kernmembran ist eine weitere, wichtige Barriere, die bei der Wirtsadaptation überwunden werden muss. Wie schon in 1.1.7.3 erwähnt, transkribieren und replizieren Influzaviren ihr Genom im Zellkern der infizierten Wirtszelle. Daher ist der Kernimport ihrer vRNPs und viralen Proteine unter Ausnutzung der zellulären Kernimportmaschinerie ein entscheidender Schritt in ihrem Replikationszyklus (siehe auch 1.2.5; Resa-Infante *et al.*, 2011). Die Anpassung an bestimmte Kernimportkomponenten der Säugerzelle wird durch Mutationen in der viralen Polymerase und NP erreicht und ist essentiell für eine effiziente Replikation (Gabriel *et al.*, 2005; Salomon *et al.*, 2006). Die virale Polymerase und NP gelten daher als Schlüsselfaktoren für die Pathogenität und Wirtsspezifität von Influzaviren (1.1.8.1, 1.1.8.2, 1.2.4; Gabriel *et al.*, 2005; 2008; 2011; Hudjetz und Gabriel, 2012; Naffakh *et al.*, 2008). Vor allem das PB2-Protein gilt als zentraler Faktor bei der Adaptation. Dies konnte erstmals 1977 anhand der Geflügelpeststämme A/FPV/Dobson und A/FPV/Rostock gezeigt werden (Almond, 1977). Daneben tragen aber auch andere Komponenten des RNPs, u.a. PB1 und PB1-F2, zur Pathogenität und Virulenz des Virus bei (Salomon *et al.*,

2006; Watanabe *et al.*, 2009). Die RNP-Gene besitzen wirtsspezifische Linien und tragen wirtsassoziierte, genetische Signaturen.

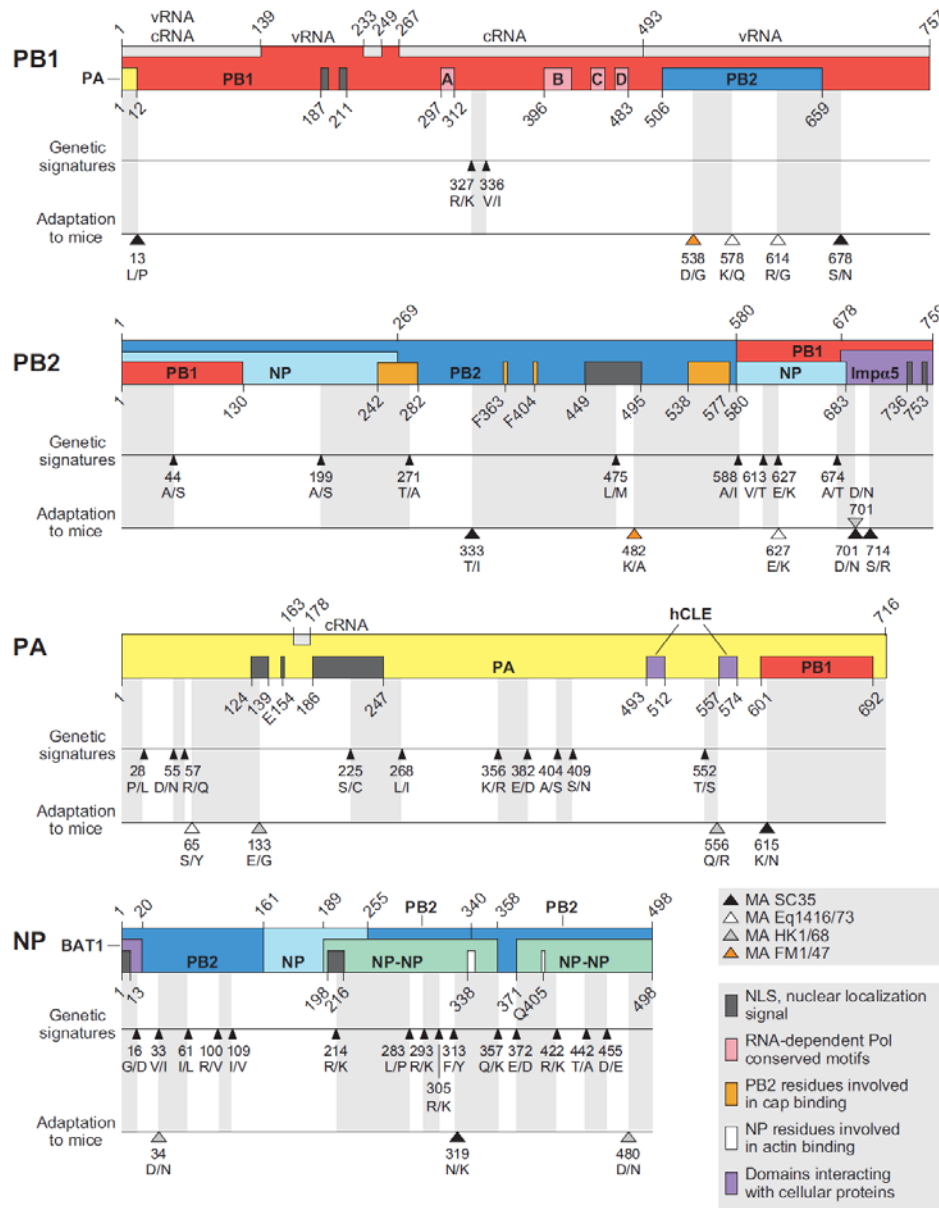


Abb. 7: Funktionelle Domänen der viralen Polymerase und NP sowie ihre wirtsadaptiven Signaturen. Wirtsspezifische genetische Signaturen sind als schmale schwarze Dreiecke dargestellt (Chen *et al.*, 2006a; Naffakh *et al.*, 2008). Die Aminosäureposition, und ob es sich um aviäre oder humane Signaturen handelt, sind angegeben. Wirtsadaptive Signaturen, die bei der Mausadaptation von Influenzaviren eine Rolle spielen sind aufgeführt (▲, mausadaptiertes (MA) SC35M (H7N7); Gabriel *et al.*, 2005, siehe auch 1.1.9. △, MA A/Equine/London/1416/73 (Eq1416/73) Virus; Shinya *et al.*, 2007. ▲, MA A/Hong Kong/1/68 (HK1/68); Brown *et al.*, 2001. ▲, MA A/Fort Mouth/1/47 (FM1/47); Brown und Bailly, 1999). Die Aminosäureposition und ob es sich um das Parentalvirus oder MA-Virus handelt, sind angegeben (aus Naffakh *et al.*, 2008).

Durch Reassortierungsversuche und reverse Genetik wurde die funktionelle Signifikanz dieser Determinanten untersucht, wodurch zudem der Einfluss des gesamten genetischen Kontexts hervorgehoben wird (Naffakh *et al.*, 2008). Für die Adaptation an den neuen Wirt sind die Polymeraseaktivität und die Interaktion des vRNPs und seiner Komponenten mit zellulären Wirtsfaktoren von großer Bedeutung (Naffakh *et al.*, 2008).

Tab. 3: Wirtsadaptive Mutationen in der Polymerase und im NP von H5N1-Viren. (aus Gabriel *et al.*, 2013)

Protein	Mutation	Mechanismus und Funktion	Referenz	
PB2	L88V	kompensiert das Fehlen von 627K	Li <i>et al.</i> , 2009	
	E158G	erhöht die Pathogenität in der Maus	Zhou <i>et al.</i> , 2011	
	T271A	erhöht die Polymeraseaktivität in Säugerzellen	Bussey <i>et al.</i> , 2010	
	G309D, T339K, R477E, I495V	kompensiert das Fehlen von 627K	Li <i>et al.</i> , 2009	
	Q591K	kompensiert das Fehlen von 627K in pH1N1 (2009) Viren, kommt selten in H5N1 Viren vor	Yamada <i>et al.</i> , 2010	
	E627K		wurde in humanen Isolaten detektiert	Subbarao <i>et al.</i> , 1998; de Jong <i>et al.</i> , 2006
			wird vermehrt in aviären Isolaten detektiert	Russell <i>et al.</i> , 2012
			erhöht die Polymeraseaktivität bei niedrigen Temperaturen	Massin <i>et al.</i> , 2001
			erhöht die Bindung an NP	Labadie <i>et al.</i> , 2007
			beeinflusst die Bindung an Wirtsfaktoren (z.B. vRNP-Bindung an Importin- α)	Resa-Infante <i>et al.</i> , 2008; Shinya <i>et al.</i> , 2009; Hudjetz und Gabriel, 2012
			kompensiert das Fehlen von 701N	Hatta <i>et al.</i> , 2001
			erhöht die Pathogenität in der Maus, induziert Aerosoltransmission in Frettchen und Kontakttransmission in Meerschweinchen	Gao <i>et al.</i> , 2009; Steel <i>et al.</i> , 2009; Herfst <i>et al.</i> , 2012
	A676T	kompensiert das Fehlen von 627K	Li <i>et al.</i> , 2009	
	D701N		wurde in humanen Isolaten detektiert	de Jong <i>et al.</i> , 2006
			erleichtert die Importin- α Bindung	Tarendeau <i>et al.</i> , 2007; Gabriel <i>et al.</i> , 2008; 2011; Boivin und Hart, 2011
			erhöht den Kerntransport von PB2, Polymeraseaktivität	Gabriel <i>et al.</i> , 2008; 2011
			kompensiert das Fehlen von 627K	Shinya <i>et al.</i> , 2009
erhöht die Pathogenität in der Maus			Li <i>et al.</i> , 2005	
erhöht die Kontakttransmission in Meerschweinchen			Gao <i>et al.</i> , 2009; Steel <i>et al.</i> , 2009	
PB1			L13P	wurde in humanen Isolaten detektiert
	L472V, L598P	kompensiert das Fehlen von PB2-627K	Xu <i>et al.</i> , 2012	
NP	N319K	erhöht die Bindung an Importin- α und den Kernimport	Gabriel <i>et al.</i> , 2008	
		erhöht die Polymeraseaktivität in Säugerzellen und die Pathogenität in der Maus	Gabriel <i>et al.</i> , 2005; Gabriel <i>et al.</i> , 2007	

Immer mehr Anzeichen deuten darauf hin, dass die Importin- α Isoformen (1.2.2) bei der Säugeradaptation von Influenzaviren eine zentrale Rolle spielen. Die molekularen

Mechanismen, Charakteristika und Details, die diesen adaptiven Prozessen zugrunde liegen, wurden in den letzten Jahren weiter aufgeklärt und diverse wirtsadaptive Signaturen in der Polymerase und NP beschrieben, die in Abb. 7 und Tab. 3 zusammengefasst sind (Gabriel *et al.*, 2007; 2008; 2011; Hudjetz und Gabriel, 2012; Mehle und Doudna, 2008; Naffakh *et al.*, 2008).

Spezifische Mutationen in der Polymerase, u.a. die wirtsadaptiven Signaturen PB2 627K und PB2 701N, wurden mit einer Erweiterung des Wirtsspektrums und der Pathogenität assoziiert. Interessanterweise, wiesen humane HPAIV H5N1-Isolate denen die adaptive PB2 627K-Mutation fehlte, die alternative PB2 701N-Signatur auf und umgekehrt (Thanh *et al.*, 2008). Beide Mutationen traten jedoch in natürlichen Isolaten bislang nie in Kombination auf. Höchstwahrscheinlich können sich diese beiden wirtsadaptiven Signaturen gegenseitig in ihren funktionellen Rollen im Wirt ersetzen (Thanh *et al.*, 2008). Dieser wechselseitig kompensatorische Effekt wurde im Kontext der erhöhten Polymeraseaktivität und Replikation in Säugerzellen (Foeglein *et al.*, 2011; Gabriel *et al.*, 2005; Shinya *et al.*, 2009; Subbarao *et al.*, 1998), der erhöhten Pathogenität in der Maus (Gabriel *et al.*, 2005; Hatta *et al.*, 2001) und der erhöhten Transmissibilität im Meerschweinchen berichtet (de Jong *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2009; Shinya *et al.*, 2009; Steel *et al.*, 2009).

Somit stellen die RNP-Untereinheiten, neben dem HA, der Neuraminidase (Goto *et al.*, 2001; Li *et al.*, 1993; Matrosovich *et al.*, 1999; 2004b; Palese und Compans, 1976; Palese *et al.*, 1974), dem Matrixprotein M1 (Bialas *et al.*, 2012) und dem NS1-Protein (Gack *et al.*, 2009), weitere wichtige Determinanten des Wirtsspektrums und der Pathogenität von Influenzaviren dar. Auf die wirtsadaptiven Mutationen PB2 E627K und D701N wird diesbezüglich im Folgenden genauer eingegangen.

1.1.8.1 Die adaptive Mutation PB2 E627K

Die Signatur E627K im PB2-Protein der Polymerase reguliert die Polymeraseaktivität in einer wirtsabhängigen Art und Weise (Chen *et al.*, 2006b). Das PB2 humaner Isolate besitzt an dieser Position fast ausschließlich ein Lysin (627K), während in aviären Viren ein Glutamat dominiert (627E; Chen *et al.*, 2005; Mehle und Doudna, 2008). Die Signatur wurde erstmals im Zusammenhang mit einer erhöhten Replikationseffizienz eines H3N2-Virus im Säuger und Menschen beschrieben (Subbarao *et al.*, 1993). PB2 627K korreliert mit erhöhter Polymeraseaktivität, Überwindung der Kältesensitivität der Polymerase (Hatta *et al.*, 2007; Massin *et al.*, 2001), erhöhter Virusreplikation und Transmission (Steel *et al.*, 2009) und in einigen Fällen mit erhöhter Pathogenität und Mortalität in Säugern (Mehle und Doudna, 2008; Neumann *et al.*, 2009; vgl. Tab. 3). Umgekehrt attenuiert die 627E-Signatur massiv die Replikationseffizienz und Pathogenität im Säuger (Clements *et al.*, 1992; Deng *et al.*, 2006).

Damit ist die 627K-Signatur eine wichtige säugeradaptive Determinante (Naffakh *et al.*, 2008). Für den Mechanismus der E627K-Signatur wurde berichtet, dass ein unbekannter, zellulärer Inhibitor in Säugerzellen spezifisch die Aktivität aviärer vRNPs inhibiert und so die Replikationseffizienz von 627E-RNPs beeinträchtigt (Labadie *et al.*, 2007; Mehle und Doudna, 2008). Alternativ wurde spekuliert, dass im Säuger ein positiv regulatorischer Faktor der aviären Polymerase fehlt oder nur niedrig exprimiert wird und für die verminderte Aktivität verantwortlich ist (Moncorgé *et al.*, 2010). Zudem wurde gezeigt, dass der E627K-Austausch zur Ausbildung eines basischen Areals auf der PB2-Proteinoberfläche führt und so u.U. Interaktionen mit viralen und zellulären Faktoren verstärkt (Boivin und Hart, 2011; Neumann *et al.*, 2009; Tarendeau *et al.*, 2008). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die wirtsadaptive Mutation PB2 E627K zu einer differenziellen Interaktion der PB2-Untereinheit mit den zellulären Importin- α Isoformen der Kernimportmaschinerie über einen neuen, transportunabhängigen Mechanismus führt. Die Importin- α 1 und - α 7 Isoformen wirken dabei speziell auf die Replikation von humanen bzw. säugeradaptierten Influenzaviren mit der PB2 627K-Signatur positiv regulatorisch, während die inhibitorische Aktivität von Importin- α 3 auf den humanen Polymerasekomplex im viralen Kontext überwunden wird (Hudjetz und Gabriel, 2012).

1.1.8.2 Die adaptive Mutation PB2 D701N

Eine weitere für das Wirtsspektrum und die Virulenz wichtige Determinante ist der Aminosäureaustausch D701N im PB2-Protein. Aviäre Isolate besitzen an der 701-Position größtenteils ein Aspartat (701D), während säugeradaptierte Isolate häufig ein Asparagin (701N) aufweisen. Diese Signatur hat keinen signifikanten Effekt auf die Polymeraseaktivität in aviären Zellen (Gabriel *et al.*, 2007), während sie im Säuger und im Menschen mit einer Erhöhung der Polymeraseaktivität und Pathogenität assoziiert wird (de Jong *et al.*, 2006; Mayer *et al.*, 2007; Medcalf *et al.*, 1999; Momose *et al.*, 2001). Die wirtsadaptive PB2 D701N-Mutation wurde nicht nur in mausadaptierten H3N2- (Brown *et al.*, 2001), H7N7- (Gabriel *et al.*, 2007; 2005) und H5N1-Viren detektiert (Li *et al.*, 2005; Puthavathana *et al.*, 2005; vgl. Abb. 7), sondern auch in humanen Isolaten (de Jong *et al.*, 2006; Subbarao *et al.*, 1998). Ein in säugeradaptierten Influenzaviren derartig wiederholtes und unabhängig voneinander vorkommendes Auftreten derselben Mutation wird konvergente Evolution genannt und ist ein starker Indikator für die Signifikanz einer wirtsadaptiven Mutation. Die PB2 701, PB2 714, PA 615, und NP 319 Mutationen von SC35M zeugen ebenfalls von einer konvergenten Evolution des RNPs (Gabriel *et al.*, 2005). Die wirtsadaptive Mutation PB2 701N hat dabei eine Konformationsänderung des PB2-Proteins zur Folge. Das Kernlokalisationsignal (NLS) am C-terminalen Ende von PB2 wird durch die PB2 701N-Mutation freigelegt und führt im Säuger zu einer verbesserten Bindung an den zellulären

Kernimportfaktor Importin- α (Abb. 8; Tarendeau *et al.*, 2007). Eine erhöhte Importin- α Bindung wird zudem von einer transienten Importin- α Akkumulation im Kern und zytoplasmatischen Importin- α Depletion begleitet, die mit erhöhtem Kernimport von PB2 im Säuger korreliert (Gabriel *et al.*, 2008; 2011). Die erhöhten Transkriptions- und Replikationsaktivitäten in Säugerzellen sind damit, zumindest teilweise, das Resultat einer verstärkten Rekrutierung von PB2 in den Nukleus (Gabriel *et al.*, 2008). Somit spielt die Adaptation der viralen Polymerase an die Kernimportmaschinerie des Wirtes eine wichtige Rolle bei der Interspeziesübertragung von Influenzaviren (1.1.8, 1.2.4; Gabriel *et al.*, 2013).

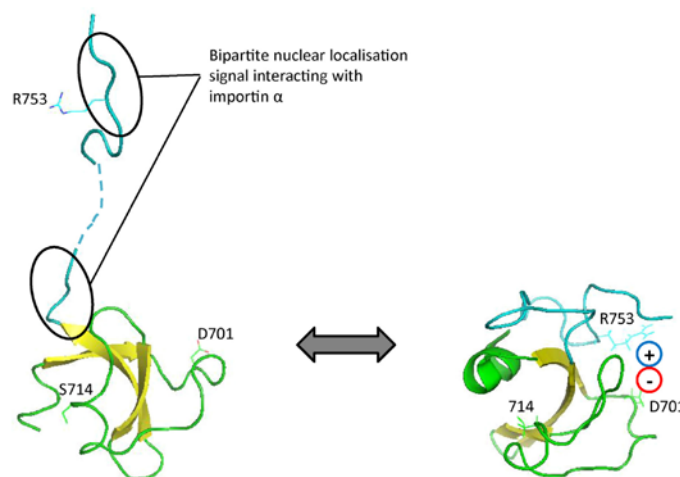


Abb. 8: Konformationsänderung von PB2. Der C-Terminus von PB2 kann in zwei verschiedenen Konformationen vorliegen. In der offenen Form ist die bipartite NLS am C-terminalen Ende (aa736-755) frei exponiert und kann mit Importin- α interagieren (links). In der geschlossenen Konformation liegt die NLS durch Ausbildung einer Ionenbindung zwischen 753R und 701D an das PB2-Molekül zurückgefaltet vor (rechts). Die wirtsadaptive Mutation D701N führt durch die Einführung einer positiven Ladung an der 701-Position zu einem Bruch dieser Ionenbindung und legt die NLS frei. Dies führt zu einer verbesserten Importin- α Bindung (Tarendeau *et al.*, 2007). aus Gabriel *et al.*, 2013.

1.1.9 Das HPAIV SC35 (H7N7) und seine mausadaptierte Variante SC35M

In dieser Arbeit wird zum Studium des Selektionsdrucks bei der Adaptation eines HPAIV an den Säuger das SC35/SC35M-Modell der Adaptation eines H7N7-Virus an die Maus verwendet (Scheiblauer *et al.*, 1995). Das Parentalvirus von SC35 ist A/Seal/Massachusetts/1/80 (H7N7), das während einer Seehund-Influenzaepidemie an der Küste von Neuengland (USA) aus einem infizierten Seehund (*Phoca vitulina*) isoliert wurde (Webster *et al.*, 1981b). Alle Genomsegmente dieses Isolates weisen Ähnlichkeiten zu denen aviärer Influenzaviren auf. Seehund-Influenzaviren besitzen ein ähnliches Wirtsspektrum wie andere Säugerviren und replizieren bis zu einem gewissen Maß im Säuger-Respirationstrakt und in der humanen Bindehaut (*Tunica conjunctiva*). Sie replizieren nur schlecht in Hühnern und verursachen in diesen keine Krankheitssymptome (Scheiblauer *et al.*, 1995). Das HPAIV SC35 wurde durch 34 Passagen von A/Seal/Massachusetts/1/80 in Hühnerembryozellen (CEC-Zellen) bei fortschreitender Reduktion der Trypsinmenge erhalten (Li *et al.*, 1990). Diese hühneradaptierte SC35-Variante weist, im Gegensatz zum

Parentalvirus, eine hohe Pathogenität im Huhn auf, die mit einer systemischen und letalen Infektion einhergeht (Infektion: i.m., 10^6 p.f.u.; Li *et al.*, 1990). Die Insertion von drei Argininresten neben dem einzelnen Arginin der monobasischen HA₀-Spaltstelle von A/Seal/Massachusetts/1/80 führte in SC35 zu einer multibasischen HA-Spaltstelle (Li *et al.*, 1990). Die dadurch erhöhte HA-Spaltbarkeit ist die Hauptursache für das erweiterte Gewebe- und Wirtsspektrum, sowie für die erhöhte Replikation und Pathogenität im Huhn. Zur Identifikation säugeradaptiver Mutationen eines HPAIV wurde SC35 an die Maus adaptiert. Die mausadaptierte SC35M-Variante wurde durch 11 serielle Passagen des HPAIV SC35 (H7N7) in der Mauslunge erhalten (Gabriel *et al.*, 2005; Scheiblaue *et al.*, 1995). Eine Infektion mit dem aviären HPAIV SC35 (H7N7) führt in der Maus zu einer lokal auf den Respirationstrakt beschränkten Infektion, die mit einer geringen Pathogenität einhergeht ($\log_{10}\text{MLD}_{50} = >6,0$). Im Gegensatz dazu resultiert eine Infektion mit dem säugeradaptierten SC35M in einer systemischen Infektion der Maus verbunden mit einer hohen Pathogenität und Letalität ($\log_{10}\text{MLD}_{50} = 2,8$; Gabriel *et al.*, 2005; Scheiblaue *et al.*, 1995). Dies äußert sich zudem in einer schweren Pneumonie, einer Lymphocytendepletion und einem Neurotropismus (Gabriel *et al.*, 2011; 2009; Scheiblaue *et al.*, 1995). Die hohe Virulenz von SC35M in der Maus korreliert weiterhin mit einem erhöhten Wachstumspotential in Säugerzellen. Sequenzanalysen zeigten, dass sich SC35 und SC35M in neun Aminosäureaustauschen unterscheiden, von denen sieben im RNP lokalisiert sind und je einer im HA und NA (Tab. 4; Gabriel *et al.*, 2005).

Tab. 4: Vergleich der Genome von SC35 und SC35M

Virales Gen	PB2			PB1		PA	NP	HA	NA
aa	333	701	714	13	678	615	319	340	328
nt	1025	2128	2169	62	2057	1869	1002	1039	1024
SC35	Thr (ACA)	Asp (GAC)	Ser (AGC)	Leu (CUA)	Ser (AGC)	Lys (AAG)	Asn (AAC)	Gly (GGA)	Ala (GCA)
SC35M	Ile (AUA)	Asn (AAC)	Arg (AGA)	Pro (CCA)	Asn (AAC)	Asn (AAU)	Lys (AAA)	Arg (AGA)	Ser (UCA)

Die Genomsequenzen von SC35 und SC35M sind unter den Datenbank-Zugangsnummern DQ266094-DQ266101 zu finden (modifiziert nach Gabriel, 2006). aa, Aminosäureposition. nt, Nukleotidposition.

Mittels reverser Genetik wurden die zur erhöhten Virulenz von SC35M beitragenden Mutationen bestimmt. Ein Vergleich der mittleren letalen Dosis 50 (MLD_{50}) der verschiedenen Virusreassortanten und Punktmutanten zwischen SC35 und SC35M zeigte, dass ausschließlich Mutationen im RNP zur Virulenz beitragen (Gabriel *et al.*, 2005). Die PB2 701N-Mutation in Kombination mit der NP 319K-Mutation im SC35-Hintergrund war

hierbei hauptsächlich für die erhöhte Polymeraseaktivität und die erhöhte Virulenz und Pathogenität von SC35M im Mausmodell verantwortlich (Gabriel *et al.*, 2005).

1.2 Nukleozytoplasmatischer Transport

Influenzaviren sind während ihres Replikationszyklus auf den Kernimport und -export ihrer vRNPs sowie ihrer kernlokalisierten Proteine durch die zelluläre Kerntransportmaschinerie angewiesen. Die Charakteristika besonders des Kernimportprozesses sollen im Weiteren näher erläutert werden.

Die eukaryotische Zelle weist eine Unterteilung in verschiedene, durch Membranen voneinander abgegrenzte Kompartimente auf. Auch der Zellkern ist durch die Kernmembran, eine doppelschichtige Lipidmembran, vom Zytoplasma abgegrenzt (Okada *et al.*, 2008).

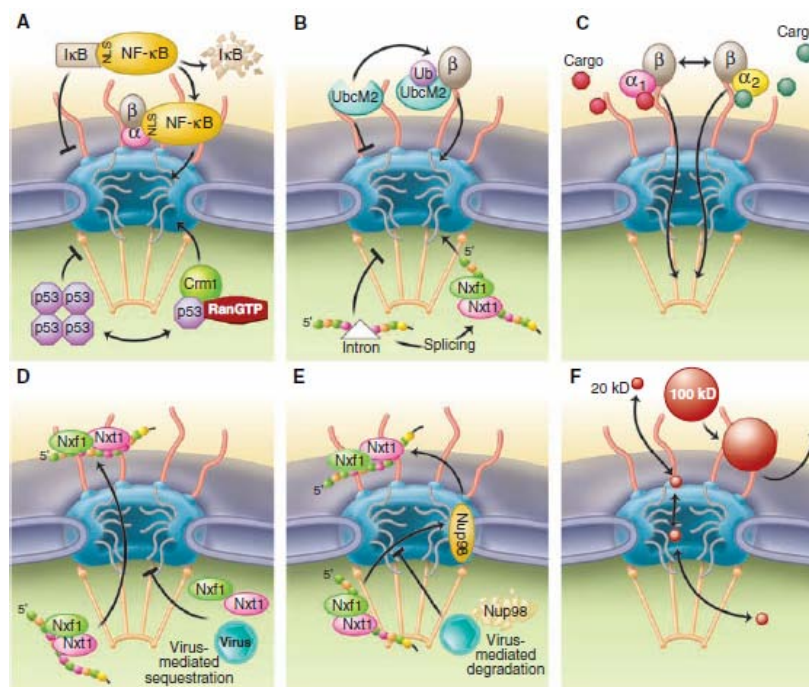


Abb. 9: Die dynamische und vielfältige Regulierung der nukleozytoplasmatischen Transportprozesse. (A) Intermolekulare und intramolekulare Interaktionen (NF-κB bzw. p53) regulieren den Transport einzelner Cargomoleküle. (B) Der Transport einzelner Cargos wird durch posttranskriptionelle Modifikationen (mRNA-Spleißen) und posttranslationale (Ubiquitinierung von UbcM2) reguliert. (C) Die Expressionsmuster individueller Transportrezeptoren beeinflussen die Cargo-Translokation. Die Expression bestimmter Importin-α Isoformen bestimmt, welche Cargos (farbige Hexagone) importiert werden. (D) Influenzaviren halten den mRNA Exportrezeptor mNxf1-Nxt1 im Kern zurück, wodurch der zelluläre mRNA-Export inhibiert wird. (E) Die NPC-Zusammensetzung hat einen großen Einfluss auf den Transport. Influenzaviren regulieren mNup98 herab und entfernen damit eine wichtige Bindestelle der zellulären mRNA Exportfaktoren. (F) Die Permeabilitätsbarriere des NPC blockiert die freie Diffusion großer Moleküle (>40 kDa oder >~8 nm); Ionen und kleine Moleküle neutraler Ladung können die selektive Permeabilitätsbarriere mittels Diffusion und unabhängig von einem Transportrezeptor passieren (aus Terry *et al.*, 2007).

Diese physische Trennung des genomischen Materials von anderen zellulären Kompartimenten erfordert einen kontrollierten Kernimport und -export durch die Kernporenkomplexe (NPC) der Kernmembran, um die grundlegenden biologischen Prozesse

auszuführen (Terry *et al.*, 2007). Die Permeabilitätsbarriere des NPC blockiert die freie Diffusion großer Moleküle, während Ionen und kleine Moleküle neutraler Ladung die selektive Permeabilitätsbarriere mittels Diffusion und unabhängig von einem Transportrezeptor passieren können (Terry *et al.*, 2007). Der Transport von Makromolekülen (>40 kDa oder >~8 nm) ist hingegen aktiv und energieabhängig (Sorokin *et al.*, 2007) und ein entscheidender Prozess, der Regulierungen auf mehreren Ebenen unterliegt. Diese Regulierung erfolgt durch die Modulation der Expression und der Funktion einzelner Cargos, der Transportrezeptoren oder des Transportkanals selbst (Abb. 9; Terry *et al.*, 2007). Jeder dieser Mechanismen hat eine breite Auswirkung auf Transportmuster und -kapazitäten. Weiterhin bedingt diese hierarchisch strukturierte Regulierung direkt die Genexpression, die Signaltransduktion, Entwicklungsprozesse und kann bei Dysregulierung zur Ausbildung von eine Breite an Krankheiten führen (Terry *et al.*, 2007).

Im Nukleus generierte RNA-Transkripte, werden aus dem Kern über die NPCs zu den Ribosomen im Zytoplasma transportiert und dort translatiert. Im Kern benötigte Proteine, wie z.B. Histone, DNA- und RNA-Polymerasen und Transkriptionsfaktoren, werden nach der Translation durch die NPCs wieder in den Nukleus importiert (Dworetzky und Feldherr, 1988). Das hierfür verwendete Importin/Exportin-Transportsystem stellt die Maschinerie dar, die den nukleozytoplasmatischen Transport von Cargomolekülen bewerkstelligt (Okada *et al.*, 2008). Die Kernporenkomplexe sind makromolekulare, in die Kernmembran eingebettete Strukturen, die mehr als 60 Mda groß sind (Abb. 10; Reichelt *et al.*, 1990; Terry *et al.*, 2007).

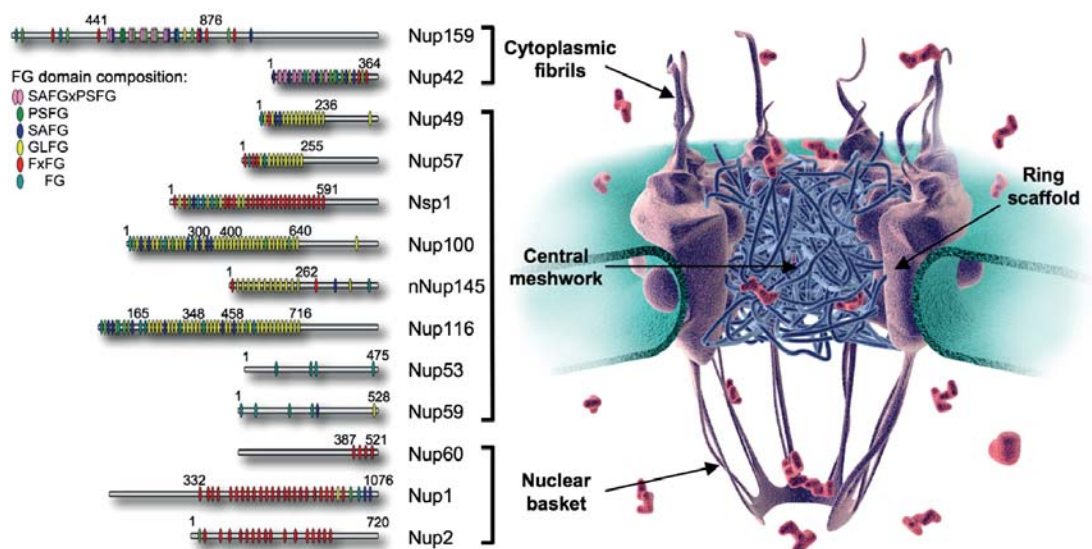


Abb. 10: Schematische Darstellung des Kernporenkomplexes (NPC) und repräsentativer FG-Nups. In den schematisch dargestellten FG-Nups von *S. cerevisiae* sind die individuellen FG-Motive und ihre Aminosäurepositionen markiert (links). Der NPC besteht aus einem ringförmigen Gerüst mit den zytoplasmatischen Filamenten, der zentralen Pore mit dem putativen Netzwerk aus FG-Nups und dem nukleären Ring, an dem zum Nukleoplasma hin eine korbähnliche Struktur befestigt ist. Die jeweilige Lokalisation der verschiedenen Nups ist angegeben (rechts). aus Patel *et al.*, 2007.

Insgesamt besteht der NPC aus etwa 30 verschiedenen Proteinen, die den unterschiedlichen Nukleoporinen (Nups), den Membranproteinen (Rezeptoren) und den löslichen Proteinen angehören (King *et al.*, 2006; Rout und Aitchison, 2000; Suntharalingam und Wenthe, 2003). Zu den drei Klassen der Nups zählen die strukturellen Nups, die zur Gesamtarchitektur des NPC beitragen, die Porenmembranproteine (Poms, *pore membrane proteins*), die den NPC in der Kernmembran verankern und die FG-Nups (Terry *et al.*, 2007). Die FG-Nups enthalten separate Domänen mit multiplen Phenylalanin-Glycin- (FG), GLFG- (L, Leucin) oder FxFG-Wiederholungen (x, beliebige Aminosäure), die von geladenen oder polaren *Spacer*-Regionen unterbrochen sind (Rout und Wenthe, 1994). Sie kleiden den zentralen NPC-Kanal aus und erstrecken sich filamentförmig beiderseits der Kernmembran. Auf der nukleoplasmatischen Seite verbinden sich die etwa 100 nm langen Filamente zu einer korbartigen Struktur (Stoffler *et al.*, 1999; Terry *et al.*, 2007). Essentiell für den Kernimport und -export sind die Transportrezeptoren selbst, da sie sowohl mit Transportsignalen versehene Cargos erkennen und binden, als auch mit dem NPC interagieren und das Cargo an seinen Zielort befördern (Pemberton und Paschal, 2005).

Die größte Gruppe der Transportrezeptoren besteht aus den strukturell verwandten Mitgliedern der Importin- β Proteinfamilie (KPNBs: Importine, Exportine und Transportine). Die meisten Importin- β Isoformen binden das Cargo direkt, während Importin- β_1 hierfür normalerweise Adaptorproteine verwendet, die das Cargo erkennen und binden (Goldfarb *et al.*, 2004). Diese Adaptoren zwischen dem Cargo und dem Importin- β_1 Transportrezeptor sind die Importin- α Proteine (ehemals als Karyopherine- α bezeichnet). Auf die Familie dieser Adaptorproteine wird in 1.2.2 ausführlicher eingegangen. Die Cargoproteine, die zwischen dem Zytoplasma und dem Nukleus hin- und herpendeln, besitzen Kernlokalisierungssignale (NLS) oder Kernexportssignale (NES), die von den Transportrezeptoren erkannt und gebunden werden (Okada *et al.*, 2008). Die Direktionalität und Energieversorgung für den Importin- β -vermittelten Kerntransport wird durch die kleine Guanosintriphosphatase Ran (Ran-GTPase) bewerkstelligt (Fried und Kutay, 2003). Im Zytoplasma liegt RanGDP in hohen Konzentrationen vor, während im Nukleus hohe RanGTP-Konzentrationen vorherrschen (Gasiorowski und Dean, 2003; Lange *et al.*, 2007). Dieser RanGDP/RanGTP-Gradient über die Kernmembran stellt die treibende Kraft für den Cargotransport durch den NPC dar (Chahine und Pierce, 2009). Die Direktionalität des Kerntransportes wird vermutlich von dem Vorkommen von Importin- β Bindestellen auf den Nups beeinflusst (Stewart, 2007). Zu den Importin- β -unabhängigen Transportrezeptoren zählen u.a. der RanGDP-Importfaktor Ntf2 und der mRNA-Exportrezeptor mNxf1/Tap (Fried und Kutay, 2003). Einige Cargos, z.B. β -Catenin, können auch rezeptorunabhängig durch direkte Interaktion mit den FG-Wiederholungen der FG-Nups importiert werden (Fagotto *et al.*, 1998).

1.2.1 Importin- α/β vermittelter Kernimport

Bei den Transportformen werden der klassische Importin- α /Importin- β -abhängige Kernimportweg und der nicht-klassische Importin- α -unabhängige Kernimportweg unterschieden. Im klassischen Kernimportweg erkennen Importin- α Isoformen die NLS von Cargoproteinen. Sie fungieren dabei als Adaptorproteine, um mit dem Transportrezeptor Importin- β_1 einen ternären Komplex zu bilden. Dieser wird RanGDP-abhängig und durch Interaktion von Importin- β mit den peripheren Nups durch den NPC in den Kern transloziert (Abb. 11; Köhler *et al.*, 1999; Ratan *et al.*, 2008). Im Kern erfolgt die Dissoziation des Komplexes durch Umwandlung von RanGDP in RanGTP und die Freisetzung des Cargos (Ratan *et al.*, 2008; Stewart, 2007). Importin- α wird RanGTP-abhängig und zusammen mit dem Importin- α Exportprotein CAS (*cellular apoptosis susceptibility gene*) im Komplex zurück ins Zytoplasma befördert (Köhler *et al.*, 1999; Okada *et al.*, 2008). Importin- β_1 wird ebenfalls im Komplex mit RanGTP ins Zytoplasma recycelt.

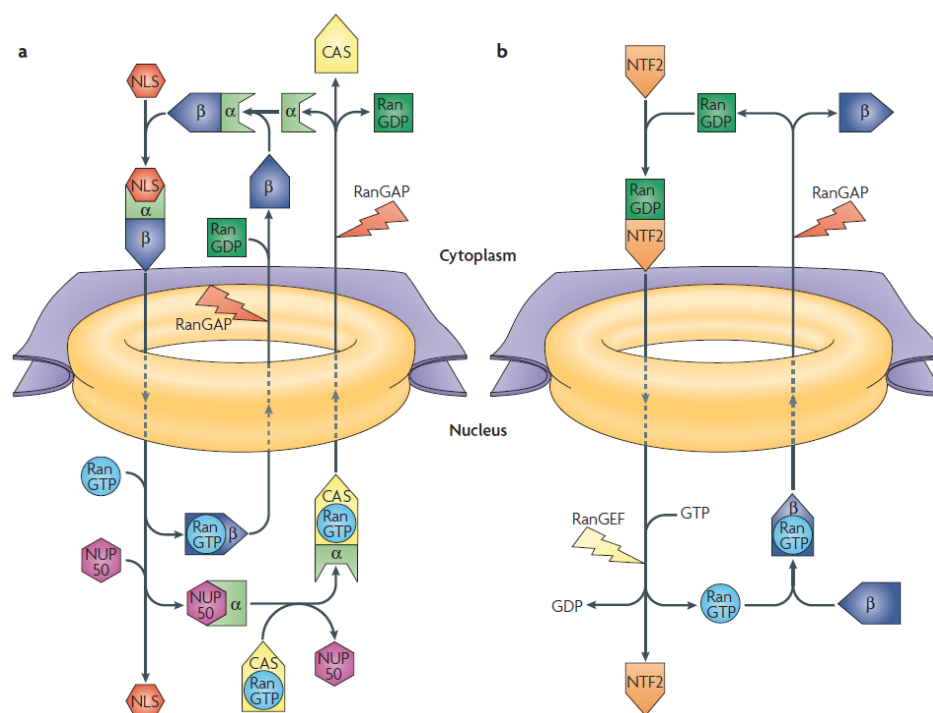


Abb. 11: Übersicht des klassischen Importin- α/β Kerntransportwegs. (a) Im Zytoplasma wird ein Importkomplex aus Cargoprotein mit Kernlokalisierungssignal (NLS), dem Adaptorprotein Importin- α und dem Transportrezeptor Importin- β_1 gebildet. Nach dem Passieren des Kernporenkomplexes (NPC) dissoziiert Importin- β_1 durch die Bindung von RanGTP von Importin- α . Das Cargoprotein dissoziiert ebenfalls von Importin- α und Importin- α wird RanGTP-abhängig durch den Kernexportfaktor CAS ins Zytoplasma zurückrecycelt. Nucleoporine, wie NUP50, katalysieren die Dissoziation des Cargoproteins und fungieren als molekulare Sperrvorrichtungen, um überflüssige Transportzyklen zu verhindern. (b) Ran pendelt ebenfalls zwischen dem Kern und dem Zytoplasma. Der Transportzyklus wird von Änderungen des Ran-Nukleotidzustands begleitet, da der Ran-Guaninnukleotid-Austauschfaktor (RanGEF, auch RCC1) nukleär ist, das Ran GTPase-aktivierende Protein (RanGAP) jedoch zytoplasmatisch. Zytoplasmatisches RanGDP wird durch den Kerntransportfaktor 2 (NTF2) in den Kern importiert, wo RanGEF den Nukleotidaustausch katalysiert und RanGTP generiert. RanGTP kann daraufhin an Transportfaktoren wie Importin- β und CAS binden. Nach Export ins Zytoplasma stimuliert RanGAP die GTP-Hydrolyse. Bei der Änderung des Nukleotidzustands erfährt Ran eine Konformationsänderung, die es während des Kerntransportzyklus zur Bindung und Freisetzung seiner Interaktionspartner befähigt (aus Stewart, 2007).

1.2.2 Die Importin- α Proteinfamilie

Die Familie der Importin- α Adaptorproteine (KPNA) besteht im Menschen aus bislang sieben beschriebenen Isoformen, bzw. aus sechs Isoformen in der Maus (Hu *et al.*, 2010; Kelley *et al.*, 2010). Jede Isoform wird dabei von einem anderen Gen kodiert. Diese Isoformen werden aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit drei Unterfamilien zugeordnet, die als Importin- α 1 (Importin- α 5, - α 6, - α 7), Importin- α 2 (Importin- α 1, - α 8) und Importin- α 3 Gruppen (Importin- α 3, - α 4) klassifiziert werden (Kelley *et al.*, 2010). Tab. 5 gibt die Ähnlichkeiten der verschiedenen humanen Importin- α Isoformen auf Aminosäuresequenzebene wieder.

Tab. 5: Identitätsmatrix der humanen Importin- α Isoformen. Die Ähnlichkeiten der verschiedenen Isoformen zueinander auf Aminosäuresequenzebene (in %) sowie die alte und neue Nomenklatur (KPNA bzw. Importin- α) sind aufgeführt (modifiziert nach Kelley *et al.*, 2010).

KPNA	KPNA1	KPNA2	KPNA3	KPNA4	KPNA5	KPNA6	KPNA7
Importin-	α 5	α 1	α 4	α 3	α 6	α 7	α 8
KPNA1	100	45,7	47,9	47,5	80,7	82,1	42,6
KPNA2		100	49,5	50,9	48,1	47,3	54,7
KPNA3			100	85,8	48,4	47,8	43,7
KPNA4				100	48,7	48,2	43,7
KPNA5					100	84,5	41,4
KPNA6						100	42,5
KPNA7							100

Die verschiedenen Importin- α Isoformen zeigen Präferenzen für bestimmte, spezifische NLS-Cargotypen, auch wenn es gewisse funktionelle Redundanzen gibt (Fagerlund *et al.*, 2005; Köhler *et al.*, 2001; Köhler *et al.*, 1999; Quensel *et al.*, 2004; Welch *et al.*, 1999). Die meisten NLS-Sequenzen sind sich sehr ähnlich. Daher wird angenommen, dass die Importin- α Spezifität nicht nur durch die NLS vermittelt wird, sondern auch durch den Gesamtproteinkontext des Cargos und das Vorhandensein anderer, kompetitiver NLS-haltiger Cargos (Friedrich *et al.*, 2006). Die zeitlich koordinierte, differenzielle Expression und Repression einzelner Importin- α Isoformen reguliert u.a. den Import bestimmter Transkriptionsfaktoren während der Entwicklung. Da hierdurch die Differenzierung in bestimmte Zelltypen ausgelöst wird, sind unterschiedliche Importin- α Isoformen aufgrund ihrer unterschiedlichen Cargos für einen multizellulären Organismus essentiell (Holt *et al.*, 2007). Die Importin- α Isoformen kommen, bis auf die testisspezifische Importin- α 6 Isoform, ubiquitär vor (Köhler *et al.*, 1997). Sie weisen jedoch differenzielle zell-, gewebe- und organspezifische Expressionsmuster auf (Köhler *et al.*, 2002). Eine Übersicht einiger zellulärer Cargoproteine der Importin- α Isoformen und diverser viraler Proteine, die ebenfalls mit Importin- α Isoformen interagieren und sie für den Kernimport nutzen, ist in Tab. 6 ist

aufgeführt. Auf die Interaktionen von Influenzavirus Proteinen mit Importin- α Isoformen wird in 1.2.4 und 1.2.5 im Speziellen eingegangen.

Tab. 6: Cargoproteine der Importin- α Isoformen. In vielen Fällen ist eine spezifische Isoform für den Transport eines bestimmten Cargoproteins verantwortlich. Einige Proteine werden jedoch von multiplen Isoformen erkannt und gebunden (modifiziert nach Okada *et al.*, 2008). n.d. nicht bestimmt.

Importin- α Isoform (human)	NCBI-Nomenklatur	Cargomolekül
Importin- α 1	KPNA2	Typ 1 Parathyroider Hormonrezeptor (Pickard <i>et al.</i> , 2006) IFN regulatorischer Faktor-1 (Umegaki <i>et al.</i> , 2007) Oct3/4 (Yasuhara <i>et al.</i> , 2007) mCRY2 (Sakakida <i>et al.</i> , 2005) PARP-2 (Haenni <i>et al.</i> , 2008) HIV-1 Vpr (Nitahara-Kasahara <i>et al.</i> , 2007) Hantavirus Nukleocapsidprotein (HTNV NP; Taylor <i>et al.</i> , 2009)
Importin- α 3	KPNA4	NF- κ B p50/p65 (Fagerlund <i>et al.</i> , 2005) RNA-Helicase A (Aratani <i>et al.</i> , 2006) Oct3/4 (Yasuhara <i>et al.</i> , 2007) Oct6 (Yasuhara <i>et al.</i> , 2007) mCRY2 (Sakakida <i>et al.</i> , 2005) RCC1 (RanGEF) (Quensel <i>et al.</i> , 2004) Daxx (Yeung <i>et al.</i> , 2008) Notch1 intrazelluläre Domäne (NICD; Huenniger <i>et al.</i> , 2010) PARP-2 (Haenni <i>et al.</i> , 2008) Gewebetransglutaminase (tTG; Peng <i>et al.</i> , 1999) HIV-1 Vpr (Nitahara-Kasahara <i>et al.</i> , 2007)
Importin- α 4	KPNA3	NF- κ B p50/p65 (Fagerlund <i>et al.</i> , 2005) Notch1 intrazelluläre Domäne (NICD; Huenniger <i>et al.</i> , 2010) Bovines Papillomavirus Typ 1 E1-Protein (Bian <i>et al.</i> , 2007) Hantavirus Nukleocapsidprotein (HTNV NP; Taylor <i>et al.</i> , 2009)
Importin- α 5	KPNA1	Stat1 Homodimer, Stat1-Stat2-Heterodimer (Melén <i>et al.</i> , 2003) Stat3 (Ma und Cao, 2006) Oct3/4 (Yasuhara <i>et al.</i> , 2007) Oct6 (Yasuhara <i>et al.</i> , 2007) Brn2 (Yasuhara <i>et al.</i> , 2007) SOX2 (Yasuhara <i>et al.</i> , 2007) PARP-2 (Haenni <i>et al.</i> , 2008) Ebola virus VP24 (Reid <i>et al.</i> , 2006) HIV-1 Vpr (Nitahara-Kasahara <i>et al.</i> , 2007) Hantavirus Nukleocapsidprotein (HTNV NP; Taylor <i>et al.</i> , 2009)
Importin- α 6	KPNA5	n.d., testisspezifisch (Köhler <i>et al.</i> , 1997)
Importin- α 7	KPNA6	mCRY2 (Sakakida <i>et al.</i> , 2005) Stat3 (Ma und Cao, 2006) Notch1 intrazelluläre Domäne (NICD; Huenniger <i>et al.</i> , 2010)
Importin- α 8	KPNA7	n.d., Rolle bei Embryogenese (Hu <i>et al.</i> , 2010; Kelley <i>et al.</i> , 2010; Wang <i>et al.</i> , 2012)

1.2.3 Die funktionellen Domänen von Importin- α und Aufbau des Importin- α/β Heterodimers

Strukturell bestehen die Importin- α Isoformen aus zehn Tandem-Armadillo- (ARM) Wiederholungen und einer flexiblen N-terminalen Importin- β -Bindedomäne (IBB; Abb. 12). Dabei befinden sich die Bindestellen für die NLS eines Cargos in den ARM-Domänen. Jede ARM-Domäne setzt sich aus drei α -Helices (H1, H2 und H3) zusammen und besteht aus etwa 40 Aminosäuren. Die 10. ARM-Wiederholung stellt die C-terminale Bindedomäne für den Kernexportrezeptor CAS dar (Abb. 12B; Andrade *et al.*, 2001; Peifer *et al.*, 1994). Die Importin- α Isoformen erkennen und binden an zwei Hauptklassen von Kernlokalisationssignalen (NLS).

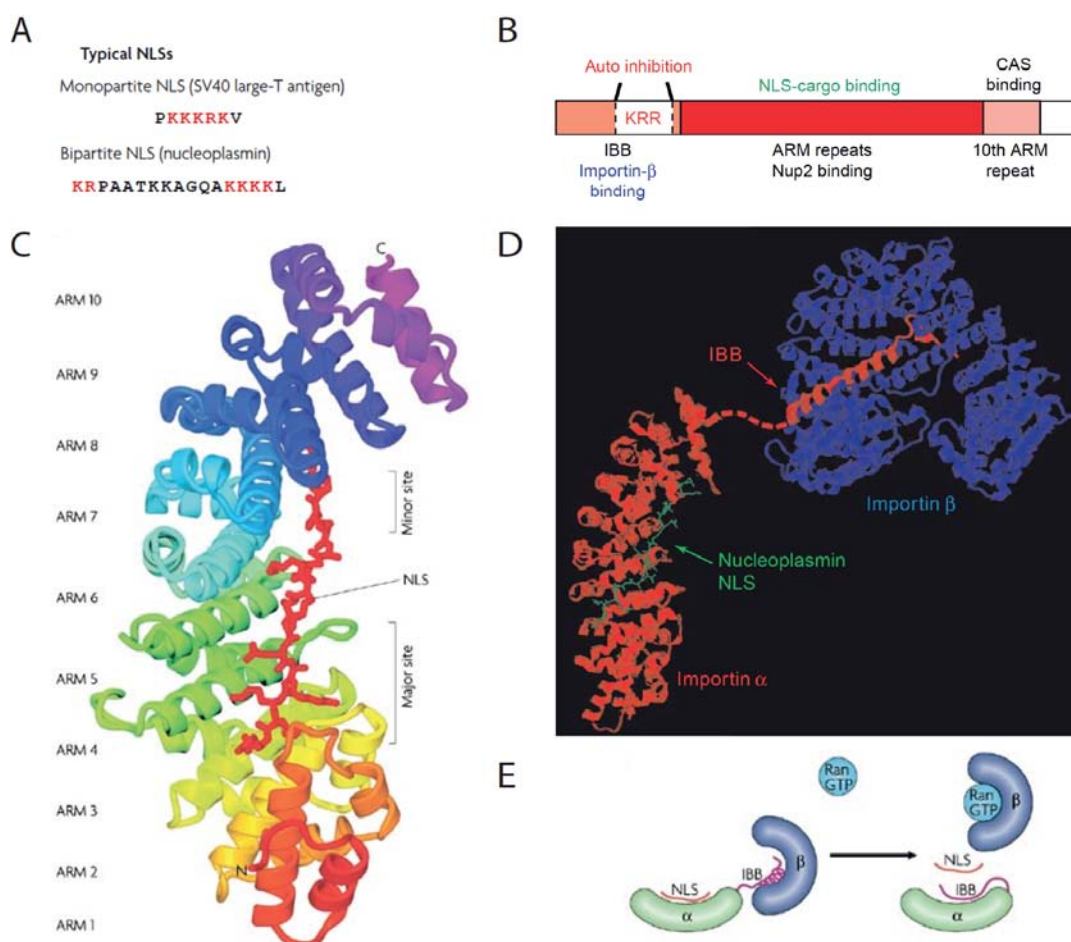


Abb. 12: Bildung von Importin- α Cargokomplexen im Zytoplasma. (A) Importin- α erkennt klassische Kernlokalisationssignale (NLS) mit einer (monopartite) oder zwei (bipartite) Clustern basischer Aminosäuren (rot). (B) Die verschiedenen Importin- α Domänen (u.a. das autoinhibitorische KRR-Motiv) sind farbig gekennzeichnet und Funktionen und Interaktionspartner aufgeführt. (C) Struktur von *Saccharomyces cerevisiae* Importin- α mit gebundener Nucleoplasmin-NLS (rot) (Conti und Kuriyan, 2000). Die 10 Armadillo- (ARM) Wiederholungen der Importin- α Isoform sind verschiedenfarbig dargestellt. Die NLS-Bindestellen sind in einer Furche auf der inneren Seite von Importin- α lokalisiert: Die Hauptbindestelle umfasst die ARM-Wiederholungen 1-4, während sich eine weitere Bindestelle in den ARM-Wiederholungen 6-8 befindet. (D) Importin- α (rot; Conti *et al.*, 1998) bildet einen ternären Komplex mit der cNLS des Cargoproteins (grün: bipartite Nucleoplasmin-cNLS; Conti *et al.*, 1998) und dem Transportrezeptor Importin- β_1 (blau; Cingolani *et al.*, 2000; 1999). (E) Schematische Darstellung der autoinhibitorischen Funktion der Importin- β -Bindedomäne (IBB). Im Importkomplex ist die IBB an Importin- β gebunden (blau). Nach Dissoziation des Komplexes im Kern durch RanGTP-Bindung (türkis) an Importin- β , konkurriert die IBB mit NLSs um die Bindung an die ARM-Domäne von Importin- α (grün). Dies resultiert in der Freisetzung des Cargos (Kobe, 1999; modifiziert nach Goldfarb *et al.*, 2004 und Stewart, 2007).

Beide zeichnen sich durch eine Anzahl basischer Aminosäuren aus. So erkennen sie einerseits einteilige (monopartite) NLS, wie die SV40- oder NF- κ B p65-NLS, die aus einem einzelnen Cluster von vier bis fünf basischen Aminosäuren bestehen (PKKKRKV bzw. EEKRKR; Poon und Jans, 2005). Alternativ werden zweiteilige (bipartite) NLS, wie die Nukleoplasmin-NLS, erkannt. Diese bestehen aus zwei Clustern basischer Aminosäuren, welche von einer *Spacer*-Region aus 10 bis 12 sauren Aminosäuren getrennt sind (KRPAATKKAGQAKKKK; Abb. 12A; Cook *et al.*, 2007; Lange *et al.*, 2007). Die Hauptbindestelle (*major site*) der NLS befindet sich zwischen der 2. und 4. ARM-Wiederholung (Abb. 12C; Conti *et al.*, 1998). An diese erfolgt die Bindung von monopartiten NLS (Conti *et al.*, 1998). Der C-Terminus einer bipartiten NLS interagiert ebenfalls mit der Hauptbindestelle, während der N-terminale Teil der bipartiten NLS an eine kleinere Bindestelle (*minor site*) bindet, die sich zwischen der 6. und 8. ARM-Wiederholung befindet (Conti und Kuriyan, 2000; Conti *et al.*, 1998; Kelley *et al.*, 2010). Die Zugänglichkeit der NLS-Bindestellen für ein Cargoprotein wird durch einen autoinhibitorischen Mechanismus der Importin- α Isoformen reguliert. Im autoinhibierten Zustand interagiert die größtenteils basische IBB-Domäne des Importin- α in *cis* mit der negativ geladenen NLS-Bindestelle bestehend aus Tryptophan, Asparagin und sauren Aminosäuren (Abb. 12E; Kelley *et al.*, 2010; Stewart, 2007). Hat hingegen die NLS eines Cargoproteins an die NLS-Bindestelle gebunden, interagiert die IBB-Domäne in *trans* mit dem Importin- β_1 Transportrezeptor. Weiterhin regulieren verschiedene Formen der intra- (*cis*) und intermolekularen (*trans*) Maskierung dieser Bindestellen die Effizienz des nukleozytoplasmatischen Transports. Hierzu gehören Phosphorylierungen (Nardozzi *et al.*, 2010), Acetylierungen (Bannister *et al.*, 2000), Änderungen der Calciumkonzentration und Konformationsänderungen, z.B. aufgrund von Disulfidbrückenbildung (Okada *et al.*, 2008; Poon und Jans, 2005).

1.2.4 Importin- α Funktionen

Die Hauptfunktion der Importin- α Isoformen ist der Transport von Cargoproteinen in den Zellkern der eukaryotischen Zelle. Proteine, die eine NLS besitzen und damit eine nukleäre Zielbestimmung aufweisen, werden importiert. Hierzu gehören u.a. Histone, DNA- und RNA-Polymerasen und Transkriptionsfaktoren. Die verschiedenen Isoformen weisen zell- und gewebespezifische Expressionsmuster sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene auf (Itman *et al.*, 2009; Jans *et al.*, 2000; Köhler *et al.*, 2002; Yasuhara *et al.*, 2009). Eine Dysregulierung dieser Importin- α Expressionsmuster wird mit bestimmten Differenzierungszuständen der Zelle und einigen Krankheitsbildern in Verbindung gebracht. So ist während der Zelldifferenzierung die kontrollierte zeitweise Expression und Repression bestimmter Importin- α Isoformen für den phasenspezifischen Import bestimmter, mit Entwicklungsprozessen assoziierter Transkriptionsfaktoren essentiell (Okada *et al.*, 2008).

Insbesondere Importin- $\alpha 3$ scheint bei der Differenzierung von Zellen eine wichtige Rolle zu spielen (Köhler *et al.*, 2002). Es wurden Funktionen der Importin- α Isoformen bei der neuronalen Differenzierung (Yasuhara *et al.*, 2007), der Differenzierung von Kardiomyocyten (Perez-Terzic *et al.*, 2007), Keratinozyten (Umegaki *et al.*, 2007) und Myozyten (van der Giessen und Gallouzi, 2007) sowie bei der Keimzellenreifung beschrieben (Hu *et al.*, 2010; Kelley *et al.*, 2010; Okada *et al.*, 2008). Eine anomale Dysregulierung der Importin- α Isoformen resultiert in Defekten bei der Fertilität und Embryogenese (Rother *et al.*, 2011; Terry *et al.*, 2007). In Krebszellen weist die Importin- $\alpha 1$ Isoform eine Überexpression auf, die prognostischen Wert hat (Dankof *et al.*, 2007): Sowohl bei Dickdarm-, Brust- und Lungenkrebs korreliert sie mit einer schlechten Prognose und einer geringen Überlebenschance (Dahl *et al.*, 2006; Kau *et al.*, 2004; Winnepenninckx *et al.*, 2006).

Auch einige Pathogene, deren Proteine oder Genome zur erfolgreichen Infektion und Replikation in den Zellkern der Wirtszelle transportiert werden müssen, nutzen die Kernimportmaschinerie des Wirts zu ihren Zwecken. Hierzu gehören fast alle DNA-Viren und einige RNA-Viren (Influenzavirus, Poliovirus, Rhinoviren, *Vesicular Stomatitis Virus*; Gustin, 2003; Satterly *et al.*, 2007). Proteine des Ebolavirus (VP24) oder des SARS-assoziierten Coronavirus (SARS-CoV ORF6 Protein) binden an die Importin- $\alpha 5$ bzw. Importin- $\alpha 1$ Isoform, halten sie im Zytoplasma zurück und unterbinden so ihre Transportfunktionen und damit auch die zelluläre, antivirale Immunantwort (Frieman *et al.*, 2007; Reid *et al.*, 2006).

In Hinblick auf Importin- α Funktionen und die Influenzavirus Infektion konnte u.a. gezeigt werden, dass virales HPAIV-Wachstum im Säuger von den Importin- α Isoformen $\alpha 1$ und $\alpha 3$ abhängt (Gabriel *et al.*, 2011). Im Gegensatz dazu weisen säugeradaptierte und humane Influenzaviren in humanen Lungenzellen eine Abhängigkeit von den Importin- α Isoformen $\alpha 1$ und $\alpha 7$ auf. Somit findet während der Säugeradaptation des HPAIVs ein Wechsel (*Switch*) in der Importin- α Nutzung von Importin- $\alpha 3$ zu Importin- $\alpha 7$ Abhängigkeit statt (Gabriel *et al.*, 2011). Die hierfür verantwortlichen, wirtsadaptiven Signaturen PB2 D701N und NP N319K tragen zu einer generell erhöhten Bindung der humanen Importin- α Isoformen an das monomere PB2 und NP bei. Dadurch wird der Kerntransport dieser RNP-Untereinheiten verstärkt und im Zellkern werden mehr vRNPs gebildet, die letztendlich zu einer erhöhten Polymeraseaktivität führen (Gabriel *et al.*, 2007; 2008; 2011).

Abgesehen von den ausführlich diskutierten Kerntransportfunktionen der Importin- α Isoformen wurden in den letzten Jahren auch vermehrt transportunabhängige Funktionen dieser Isoformen berichtet. Dazu gehört u.a. auch eine genregulatorische Aktivität (Yasuda *et al.*, 2012). U.a. Miyamoto *et al.* zeigten, dass diverse zelluläre Stresse, einschließlich oxidativem Stress, einen Zusammenbruch des Ran-Gradienten zur Folge haben (Miyamoto *et al.*, 2002; Miyamoto *et al.*, 2004). Dieser resultiert in einer Akkumulation von Importin- α im

Zellkern und einer darauffolgenden Blockierung des Kernimports. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass im Kern zurückgehaltenes Importin- α 1 an DNase I-sensitive, nukleäre Komponenten bindet und dabei eine selektive Hochregulierung der mRNA-Expression der Serin/Threoninkinase 35 (STK35) zur Folge hat (Yasuda *et al.*, 2012). Weiterhin korreliert eine konstitutive Überexpression von STK35 unter oxidativem Stress mit vermehrtem, caspaseunabhängigen Zelltod. Dies zeigt, dass kernlokalisiertes Importin- α 1 die Genexpression einzelner Gene spezifisch beeinflusst und damit direkt zum Zellschicksal, einschließlich nicht-apoptotischem Zelltod, beiträgt (Yasuda *et al.*, 2012). Es wurde zudem beschrieben, dass die Importin- α Isoformen unabhängig von ihrer Kernimportfunktion eine Rolle bei der Qualitätskontrolle von mRNA und U snRNA (*U small nuclear RNA*) spielen (Dias *et al.*, 2010). Hiernach regulieren sie zusammen mit Importin- β die Bindung und Freisetzung dieser Cap-Struktur-haltigen RNA-Spezies an den CAP-Bindekomplex (CBC) im Nukleus bzw. Zytoplasma der Zelle (Dias *et al.*, 2010). Für die Importin- β Proteine und den Importfaktor RanBP5 wurde weiterhin von einer, den Hitzeschockproteinen ähnlichen Funktion, als Chaperone berichtet (Hutchinson und Fodor, 2012; Jäkel *et al.*, 2002). Eine derartige Regulierung der Proteinstabilität wäre aufgrund der Strukturähnlichkeit auch für die Importin- α Isoformen denkbar.

Drei unabhängige Studien konnten neue, transportunabhängige Funktionen der Importin- α Isoformen im Replikationszyklus von Influenzaviren aufdecken. Resa-Infante *et al.* zeigten, dass die Importin- α Isoformen für die Funktionalität des RNP-Komplexes von Influenzaviren essentiell sind (Resa-Infante *et al.*, 2008). Eine Mutation der NLS des viralen PB2-Proteins hatte keinen entscheidenden Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von PB2, jedoch war die Funktionalität des RNP-Komplexes beeinträchtigt. Es wurde daher postuliert, dass die Importin- α Isoformen eine Rolle bei der viralen Transkription/Replikation oder dem korrekten Zusammenbau des RNP-Komplexes spielen (Resa-Infante *et al.*, 2008). Diese Hypothese wurde durch unabhängige, strukturelle und kinetische Untersuchungen gestützt. Demnach führt die Bindung von Importin- α an die PB2-Untereinheit der Polymerase zu einer Strukturveränderung, die einen erleichterten Einbau in den RNP-Komplex zur Folge haben könnte (Boivin und Hart, 2011; Tarendeau *et al.*, 2007). Hiernach hat die Komplexbildung von Importin- α mit PB2 eine Reorganisation des viralen Polymerasekomplexes zur Folge und trägt damit aktiv zur Bildung funktionaler vRNPs bei (Boivin und Hart, 2011). Alternativ hierzu könnten spezifische Importin- α -vRNP Interaktionen indirekt andere zelluläre Faktoren rekrutieren, die eine zusätzliche regulatorische Wirkung auf die virale Polymerase haben. Es wäre jedoch auch denkbar, dass Importin- α direkt als Kofaktor für die virale Transkription und Replikation im Kern dient (Resa-Infante *et al.*, 2008; Yasuda *et al.*, 2012). In einer aktuellen, dritten Studie wurde gezeigt, dass unterschiedliche Importin- α Isoformen einen differenziell regulatorischen Effekt auf die Polymeraseaktivität

aviärer und humaner Influenzaviren mit der wirtsadaptiven PB2 E627K-Signatur haben, ohne den Kerntransport direkt zu beeinflussen (siehe auch 1.1.8.1; Hudjetz und Gabriel, 2012). Interessanterweise korrelierte hier die erhöhte humane Polymeraseaktivität mit einer erhöhten Importin- α 1 und - α 7 Bindung an vRNPs, die sich jedoch nicht in einem erhöhten Kernimport äußerte (Hudjetz und Gabriel, 2012). Welcher Mechanismus diese Abhängigkeit der humanen Viren im Gegensatz zu den aviären Viren aufhebt, war bislang unbekannt.

Zusammenfassend zeigt dies, dass die Importin- α Isoformen zusätzlich zu ihrer primären Funktion als Kernimportfaktoren noch eine Vielzahl transportunabhängiger Funktionen für zelluläre und auch pathogenbezogene Prozesse ausüben, deren molekulare Mechanismen noch größtenteils unverstanden sind.

1.2.5 Kerntransport der Untereinheiten des viralen RNP-Komplexes

Die vier vRNP-Untereinheiten besitzen allesamt putative Kernlokalisierungssignale (PB1: Nath und Nayak, 1990; PB2: Mukaigawa und Nayak, 1991; PA: Nieto *et al.*, 1994; NP: Cros *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 1997), so dass jede Untereinheit separat transportiert werden könnte (Huet *et al.*, 2010).

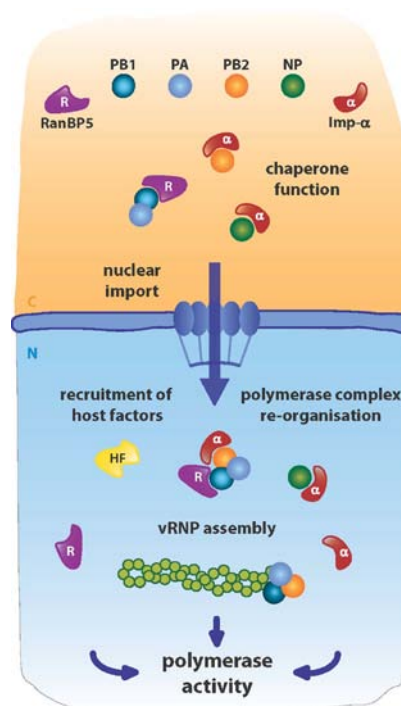


Abb. 13: Potenzielle Funktionen der Importproteine beiderseits der Kernmembran. Für das Importin- β -Homolog RanBP5 (R) und Importin- α (α) wurde eine Funktion als Chaperon postuliert, höchstwahrscheinlich zur Vermeidung von PB1- und NP-Aggregaten (Boulo *et al.*, 2011; Hutchinson und Fodor, 2012). Importin- α besitzt zudem eine Funktion in der Reorganisation des viralen Polymerasekomplexes bei der Formation funktioneller vRNP-Komplexe (Boivin und Hart, 2011). Nach erfolgtem Import wird Importin- α für die virale Transkription und/oder Replikation benötigt (Resa-Infante *et al.*, 2008). Zusätzlich könnte Importin- α indirekt andere zelluläre Wirtsfaktoren (HF) an den vRNP-Komplex rekrutieren, die ebenfalls die Polymeraseaktivität beeinflussen können (Hudjetz und Gabriel, 2012). C, Zytoplasma; N, Nukleoplasma (aus Resa-Infante und Gabriel, 2013).

Monomerisches NP und PB2-Protein (Gabriel et al., 2008; Tarendeau et al., 2007) werden durch direkte Interaktion mit Importin- α über den klassischen Importin- α/β Weg in den Kern transloziert, um im Kern den vRNP zu bilden (Abb. 13). Dies gilt höchstwahrscheinlich ebenso für den Transport der kompletten vRNPs, wobei Importin- α direkt an virales NP im vRNP bindet (Cros et al., 2005; Wang et al., 1997). Die PB1- und PA-Untereinheiten der Polymerase werden nach aktuellem Kenntnisstand Importin- α -unabhängig durch direkte Interaktion mit dem Importin- β Homolog RanBP5 befördert (Hutchinson und Fodor, 2012). Zusätzlich wurde postuliert, dass dies in Form eines PB1-PB2 oder PB1-PA Heterodimers geschieht (Abb. 13; Naito et al., 2007). Alternativ könnten auch PB2 und PA in Form eines Heterodimers in den Kern gelangen (Hemerka et al., 2009). Nach erfolgter Kerntranslokation aller Untereinheiten erfolgt der Zusammenbau der vRNPs im Kern.

1.3 Zielsetzung

Die Zellmembran ist eine der ersten Barrieren, die hochpathogene, aviäre Influenza A Viren (HPAIV) bei der Adaptation an den Säuger überwinden müssen. Dies geschieht durch den Wechsel in der Rezeptorspezifität des viralen Hämagglutinins. Nach dem Eintritt in die Zelle stellt die Kernmembran eine weitere wichtige Speziesbarriere dar, die der virale Ribonukleoproteinkomplex (vRNP) zur effizienten Transkription und Replikation des viralen Genoms im Kern überwinden muss. Hierfür bedient sich das Virus der zellulären Kerntransportmaschinerie. Es konnte gezeigt werden, dass HPAIV bei der Adaptation an den Säuger einen Wechsel (*Switch*) in der Spezifität für bestimmte Importin- α Isoformen durchlaufen. Die Replikation von HPAIV mit aviären Signaturen (PB2 627E, PB2 701D, NP 319N) ist in humanen Zellen abhängig von Importin- α 1 und - α 3, während die Replikation von humanen bzw. säugeradaptierten Influenzaviren mit humanen Signaturen (PB2 627K, PB2 701N, NP 319K) von Importin- α 1 und - α 7 abhängt. Dagegen wirkt Importin- α 3 als Inhibitor der Replikation von aviären, jedoch nicht von humanen Influenzaviren. Im Gegensatz dazu fungieren die Isoformen Importin- α 1 und - α 7 als Aktivatoren der Replikation von humanen Influenzaviren (Gabriel *et al.*, 2011; Hudjetz und Gabriel, 2012; Resa-Infante und Gabriel, 2013). Diese Daten zeigen eindeutig, dass HPAIV bei der Adaptation an den Säuger einen *Switch* in der Importin- α Nutzung durchlaufen müssen, um eine effiziente Replikation in Säugerzellen etablieren zu können.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob das Vorkommen der Importin- α Isoformen im Respirationstrakt des Säugers einen Selektionsdruck für den *Switch* in der Importin- α Nutzung bei der Säugeradaptation von HPAIV darstellt. Zum Studium dieser Effekte wurde das H7N7 Adaptationsmodell der SC35/SC35M Influenzaviren gewählt (Gabriel *et al.*, 2005; Scheiblauber *et al.*, 1995). Hierbei waren die wirtsadaptiven Signaturen in PB2 D701N und NP N319K für den *Switch* in der Importin- α Nutzung von Importin- α 3 zur - α 7 Abhängigkeit und damit dem Wirtswechsel verantwortlich (Gabriel *et al.*, 2011). Folglich wurde die Rolle dieser adaptiven Signaturen hinsichtlich der Virusreplikation zusätzlich zum Vorkommen der Importin- α Isoformen speziell im Respirationstrakt des Säugers analysiert. Folgende Fragestellungen sollten diesbezüglich anhand des Adaptationsmodells untersucht werden:

- 1) Wird die Polymeraseaktivität von aviären bzw. säugeradaptierten H7N7 Influenzaviren *in vitro* durch humane Importin- α Proteine reguliert?
- 2) Wie wirkt sich das Fehlen der negativ regulatorischen Importin- α 3 Isoform bzw. der proliferativen Importin- α 7 Isoform in murinen Zellen auf das virale Wachstumsverhalten *in vitro* aus?

- 3) Wie sehen die Expressionsmuster der Importin- α Isoformen im Respirationstrakt der Maus und des Menschen aus?
- 4) Führt die Infektion mit den Viren des H7N7-Adaptationsmodells zu einer Dysregulierung der Importin- α Isoformen in der murinen Lunge und hat dies Auswirkungen auf den Ausgang der Infektion *in vivo*?
- 5) Haben die wirtsadaptiven Signaturen PB2 D701N und NP N319K *in vivo* einen Einfluss auf die Pathogenität von H7N7 Influenzaviren unterschiedlicher Wirtsspezifitäten in Wildtyp und Importin- α ^{-/-} Mäusen?

2 Material

2.1 Puffer, Lösungen und Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Lösungen in doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) angesetzt.

Bezeichnung	Zusammensetzung (Hersteller)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth
Avicel (mikrokristalline Cellulose)	FMC BioPolymer
Avicel-Lösung	2,5 % Avicel → Autoklavieren
Bacto-Agar	BD Biosciences
Blocking-Puffer (Western Blot)	3 % BSA (Sigma-Aldrich) in PBS-T
Blocking-Puffer (IHC-P)	10 % Eselserum (Abcam) in 1x PBS
Bromphenolblau	Carl Roth
Citratpuffer	10mM (pH6.0)
Dekalzifizierungslösung	10 % EDTA (pH 7,4) (Sigma-Aldrich)
DEPC-ddH ₂ O	0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (Sigma-Aldrich) in ddH ₂ O → ÜN bei RT oder min. 12 h bei 37 °C rühren lassen, dann autoklavieren
DEPC-1x PBS	0,1 % Diethylpyrocarbonat (Sigma-Aldrich) in 1x PBS von PAA, Behandlung wie DEPC-ddH ₂ O
Eukitt	Kindler
Glykogen (<i>Mytilus edulis</i> , 12-22 mg/ml)	Sigma-Aldrich
HEPES-Ringerlösung (pH 7,4)	5,6 mM KCl (Carl Roth) 136,4 mM NaCl (Merck) 1 mM MgCl ₂ · 6H ₂ O (Sigma-Aldrich) 2,2 mM CaCl ₂ · 2H ₂ O (Merck) 11 mM Glucose (Carl Roth) 10 mM HEPES (Biomol) pH 7,4 (mit NaOH)
Iodlösung	volumetrisch, 0,5 M I ₂ (1,0 N) (FLUKA)
Isopentan	FLUKA (# 59080)
Kaisers Glyceringelatine	Merck

Kristallviolettlösung	270 ml 37 % Formaldehyd (Merck) 1 g Kristallviolett (Merck) ad 1 L ddH ₂ O
Kresylviolett färbelösung	1 % Kresylviolettacetat (Sigma-Aldrich, # 860980) in 50 % Ethanol
Laemmli-Proteinprobenpuffer (4x)	0,2 M Tris-HCl (Carl Roth) 8 % SDS (Sigma-Aldrich) 40 % Glycerol (Invitrogen) 0,25 % Bromphenolblau (Merck) 40 mM DTT (Serva) pH 6,8
Mineralöl	Sigma-Aldrich
Natriumacetatlösung	0,05 M (pH 5,0 mit Eisessig)
Paraffin (<i>Low Melting Paraffine</i>)	DCS Labline (# PL003S2K)
Paraformaldehyd (PFA)	4 % PFA (AppliChem) in 1x PBS
PBS (10x)	26,8 mM KCl (Carl Roth) 17,6 mM KH ₂ PO ₄ (Merck) 1,37 M NaCl (Merck) 51,3 mM Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O (Merck) ad. 1 L ddH ₂ O → pH 7,4
PBS-T (1x)	0,1 % Tween-20 (Serva) in 1x PBS
Protease für IHC-P	0.1 % in 37°C PBS. Lagerung bei -20 °C. Sigma (# P-5147)
Sammelgelpuffer	1,5 M Tris (Carl Roth) pH 6,8
SDS-PAGE-Laufpuffer (10x)	250 mM Tris (Carl Roth) 1,92 M Glycin (Merck) 1 % SDS (Sigma-Aldrich)
SDS-PAGE-Sammelgel (pH 6,8; 5 %)	3,4 ml ddH ₂ O 630 µl Sammelgelpuffer (pH 6,8) 50 µl 10 % SDS 830 µl 30 % Rotiphorese 5 µl TEMED 50 µl 10 % APS

SDS-PAGE-Trenngel (pH 8,8; 8 %)	4,6 ml ddH ₂ O 2,5 ml Trenngelpuffer (pH 8,8) 100 µl 10 % SDS 2,7 ml 30 % Rotiphorese 6 µl TEMED 100 µl 10 % APS
<i>Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound</i> Einbettmedium	Sakura Finetek Europe B.V. → zur Verwendung auf 50 % mit 1x PBS verdünnen
Transferpuffer (Western Blot, 10x)	250 mM Tris (Carl Roth) 1,92 M Glycin (Merck) → zur Verwendung auf 1x verdünnen, inkl. 20 % Methanol (Merck)
Trenngelpuffer	1,5 M Tris (Carl Roth) pH 8,8
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris (Carl Roth) 1 M Essigsäure (Merck) 50 mM EDTA, pH 8,0 (Sigma-Aldrich) pH 8,0
Waschpuffer IHC-P	0,05 % Tween-20 (Serva) in 1x PBS
Xylol	Merck
Zelllyse-Puffer	50 mM HEPES (Biomol) (pH 8,0) 200 mM NaCl (Merck) 0,5 % Igepal (Sigma-Aldrich) 25 % Glycerol (Invitrogen) 10 µl/ml PMSF (1 mM, Sigma-Aldrich, 100x; 0,1 M-Stock) 0,07 µl/ml β-Mercaptoethanol (Fluka) 1x HALT™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (100x, Pierce / Thermo Scientific) 1x EDTA Solution (0,5 M, 100x, Pierce / Thermo Scientific)

2.2 Fertige Lösungen und Reaktionssysteme (Kits)

Bezeichnung	Hersteller
AEC Substrat IHC-P	1 Tablette (20 mg) 3-Amino-9-ethyl-carbazol (AEC, Sigma) in 2,5 ml N,N-Dimethylformamid (DMF)
<i>Avidin/Biotin Blocking Kit SP2001</i>	Biozol
Citrat Plus Puffer (10x)	DCS

DNA-Ladepuffer (6X MassRuler DNA Loading Dye)	Fermentas / Thermo Scientific
DNase I (1 U/μl)	Sigma-Aldrich (# AMPD1)
DNase I-Puffer (10x)	Sigma-Aldrich (in AMPD1 enthalten)
DNase / RNase-freies Wasser (UltraPure DNase / RNase-Free Distilled Water)	Gibco / Life Technologies
DNase I Stop Solution (50 mM EDTA)	Sigma-Aldrich (in AMPD1 enthalten)
dNTP-Mix (5 mM each, in Omniscript RT Kit enthalten)	QIAGEN
peqGOLD dNTP-Mix (10 mM each)	Peqlab
DTT (0,1 M, in SuperScript™ III Reverse Transcriptase-Kit enthalten)	Invitrogen / Life Technologies
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega
Eosin-Y-Lösung	Merck
First Strand Buffer (5x, in SuperScript™ III Reverse Transcriptase-Kit enthalten)	Invitrogen / Life Technologies
Hühnervollblut mit Citrat	Lohmann Tierzucht (# 570001)
innuprep RNA Minikit	Analytik Jena
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Mayers Häkalaunlösung	Merck
Micro BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
Ottix Plus	DiaPath
Ottix Shaper	DiaPath
Pursept-A Xpress	Merz Hygiene GmbH
QIAGEN RNeasy® FFPE Kit	QIAGEN
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	QIAGEN
QIAGEN OneStep RT-PCR Kit	QIAGEN
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
RiboLock RNase Inhibitor	Fermentas / Thermo Scientific (40 U/μL)
RNAlater RNA Stabilization Reagent	QIAGEN
RNase-Free DNase Set	QIAGEN
RNasin® Ribonuclease Inhibitor	Promega (40 U/μl, # N251B)
ROX Reference Dye (in Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (2x)-Kit enthalten)	Invitrogen / Life Technologies
SuperBlock T20 (TBS)	Pierce / Thermo Scientific
SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate	Pierce / Thermo Scientific

ZytoChemPlus (HRP) Broad Spectrum (DAB) Kit Zytomed

2.3 Verbrauchsmaterial und Glaswaren

Bezeichnung	Hersteller
Bastelkleber ohne Lösungsmittel	UHU
Chromatographiepapier 3MM Chr	Whatman
Whatman-Papier	A. Hartenstein
Deckgläser	VWR (# 631-0150)
Einmal-Katheter <i>BD Venflon™ Pro Peripheral IV</i> (20 G 1,26 inch, 1,1 x 32 mm)	BD (# 393204)
Einmal-Injektionskanüle <i>Microlance™ 3</i> (26G 3/8", 0,45 x 10 mm)	BD
Einmal-Injektionskanüle <i>Microlance™ 3</i> (27G 3/4", 0,4 x 19 mm)	BD
Einmal-Injektionskanüle <i>Microlance™ 3</i> (25G 1", 0,5 x 25 mm)	BD
Einmal-Injektionskanüle <i>Sterican</i> (20G 2 ^{3/4} ", 0,90 x 70 mm)	B.Braun Melsungen AG
Einmalskalpell (Surgical Disposable Scalpels)	B. Braun Melsungen AG (# 5518083)
Einmalspritzen <i>Omnifix®</i> (3 ml / Luer Lock Solo)	B. Braun Melsungen AG
Einmalspritzen <i>Omnifix®</i> (10 ml / Luer Solo)	B. Braun Melsungen AG
Einmalspritzen <i>Omnifix®</i> (20 ml / Luer Lock Solo)	B. Braun Melsungen AG
Einmalspritzen <i>TERUMO® Syringe without needle</i> , U-100 Insulin (1 ml. 6 % Luer)	TERUMO Corporation
Einmalspritzen <i>Soft Ject</i> (1ml)	Henke Sass Wolf
EDTA-Kapillarblutentnahme-Röhrchen, 200 µl, präpariert für hämatologische Untersuchungen mit Gerinnungshemmer EDTA	KABE Labortechnik
Mahlkugeln (Glasperlen: Ø 0,50-0,75 mm)	Retsch (# 22.222.0003)
Mahlkugeln (rostfreier Stahl: Ø 2 mm)	Retsch (# 22.455.0010)
Nitrozellulosemembran <i>Hybond-C Extra</i>	Amersham Biosciences
Objektträger (# 10-002-00)	Marienfeld
2 ml-O-Ring-Reaktionsgefäße (bestehend aus 2 ml-Reaktionsgefäß, konisch mit Stehrand und Schraubverschluss mit Dichtung, natur, 12,0 mm)	Greiner bio-one (# 366380, # 722201)
Präzisionswischtücher	Kimtech Science

SuperFrost/Plus Objektträger	Menzel-Gläser
96-Loch-Mikrotiterplatte mit v-förmigen Vertiefungen für den HA-Test	Nunc
96-Vertiefungen-Mikrotiterplatte <i>MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode</i>	Invitrogen / Life Technologies (# 4306737)

Einwegkunststoffartikel und Kulturgefäße wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Falcon, Sarstedt, Biozym und Nunc bezogen.

2.4 Zellkulturmedien & -zusatzstoffe

Bezeichnung	Hersteller / Zusammensetzung
Albumin Lösung (35 % in DPBS)	Sigma-Aldrich
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	PAA
Dulbecco's PBS (1x)	PAA
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA
Infektionsmedium MDCK	MEM 0,2 % BSA 1 % L-Glutamin 1 % Penicillin und Streptomycin
Infektionsmedium MEF (serumfrei)	DMEM 1 % L-Glutamin 1 % Natrium-Pyruvat 1 % NEAA 1 % Penicillin und Streptomycin
Infektionsmedium MEF (serumhaltig)	DMEM 1 % FCS 1 % L-Glutamin 1 % Natrium-Pyruvat 1 % NEAA 1 % Penicillin und Streptomycin
Infektionsmedium MEF (serumhaltig, pH 5,0)	DMEM 1 % FCS 1 % L-Glutamin 1 % Natrium-Pyruvat 1 % NEAA 1 % Penicillin und Streptomycin → pH 5,0; sterilfiltrieren
L-Glutamin (200 mM)	PAA
Natrium-Pyruvat (100 mM)	PAA

NEAA (100x, nicht essenzielle Aminosäuren)	PAA
<i>Minimal Essential Medium</i> (MEM)	PAA
<i>Modified Eagle Medium 2x</i> (2x MEM)	PAA
Overlay für Plaquetest (<i>Low-viscosity Overlay</i> nach Matrosovich <i>et al.</i> , 2006)	50 % Overlay-Medium 50 % Avicel-Lösung (2,5 % Avicel)
Overlay-Medium für Plaquetest	2x MEM 0,4 % BSA 2 % L-Glutamin 2 % Penicillin und Streptomycin
Penicillin und Streptomycin (P/S, 100x)	PAA
<i>Reduced Serum Medium</i> (OPTI-MEM I)	GIBCO
Transfektionsmedium HEK 293T	DMEM 10 % FCS 1 % L-Glutamin
Trypsin-EDTA (1x)	PAA
Wachstumsmedium HEK 293T, A549, HeLa	DMEM 10 % FCS 1 % L-Glutamin 1 % Penicillin und Streptomycin
Wachstumsmedium MDCK	MEM 10 % FCS 1 % L-Glutamin 1 % Penicillin und Streptomycin
Wachstumsmedium MEF	DMEM 10 % FCS 1 % L-Glutamin 1 % Natrium-Pyruvat 1 % NEAA 1 % Penicillin und Streptomycin
Zelleinfriermedium	Wachstumsmedium +10 % DMSO +10 % FCS oder: FCS inkl. 10 % DMSO

2.5 Eukaryotische Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung
A549 (<i>Human Lung Adenocarcinoma Cells</i>)	humane Lungenepithelzelllinie

HEK293T (<i>Human Embryonic Kidney Cells</i>)	humane Nierenepithelzelllinie
HeLa (<i>Henrietta Lacks Cells</i>)	humane Zervixkarzinom-Epithelzelllinie
MDCK (<i>Madin-Darby Canine Kidney Cells</i>)	Cockerspaniel-Nierenzelllinie
MEF (<i>Murine Embryonic Fibroblast Cells</i>)	Murine, embryonale Fibroblastenzelllinie aus C57BL/6-Mäusen
Importin- $\alpha 3^{-/-}$ MEF, Importin- $\alpha 7^{-/-}$ MEF	Murine, embryonale Fibroblastenzelllinien, denen nach Gen- <i>knockout</i> die Importin- $\alpha 3$ oder Importin- $\alpha 7$ Isoform fehlt. Generiert und zur Verfügung gestellt von Stefanie Hügel / Franziska Rother (Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Bader, Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC), Berlin-Buch).

2.6 Eukaryotische Primärzellen

Bezeichnung	Beschreibung
hMDM (<i>human monocyte-derived macrophages</i>)	Primäre, aus humanen Monocyten ausdifferenzierte Makrophagen. Aus <i>Buffy Coat</i> generiert und zur Verfügung gestellt von Dr. Herwig Koppensteiner, ehemals Heinrich-Pette-Institut, Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie, Hamburg.

2.7 Bakterienmedien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Lösungen in doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) angesetzt.

Bezeichnung	Hersteller
Ampicillin (100 mg/ml)	Serva
Kryostock-Einfriermedium	50 % LB-Amp-Medium 50 % Glycerol
LB-Amp100-Agar	LB-Amp100-Medium 1,5 % Bakto-Agar
LB-Amp100-Medium	10 g/L Pepton 5 g/L Hefeextrakt 10 g/L NaCl pH 7,5 0,1 mg/ml Ampicillin

Alle Nährmedien wurden durch Autoklavieren sterilisiert. Einzelne Lösungen, wie z.B. Antibiotikallösungen, wurden sterilfiltriert und erst nach dem Abkühlen des Mediums zu diesem hinzugegeben.

2.8 Bakterienstämme

Bezeichnung	Hersteller
<i>Escherichia coli</i> SURE-2	Stratagene <u>Genotyp:</u> <i>e14</i> (<i>McrA</i> ⁻) Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>) <i>171 endA1 gyrA96 thi-1 supE44 relA1 lac recB</i> <i>recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan^r) uvrC [F' proAB</i> <i>lac^f ZΔM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]</i>
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	Stratagene <u>Genotyp:</u> <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> <i>supE44 relA1 lac [F'proAB lac^f ZΔM15 Tn10</i> <i>(Tet^r)]</i>

2.9 Virusstämme

Bezeichnung	Beschreibung
SC35	Rekombinantes HPAIV SC35 Influenza A Virus (H7N7) (Li <i>et al.</i> , 1990; Scheiblaue <i>et al.</i> , 1995)
SC35M	Rekombinantes, mausadaptiertes SC35M Influenza A Virus (H7N7) (Scheiblaue <i>et al.</i> , 1995)
SC35-PB2 _{701N}	Punktmutante des rekombinanten SC35 Virus (H7N7) mit säugerspezifischer PB2 701N-Signatur (Gabriel <i>et al.</i> , 2005)
SC35-NP _{319K}	Punktmutante des rekombinanten SC35 Virus (H7N7) mit säugerspezifischer NP 319K-Signatur (Gabriel <i>et al.</i> , 2005)
SC35-PB2 _{701N} -NP _{319K}	Doppelpunktmutante des rekombinanten SC35 Virus (H7N7) mit säuger- spezifischen Signaturen PB2 701N und NP 319K (Gabriel <i>et al.</i> , 2005)

2.10 DNA- und Protein-Größenstandards

Bezeichnung	Hersteller
<i>MassRuler DNA Ladder Mix</i> , Ready-to-Use 80-10 000 bp	Fermentas / Thermo Scientific
Precision Plus Protein™ Dual Color Standard	Bio-Rad

2.11 Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
Omniscript RT Kit	QIAGEN (# 205111)
<i>RevertAid H Minus Reverse Transcriptase</i>	Thermo Scientific (# K0451)
<i>SuperScript™ III Reverse Transcriptase</i>	Life Technologies (200 U/μl, # 18080)
<i>Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG</i> (2x)	Invitrogen / Life Technologies (# 11733)

2.12 Plasmide und Vektoren

Bezeichnung	Verwendung / Hersteller
pHW2000	Reverse Genetik / Leervektor (Hoffmann <i>et al.</i> , 2000)
pHW2000-SC35-PB2	
pHW2000-SC35-PB1	
pHW2000-SC35-PA	
pHW2000-SC35-NP	Reverse Genetik / Eukaryotische Proteinexpression
pHW2000-SC35M-PB2	(Gabriel <i>et al.</i> , 2005)
pHW2000-SC35M-PB1	
pHW2000-SC35M-PA	
pHW2000-SC35M-NP	
pRL-TK	Luciferase-Reporter (<i>Renilla reniformis</i>) (Promega)
pPol-I-NP-Luc-human	Luciferase-Reporter (<i>Photinus pyralis</i>) mit Luciferase-Gen (GenBank: AF053462), das unter der Kontrolle des humanen Polymerase I-Promotors steht und von den 3'- und 5'-Enden der nicht-kodierenden Regionen des A/WSN/33 (H1N1) Virus (GenBank: M30746) flankiert wird. (Gabriel <i>et al.</i> , 2005)

2.13 DNA-Oligonukleotide

2.13.1 DNA-Oligonukleotide für Sequenzierreaktionen

Die DNA-Oligonukleotidsynthese erfolgte über den externen Dienstleister Sigma-Aldrich (http://www.sigmaaldrich.com/configurator/servlet/DesignTool?prod_type=STANDARD).

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
Amplifikation des CMV-Promotors	
F: CMV_F	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
Amplifikation des BGH-polyA	
R: BGH_R	TAGAAGGCACAGTCGAGG
Amplifikation von pPol-I-NP-Luc-human	
F: oH-94 Luc-fw	GGGATTTTCAGTCG
R: oH-95 Luc-rv	GCTGATGTAGTCTC
Amplifikation von SC35 & SC35M PB1 (AC# DQ266098.1)	
F: SC35/M-PB1-244fw	CCTGAGGATAATGAGCCAAGTG
F: SC35/M-PB1-833fw	GACTTCCAGTTGGAGGCAATG
F: SC35/M-PB1-1341fw	CGGACTCCAATCCTCTGATG

F: SC35/M-PB1-1843fw	CCGGAAGTCTGCCTGAAATG
Amplifikation von SC35 & SC35M PB2 (AC# DQ266097.1)	
F: SC35/M-PB2-269fw	CAAATGACGCCGGCTCAGAC
F: SC35/M-PB2-828fw	GAGAAGGGCAACAGTATCAG
F: SC35M-PB2-1267fw	GTTCGAGGTGACCTGAACTTTG
F: SC35/M-PB2-1831fw	CAAATGCGAGATGTGCTTGG
Amplifikation von SC35 PB2 (AC# DQ266097.1)	
F: SC35-PB2-1297fw	GCAAACCAGCGGTTGAACCC
Amplifikation von SC35 & SC35M PA (AC# DQ266099.1)	
F: SC35/M-PA-218fw	CTGGCGATCCAAATGCACTC
F: SC35/M-PA-663fw	GCTCGCCAACCAAAGTCTCC
F: SC35/M-PA-1208fw	GCGATGAGCCAGAACAAGATCAC
F: SC35/M-PA-1809fw	GATTGAGGCCGAGTCCTCTG
Amplifikation von SC35 & SC35M NP (AC# DQ266096.1)	
F: SC35/M-NP-186fw	CAAACCTCAGCGACTATGAAGGG
F: SC35/M-NP-633fw	GATCAAGCGAGGGATCAATG
F: SC35/M-NP-1024fw	CAACTGGTATGGATGGCATGTC
F: SC35/M-NP-1324fw	GCGGCATTTACAGGAAACAC

F: Vorwärts-Primer, R: Rückwärts-Primer. AC#: GenBank-Zugriffsnummer (*Accession number*)

2.13.2 DNA-Oligonukleotide (RT-PCR)

Für die cDNA-Generierung wurden *random*-Oligodesoxynukleotide verwendet, die in ihren sechs bzw. neun Basen jede mögliche Sequenzkombination beinhalten. Dies gewährleistet die zufällige Bindung an alle möglichen RNA-Sequenzen auf der gesamten Länge der mRNA. Oligo-d(T)-Primer würden hingegen nur die vom Polyadenylierungssignal ausgehenden 3'-Regionen der mRNA selektiv amplifizieren und dadurch bei langen Transkripten nicht zu einer Amplifikation der 5'-Regionen der mRNA führen.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3') und Funktion
pd(N) ₉	d(N) ₉ <i>Random Nonamers</i> : 9-Basen Oligodesoxynukleotide cDNA-Generierung in der RT-PCR (Gene Link™, # 26-4000-06)
pd(N) ₆	d(N) ₆ <i>Random Hexamers</i> : 6-Basen Oligodesoxynukleotide cDNA-Generierung in der RT-PCR (MWG Operon)
Random Primers	cDNA-Generierung in der RT-PCR (Promega, 500 ug/ml, # C1181)

2.13.3 DNA-Oligonukleotide (RT-qPCR: human / murin)

Die Kriterien zur RT-qPCR Primererstellung sind 3.3.4 zu entnehmen. Die DNA-Oligonukleotidsynthese erfolgte über den externen Dienstleister Sigma-Aldrich (http://www.sigmaaldrich.com/configurator/servlet/DesignTool?prod_type=STANDARD).

Gen	Genlocus, GenBank-Nr., Bezeichnung und Sequenz (5'→3')	Tm [°C]	Amplicon [bp]
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	human: 12p13, Chromosom: 12; NC_000012.11 (6643585..6647537); GenBank: NM_002046.4		
	F: hGAPDH_4fw GGGAAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC	59,0	247
	R: hGAPDH_250rev TGGAGGGATCTCGCTCCTGGAAGATG	61,1	
	murin: 6 F2; 6 59.32 cM, Chromosom: 6; NC_000072.6 (125161852..125165583, complement); GenBank: GU214026.1		
β-Actin	F: mGAPDH_849fw CCACTGAAGGGCATCTTGGGCTAC	59,3	224
	R: mGAPDH_1072rev GGTGGGTGGTCCAGGGTTTCTTAC	58,9	
	human: 7p22, Chromosom: 7; NC_000007.13 (5566779..5570232, complement); GenBank: AY582799.1		
	F: hb-Act_616fw CGGAAATCGTGCGTGACATTAAGGAG	60,2	218
β-Actin	R: hb-Act_833rev GTAGTTTCGTGGATGCCACAGGACTC	59,4	
	murin: 5 G2; 5 81.8 cM, Chromosom: 5; NC_000071.6 (142903116..142906724, complement); GenBank: NM_007393.3		
	F: mb-Act_663fw GGGAAATCGTGCGTGACATCAAAGAG	58,7	204
	R: mbAct_866rev TGCCACAGGATTCCATACCCAAGAAG	58,6	
Importin-α1 (KPNA2)	human: 17q24.2, Chromosom: 17; NC_000017.10 (66031848..66042970); GenBank: NM_002266.2		
	F: hImp-a1_81fw GAGGCGTCGCAGAATAGAGGTCAATG	59,5	225
	R: hImp-a1_305rev TTCCTGGCAGCTTGAGTAGCTTGGAG	60,5	

	<p>murin: 11 E1; 11, Chromosom: 11; NC_000077.6 (106988629..106999525, complement); GenBank: NM_010655.3</p> <p>F: mImp-a1_81fw GCGTCGCCGCCGAATAGAAGTTAATG</p> <p>R: mImp-a1_305rev TTCCGAGCAGCTTGAGTAGCTTGGAG</p>	61,0	225
Importin- α 3 (KPNA4)	<p>human: 3q25.33, Chromosom 3, NC_000003.11 (160212783..160283376, complement); GenBank: NM_002268.4</p> <p>F: hImp-a3_682fw TGTCGCCACAAAGACCCACCAC</p> <p>R: hImp-a3_889rev CCTGGTGGCTGAGCAGAGGAAC</p>	59,5	208
	<p>murin: 3; 3 E2, Chromosom: 3; NC_000069.6 (69072221..69127092, complement); GenBank: NM_008467.4</p> <p>F: mImp-a3_987fw ACACTTCCCAGCACTCCTCACTCATC</p> <p>R: mImp-a3_1221rev AAGATAGGCCACTTGGTCTTTCCTTCC</p>	60,0	235
Importin- α 4 (KPNA3)	<p>human: 13q14.3, Chromosom 13, NC_000013.10 (50273443..50367057, complement); GenBank: NM_002267.3</p> <p>F: hImp-a4_699fw CCCGCCGCCTATGGAGACAGTTC</p> <p>R: hImp-a4_954rev CTGCTCGTCGGTGCCAGTCACTATG</p>	61,2	256
	<p>murin: 14 D1; 14, Chromosom: 14; NC_000080.6 (61365186..61439947, complement); GenBank: NM_008466.5</p> <p>F: mImp-a4_784fw ACTGTTTGGGCGCTGTCATACTTG</p> <p>R: mImp-a4_1000rev GGTTTGGGAAGTGGGACAGGACATC</p>	58,0	217
Importin- α 5 (KPNA1)	<p>human: 3q21, Chromosom 3, NC_000003.11 (122140748..122233786, complement); GenBank: NM_002264.3</p> <p>F: hImp-a5_74fw GCAGGAGGAGGGAGGAAGAAGGAC</p> <p>R: hImp-a5_310rev GTGTTGCTGAAAGCTGTTGCTCTGGG</p>	59,8	237

	murin: 16 B4-B5; 16, Chromosom: 16; NC_000082.6 (35983363..36036162); GenBank: NM_008465.5		
	F: mImp-a5_720fw TAGAGGGAAGAGCCACCTCCAG	58,6	239
	R: mImp-a5_958rev CAGCCCGCAAAGCAGGAGAAAC	58,9	
Importin- α 7 (KPNA6)	human: 1p35.1, Chromosom 1, NC_000001.10 (32573644..32642169); GenBank: NM_012316.4		
	F: hImp-a7_763fw CCTGTACTGTCTCGCCTACTCTTCAGC	60,1	204
	R: hImp-a7_966rev GACGATGTTACCCACGGCTCTCAG	59,1	
	murin: 4; 4 D2.3, Chromosom: 4; NC_000070.6 (129643979..129672767, complement); GenBank: NM_008468.4		
	F: mImp-a7_282fw TGA CTTGCAGTTAGCAACCACGCAG	58	231
	R: mImp-a7_512rev ATGGGGACAGCTCCTGCTTCAATG	59	

F: vorwärts-Primer, R: rückwärts-Primer

2.13.4 RNA-Oligonukleotide

Bezeichnung	Hersteller
Kontroll-siRNA: <i>AllStars Negative Control siRNA</i>	QIAGEN (# 1027281)
humane Importin- α 3 siRNA (hKPNA4)	Sequenz (5'→3') <i>sense</i> : CAACUUAUGUCGCCACAAUUUUU <i>antisense</i> : AAUUUGUGGCGACAUAAGUUGUU Synthese: Sigma-Aldrich (Gabriel <i>et al.</i> , 2011)

2.14 Primäre Antikörper

Bezeichnung	Ursprung / Verwendung / Hersteller
Anti-FPV Serum	Kaninchen, polyklonal 1:4000 (Western Blot) 1:2000 (IHC-P) Prof. H.-D. Klenk (Institut für Virologie, Marburg, Deutschland)
Anti-GAPDH	Kaninchen, monoklonal 1:1000 (Western Blot) Cell Signaling (# 2118)

Anti-hImportin- α 1	Kaninchen polyklonal 1:1000 (Western Blot) 1:200 (IHC-P) Abcam (# ab54489; nicht länger erhältlich)
Anti-hImportin- α 3	Kaninchen polyklonal 1:150 (IHC-P) Novus Biologicals (# NB100-93345, # NB100-81651)
Anti-hImportin- α 3	Ziege polyklonal 1:1000 (Western Blot) Abcam (# ab6039)
Anti-hImportin- α 5/ α 7	Kaninchen polyklonal 1:10000 (Western Blot) 1:1000 (IHC-P) Prof. E. Hartmann (Institut für Biologie, Universität zu Lübeck, Lübeck, Deutschland)

2.15 Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Ursprung / Verwendung / Hersteller
Anti-Maus-HRP	Ziege, polyklonal 1:50000 (Western Blot) Sigma-Aldrich (# A4416)
Anti-Kaninchen-HRP	Ziege, polyklonal 1:50000 (Western Blot) Sigma-Aldrich (# A8275)
Anti-Ziege-HRP	Kaninchen, polyklonal 1:50000 (Western Blot) Sigma-Aldrich (# A5420)
Anti-Kaninchen-Biotin	Esel, polyklonal 1:200 (IHC-P) Jackson ImmunoResearch (# 711-066-152)
Anti-Kaninchen-Biotin	Ziege, polyklonal 1:700 (IHC-P) DAKO (# E0432)

2.16 Blockingpeptide der Importin- α Antikörper in der IHC-P

Peptid	Importin- α Region und Aminosäuresequenz	Homologie Peptid Mensch / Maus	Peptiderkennung durch	Hersteller
Importin- α 1	aa518-529 QVQDGAPGTFNF	100 % (12/12)	Importin- α 1 Antikörper (Abcam: ab54489; ab84440)	GenScript
Importin- α 3	aa509-521 NSSANVPTEGFQF	92 % (12/13)	Importin- α 3 Antikörper (# NB100-93345; # NB100-81651)	Abcam (ab23144)
Importin- α 5	aa3-16 TPGKENFRLKSYKN	100 % (14/14)	Importin- α 5/7 Antikörper ² (M. Bader)	GenScript
Importin- α 7-1	aa3-12 MASPGKDNRYR	100 % (10/10)	Importin- α 5/7 Antikörper (M. Bader)	GenScript
Importin- α 7-2	aa526-536 PEAPMEGFQL	100 % (10/10)	Importin- α 5/7 Antikörper (M. Bader)	GenScript

2.17 Narkotika & Analgetika

Bezeichnung	Hersteller
Forene (Isofluran 100 %)	Abbott
Ketamin Gräub (100 mg/ml)	Albrecht
Natriumchlorid (0,9 % Lösung)	B. Braun Melsungen AG
Sedaxylan (Xylazin-Hydrochlorid, 20 mg/ml)	WDT

2.18 Geräte und Werkzeuge

Bezeichnung	Hersteller
Badumwälz-Thermostat <i>Precitherm PFV</i>	Labora Mannheim
Brutschrank B6120	Heraeus
Chirurgische Feinschere	F.S.T.
Chirurgische Standard-Pinzette	F.S.T.
CO ₂ -Inkubator <i>BBD6220</i>	Thermo Scientific
CO ₂ -Inkubator <i>HERACELL 150</i>	Thermo Scientific

² Der Importin- α 5/ α 7 Antikörper wurde durch Immunisierung eines Kaninchens mit den Peptiden Importin- α 7-1 und Importin- α 7-2 erhalten (Köhler *et al.*, 1999).

Dokumentationssystem Imagequant LAS 4000 GE Healthcare mit Auswertungssoftware <i>ImageQuant Tools v.3.0</i>	Amersham Biosciences
Durchlichtmikroskop Axioskop 2 mit <i>ImageAccess Software v.5.1</i>	Zeiss Imagic Bildverarbeitung AG
Durchlichtmikroskop BX41 mit <i>cellSens</i> Software	Olympus
Durchlichtmikroskop IM	Zeiss
Durchlichtmikroskop AZ100 mit <i>DS-Ri1 high-resolution</i> Kamera, AZ Plan Fluor 5x- und AZ Plan Apo 1x-Objektiven und <i>Digital Sight DS-L2 Imaging Controller</i>	NIKON
Elektrophoresesystem <i>Mini Trans-Blot Cell</i>	Bio-Rad
Gefriercontainer <i>Mr. Frosty</i>	Nalgene
Geldokumentationssystem <i>Gel Doc XR</i>	Bio-Rad
Gelelektrophoresesystem <i>Mini-PROTEAN Tetra Cell</i>	Bio-Rad
Gelelektrophoresesystem <i>Sub-Cell GT</i>	Bio-Rad
Kryotom CM3050 S	LEICA
Magnetrührer MR3001	Heidolph
Magnetrührer MR80	Heidolph
Mikrotiterplatten Lesegerät <i>Tristar LB 941</i> mit <i>Mikrowin2000-Software v.4.41</i>	Berthold Technologies, Software von Mikrotek Laborsysteme GmbH
Mikrotom HM325	Microm
Mikrowellenofen R-647	Sharp
Mikrowellenofen <i>Supratomic M754</i>	Miele
Mikrowellenofen <i>TenderCooker</i>	Nordic Wave
Paraffingießstation EG1160	Leica
<i>PALM MicroBeam System</i> mit Axiovert 200 Mikroskop, <i>PALM RoboStage I</i> , <i>PALM CapMover</i> und <i>PALM RoboSoftware v2.2</i>	P.A.L.M. Microlaser Technologies GmbH / ZEISS
PCR-Gerät <i>GeneAmp® PCR System 9700</i>	Applied Biosystems
pH-Messgerät <i>766 Calimatic</i>	Knick
Pipetten <i>Eppendorf Reference</i> (10, 100, 1000)	Eppendorf
Pipette <i>Eppendorf Xplorer</i> (100)	Eppendorf
Pipettierhilfe <i>Pipetus</i>	Hirschmann Laborgeräte
Präzisionswaage KB-2000-2NM	KERN
Präzisionswaage ED224S	Sartorius
<i>Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System</i> mit <i>SDS Software v1.3.1</i>	Applied Biosystems
Reinstwassersystem <i>Milli Q Aca</i>	Millipore

Rollenmischer RM5	NeoLab
Rollenmischer SRT9	Stuart
Schüttler Digital MaxQ 6000	Thermo Scientific
Schüttelwasserbad SW-22	Julabo
Schwingmühle MM400	Retsch
Spannungsquelle <i>Powerpac Basic</i>	Bio-Rad
Spektralphotometer <i>Genesys 10 Bio</i>	Thermo Scientific
Spektralphotometer <i>Nanodrop 1000</i>	Peqlab
Sterile Werkbank <i>Herasafe KS 12</i>	Thermo Scientific
Taumel-Wipptisch WT12	Biometra
Taumel-Wipptisch WT17	Biometra
Thermomixer <i>TMix-220V</i>	Analytik Jena
Trockenschrank 6120	Heraeus
Überkopfschüttler	Heidolph
Ultraschallprozessor UP100H	Heidolph
Umluftwärmeschrank B15	Heraeus
Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomat ASP 3000	Leica
Vakuumkonzentrator <i>Concentrator 5301</i>	Eppendorf
Vortex-Mixer 7-2020	neoLab
Wasserbad H15-2	Kunz Instruments
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus
Zentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus
Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge Biofuge Pico	Heraeus
Zentrifuge <i>Avanti J-E</i>	Beckham Coulter

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Transformation kompetenter *Escherichia coli*-Bakterien

Zur Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien wurden die kompetenten *Escherichia coli*-Stämme (*E. coli*) XL1-Blue und SURE-2 des Herstellers Stratagene verwendet. Für die Transformation wurden 0,01-1,0 µg Plasmid-DNA eingesetzt und nach Angaben des Herstellerprotokolls vorgegangen. Die rekombinant hergestellte Plasmid-DNA enthielt einen Ampizillin-Resistenzmarker, so dass die transformierten Bakterien anschließend anhand ihres Resistenzmarkers auf LB-Amp100-Agarplatten selektioniert und bei 37 °C kultiviert werden konnten. Hierzu wurde dem Agar das Antibiotikum Ampizillin in einer Konzentration von 100 µg pro ml zugesetzt.

3.1.2 Plasmid-DNA-Amplifikation

Für die Amplifikation von rekombinant hergestellter Plasmid-DNA, wurden mit den nach Übernachtsinkubation bei 37 °C erhaltenen, transformierten *E. coli*-Klonen (3.1.1) LB-Amp100-Flüssigkulturen inokuliert. Diese wurden bei 37 °C und 210 rpm für 16-24 h im Schüttelinkubator inkubiert. Zur Präparation geringer Plasmid-DNA-Mengen (Mini-Präparation) wurden 3 ml bzw. zur Präparation großer Plasmid-DNA-Mengen (Maxi-Präparation) 250 ml-LB-Amp100-Flüssigkulturen verwendet und bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe fertiger Reaktionssysteme der Firma QIAGEN isoliert.

3.1.3 Herstellung von Bakterien-Kryostocks

Um plasmidtragende *E. coli*-Bakterien langfristig zu konservieren, wurde eine 1 ml LB-Amp100-Übernachtskultur mit 1 ml 100 %-igem Glycerol versetzt, durchmischt und bei -80 °C in Kryoröhrchen archiviert. Die Bakterien-Kryostocks dienten anschließend als Ausgangsbasis für alle weiteren Plasmid-DNA-Amplifikationen.

3.1.4 Plasmidpräparation

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus den in 3.1.2 beschriebenen Flüssigbakterienkulturen erfolgte mit Hilfe fertiger Reaktionssysteme der Firma QIAGEN. Es wurde hierbei nach Herstellerangaben vorgegangen. Zur Präparation geringer Plasmid-DNA-Mengen wurde das *QIAprep Spin Miniprep Kit* und zur Präparation größerer Mengen das *QIAfilter Plasmid Maxi Kit* verwendet. Um die Plasmid-DNA-Ausbeute durch eine verbesserte DNA-Präzipitation in

der Maxi-Präparation zu erhöhen, wurden bei der Isopropanol-Fällung 6 µg Glykogen pro ml Isopropanol hinzugegeben. Anschließend wurde die Plasmid-DNA-Konzentration im Spektralphotometer *Nanodrop 1000* bestimmt (3.3.1).

3.2 Zellkultur-Methoden

3.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und Primärzellen (siehe 2.5 bzw. 2.6) wurden im CO₂-Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 96 % kultiviert. Für die Zelllinien HEK293T, HeLa und A549 wurde DMEM mit 10 % FCS, 1 % Penicillin und Streptomycin und 1 % L-Glutamin verwendet. MEF-Zellen (Wildtyp und Importin- $\alpha 3^{-/-}$, $\alpha 4^{-/-}$, $\alpha 5^{-/-}$, $\alpha 7^{-/-}$ MEFs) wurden in demselben Medium zuzüglich 1 % NEAA und 1 % Natriumpyruvat kultiviert, während für MDCK-Zellen MEM-Medium mit 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % L-Glutamin verwendet wurde. Zur Aufrechterhaltung wurden die eukaryotischen, immortalisierten Zelllinien ab einer Konfluenz von 90-100 % in neue Kulturgefäße passagiert. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit 1x Zellkultur-PBS gewaschen bzw. im Falle der robusteren und adhärenteren MDCK-Zellen mit Trypsin-EDTA. Bis zur Ablösung von der Kulturunterlage wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA bei 37 °C, 5 % CO₂ und 96 % rH inkubiert. Komponenten des im Zellkulturmedium enthaltenen fetalen Kälberserums (10 % FCS) dienen der Inaktivierung des proteolytisch aktiven Trypsins. Zur Kultivierung der Zellen wurde die so erhaltene Zellsuspension dann im jeweils gewünschten Verhältnis verdünnt, auf neue Kulturgefäße verteilt und im CO₂-Inkubator weiter inkubiert.

3.2.2 Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zelllinien

Zur Archivierung von Zelllinien wurden Aliquots der Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurden die Zellen, wie unter 3.2.1 beschrieben, abgelöst und in FCS-haltigem Zellkulturmedium suspendiert. Nach Pelletierung der Zellen für 5 min bei 1000 x g und +4 °C wurden $\sim 5 \cdot 10^6$ Zellen in 1 ml 4 °C kaltem Zell-Einfriermedium resuspendiert und in 2 ml-Kryoröhrchen überführt. Das Einfrieren der Zellen erfolgte dann in einem Gefriercontainer von Nalgene mit einer geregelten Abkühlung von -1 °C/min. Eingelagert wurden die Zellen anschließend bei -196 °C in flüssigem Stickstoff. Um in flüssigem Stickstoff gelagerte Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden diese bei 37 °C erwärmt, in 37 °C-warmem Zellkulturmedium resuspendiert und nach Überführung in ein Kulturgefäß im CO₂-Inkubator inkubiert. Nach 14-16 h wurde das Medium ersetzt bzw. die Zellen bei schon erreichter 90-100 %-iger Konfluenz passagiert.

3.3 Nukleinsäuretechniken

Die Methode der Gelelektrophorese wurde nach Standardprotokollen durchgeführt (Sambrook und Russell, 2001).

3.3.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von isolierten Nukleinsäuren wurde mit Hilfe des Spektralphotometers *Nanodrop 1000* (Peqlab) nach Herstellerangaben bestimmt.

3.3.2 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Der Service des externen Dienstleisters SeqLab (www.seqlab.de) wurde genutzt, um die Korrektheit der Sequenzen generierter Plasmid-DNA zu verifizieren. Hierfür wurden die unter 2.13.1 beschriebenen Sequenzierungsprimer verwendet. Diese erkannten entweder Influenzavirus-spezifische Sequenzen oder einen Bereich des CMV-Promotors bzw. des Polyadenylierungssignals im Plasmid-Rückgrat des generierten Konstruktes.

3.3.3 Gesamt-RNA Isolierung

Um die mRNA-Expressionslevel der Importin- α Isoformen mittels quantitativer *Real-time* PCR (*Real-time quantitative PCR*, RT-qPCR; 3.3.6.2) in verschiedenen humanen und murinen Zellen, Organen und Geweben zu bestimmen, wurde aus diesen Proben die Gesamt-RNA isoliert. Hierfür wurde, soweit nicht anders angegeben, das fertige Reaktionssystem *innuprep RNA Minikit* des Herstellers Analytik Jena verwendet. Die Konzentration der jeweils isolierten RNA wurde im Spektralphotometer *Nanodrop 1000* bestimmt (3.3.1) sowie ihre Reinheit in einem analytischen Agarosegel überprüft (3.3). Die isolierte RNA wurde entweder bei -80 °C gelagert oder direkt in die RT-PCR zur Generierung von cDNA eingesetzt. Je nach Art der Probe wurde Gesamt-RNA mit den im Folgenden beschriebenen, methodischen Variationen isoliert.

3.3.3.1 Gesamt-RNA Isolierung aus eukaryotischen Zellen

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus humanen und murinen Zellen wurden $\sim 5 \cdot 10^6$ Zellen im Zellkulturgefäß mit eiskaltem 1x PBS (PAA) auf Eis gewaschen. Die Ernte erfolgte mit Hilfe von Zellschabern. Nach Resuspension in 1 ml eiskaltem 1x PBS und Überführung in ein vorgekühltes 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurden die Zellen zur Pelletierung für 5 min bei 1000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Gesamt-RNA, bis auf folgende Ausnahmen, nach Herstellerangaben (*“Protocol 2: RNA extraction from eucaryotic cells“*, Analytik Jena) aus dem Zellpellet isoliert: Um eventuelle Kontaminationen durch genomische DNA in der isolierten Gesamt-RNA zu verhindern, wurde zusätzlich zum

Protokoll eine DNase I-Behandlung der Proben auf der Säulenmatrix des *Spin Filters R* durchgeführt: Die Probe in der Säule wurde nach Waschen mit 350 µl HS-Puffer des Reaktionssystems mit 80 µl DNase I-Mix (aus 70 µl RDD-Puffer und 10 µl DNase I-Stocklösung; beides Komponenten des *RNase free DNase Sets*, QIAGEN) für 15 min bei RT (20-30 °C) inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 350 µl HS-Puffer. Anschließend wurde weiter nach Herstellerangaben vorgegangen. Aus eukaryotischen Zellen isolierte Gesamt-RNA wurde in 40 µl RNase-freiem ddH₂O des Reaktionssystems eluiert und mit 1 U/µl *Ribolock RNase Inhibitor* (Fermentas/Thermo Scientific) versetzt.

3.3.3.2 Gesamt-RNA Isolierung aus murinen Geweben und Organen

a) Gesamt-RNA Isolierung aus ganzen Mausorganen und aus murinem oberem Respirationstrakt (ORT, Nasenmuschel)

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus murinen, in *RNAlater* fixierten Organen wurden etwa 50 mg der in *RNAlater* fixierten Organe in sterile 2 ml-O-Ring-Reaktionsgefäße mit 10-15 sterilen Mahlkugeln aus rostfreiem Stahl (Ø 2 mm) überführt. Nach Zugabe von 450 µl des Lysepuffers RL wurden die Organe für 6 min bei 30 Hz im 4 °C-Raum in der Schwingmühle MM400 (Retsch) homogenisiert. Für die weitere Gesamt-RNA-Isolierung wurde, bis auf die in 3.3.3.1 beschriebene DNase I-Behandlung, nach Herstellerangaben vorgegangen (*“Protocol 1: RNA extraction from tissue samples“*, Analytik Jena). Die aus den Organen isolierte RNA wurde in 50 µl RNase-freiem ddH₂O des Reaktionssystems eluiert und mit 1 U/µl *Ribolock RNase Inhibitor* versetzt.

b) Gesamt-RNA Isolierung aus murinem mikrodissektiertem Bronchialepithel und Alveolargewebe

Für die Gesamt-RNA-Isolierung wurden zu den mittels *Laser Microbeam*-Mikrodissektion (LMM, *Laser Microbeam Microdissection*) gewonnenen Bronchialepithel- und Alveolargewebeproben (siehe 3.6.7) in 350 µl Lysepuffer RL gegeben. Nach einminütigem Vortexen auf dem Deckel des Reaktionsgefäßes, wurde es für 30 min auf dem Kopf stehend inkubiert und anschließend ein zweites Mal für 1 min gevortext. Es folgte eine einminütige Zentrifugation bevor das Lysat bis zur RNA-Isolierung bei -80 °C gelagert wurde. Nach anschließendem Auftauen, einminütigem Vortexen und 8-sekündigem Zentrifugieren wurden die Proben 10x mit einer Spritze und Kanüle aufgezogen, mit 700 µl 70 %-igem Ethanol versetzt und vorsichtig durch Hoch- und Runterpipettieren gemischt. Die weitere RNA-Isolierung wurde von Kathy Budler (Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter König, Institut für Anatomie, Universität zu Lübeck, Lübeck, Deutschland) bis auf folgende Ausnahmen unter Verwendung des *innuprep RNA Minikits* (Analytik Jena) nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Elution wurden mit einer Kanüle vier Löcher in den Deckel des 1,5 ml-Elutionsreaktionsgefäßes gestochen und die Gesamt-RNA mit 60 µl RNase-freiem ddH₂O

eluiert. Das Eluat wurde für eine 15-30 % höhere Gesamt-RNA-Konzentration nochmals auf die Säule gegeben und erneut eluiert. Die RNA-Konzentration wurde im Spektralphotometer bestimmt und die RNA gegebenenfalls bei geringer Konzentration im Vakuumkonzentrator *Concentrator 5301* (Eppendorf) aufkonzentriert, so dass 2-8 µl Gesamt-RNA Konzentrat übrig blieben.

3.3.3.3 Gesamt-RNA Isolierung aus humanen Biopsieproben

Zur Bestimmung der Importin- α mRNA-Expressionslevel in Geweben des humanen Respirationstraktes wurden Biopsieproben von Kooperationspartnern vom Erasmus Medical Centre (EMC) in Rotterdam, Niederlande, zur Verfügung gestellt (Dr. Debby van Riel, Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thijs Kuiken, Department of Viroscience). Die Verwendung des humanen Biopsiematerials wurde unter dem Aktenzeichen MEC-201 1-129 durch die niederländische Ethikkommission genehmigt.

a) Gesamt-RNA Isolierung aus humanen Lungenbiopsien

Es wurde Gesamt-RNA aus folgenden in *RNAlater RNA Stabilization Reagent* fixierten Lungenbiopsieproben (größtenteils Alveolargewebe) isoliert: "18-12-09, Hog-27406", "Hog-23541", "T09-09 Hog-21136", "041209", "Hog-24095" und "H10-1087".

Dazu wurden die gefrorenen, in *RNAlater* fixierten Lungenbiopsien schonend auf Eis aufgetaut. Mit Hilfe eines sterilen Einmalskalpells wurden Gewebestückchen von 35-100 mg Gewicht abgetrennt und in sterile 2 ml-O-Ring-Reaktionsgefäße mit 10-15 sterilen Mahlkugeln aus rostfreiem Stahl (\varnothing 2 mm) überführt. Nach Zugabe von 450 µl Lysepuffer RL wurden die Lungenbiopsien für 6 min bei 30 Hz und 4 °C in der Schwingmühle MM400 (Retsch) homogenisiert. Für die weitere RNA-Isolierung wurde, bis auf die beschriebene Dnase I-Behandlung (3.3.3.1), nach Herstellerangaben ("*Protocol 1: RNA extraction from tissue samples*", Analytik Jena) vorgegangen. Die aus den Lungenbiopsien isolierte Gesamt-RNA wurde in 50 µl RNase-freiem ddH₂O des Reaktionssystems eluiert und mit 1 U/µl *Ribolock RNase Inhibitor* (Fermentas/Thermo Scientific) versetzt.

b) Gesamt-RNA Isolierung aus FFPE-Gewebeschnitten des humanen oberen Respirationstraktes

Die RNA Isolierung aus formalinfixierten, paraffineingebetteten (FFPE) Gewebeschnitten des humanen oberen Respirationstrakts (ORT) wurde von Lonneke Leijten durchgeführt (Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thijs Kuiken, Department of Viroscience, EMC, Rotterdam, Niederlande). Dabei wurde, bis auf Weiteres, nach Herstellerangaben des fertigen Reaktionssystems *QIAGEN RNeasy® FFPE Kit* (QIAGEN) vorgegangen. Es wurden

folgende humane ORT-Biopsieproben verwendet: "H05-2603 IIB", "H05-10610 IIB", "H07-5600 IB", "H08-5041 I", "H07-15288 I" und "H05-18115 II".

Hierbei handelte es sich um dieselben Biopsieproben, die in 3.6.5 zur immunhistochemischen Färbung der Importin- α verwendet wurden. Für die Gesamt-RNA-Isolierung wurden 20 μm dicke, frische Schnitte dieser humanen FFPE-ORT-Proben angefertigt. 1-2 Schnitte wurden in RNase-freie 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und sofort weiterverarbeitet, um eine RNA-Degradation vor der Isolierung zu unterbinden. Die Entparaffinierung der Schnitte wurde mit Hilfe von Xylol durchgeführt. Das nach Waschen mit Ethanol erhaltene Pellet wurde für 10 min bei RT getrocknet und die RNA in 30 μl RNase-freiem ddH₂O des Reaktionssystems eluiert.

3.3.4 Design von PCR-Primern

Die in dieser Arbeit für DNA-Sequenzierungen und RT-qPCR Analysen benötigten Primer wurden anhand von Standardkriterien entworfen (Lottspeich und Zorbas, 1998) und ihre Sequenzen sind 2.13.1 und 2.13.3 zu entnehmen. Alle Primersequenzen wurden mit der Software *Clone Manager 9 Professional Edition* oder mit dem Online-Designtool *NCBI/Primer-BLAST* erstellt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>). Hierbei war sowohl eine hohe PCR-Effizienz aller Primerpaare während der Amplifikation der korrekten Amplicons bei gleichbleibenden RT-qPCR Parametern von großer Bedeutung, als auch, dass die Bildung unerwünschter Primer-Dimer-Artefakte vermieden wurde.

Beim Design der Primer wurden die folgenden Kriterien erfüllt:

RT-qPCR Primerkriterien:

- exonüberspannende Amplicons (soweit möglich)
- Größe des zu amplifizierenden Amplicons: 200-260 bp
- Differenz der Schmelztemperatur T_m zwischen den Primern eines Primerpaares: $<2^\circ\text{C}$
- T_m der Primer: $58,0\text{-}61,3^\circ\text{C}$
- GC-Gehalt der Primer: 45-65 %
- Primer-Länge: 21-27 nt
- G oder C am 3'-Primerende (*GC-Clamp*)
- kein falsches Binden (*false priming*) im Zielmolekül bei $>0^\circ\text{C}$
- keine Ausbildung von Haarnadelstrukturen (*hairpins*)
- Basen-Wiederholungen: ≤ 4
- Stabilität 5' vs 3'-Ende des Primers [kcal]: $>1,2$

Zusätzlich wurde *in silico* ausgeschlossen, dass keiner der generierten Importin- α Primer bei $>0^\circ\text{C}$ an die cDNA-Sequenz einer anderen Importin- α Isoform als der gewünschten hybridisierte. Abschließend wurden alle Primer mittels des NCBI-Onlinetools *Basic Local Alignment Search Tool* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.) auf Sequenzhomologien mit

in der Datenbank hinterlegten Sequenzen hin überprüft. Dafür wurden die *nr*-Datenbank³ und die Genome des jeweiligen Organismus ausgewählt (*Homo sapiens* (taxid:9606) bzw. *Mus musculus* (taxid:10090)). Hierbei sollten die Sequenzen mit hohen *score*-Werten der zu amplifizierenden Zielsequenz in der RT-qPCR entsprechen.

3.3.5 Validierung der RT-qPCR Primer in einer *One-Step* RT-PCR Reaktion

Zur initialen Überprüfung der in 3.3.4 beschriebenen RT-qPCR Primer wurde eine einstufige Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. Diese gekoppelte PCR beinhaltet sowohl die reverse Transkriptionsreaktion zur Generierung von *copy* DNA (cDNA) aus RNA, als auch die anschließende PCR zur Amplifikation des gewünschten Amplicons. Für diese *One-Step RT-PCR* wurden das fertige Reaktionssystem *QIAGEN OneStep RT-PCR Kit* und die spezifischen RT-qPCR Primer verwendet (2.13.3). Als RNA-Matrize (*template*) diente die in 3.3.3 isolierte Gesamt-RNA.

One-Step RT-PCR Reaktionsansatz:

5x <i>QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer</i>	10,0 µl (1x)
dNTP-Mix	4,0 µl (400 µM jeden dNTPs)
Primer vorwärts	1,0 µl (400 nM)
Primer rückwärts	1,0 µl (400 nM)
<i>template</i> Gesamt-RNA	1 µg
<i>RiboLock RNase Inhibitor</i>	0,1 µl (4 U)
<i>QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix</i>	<u>2,0 µl</u>
	ad 50 µl RNase-freies ddH ₂ O

One-Step RT-PCR Programm:

Reverse Transkription	50 °C	30 min
Initiale PCR-Aktivierung	95 °C	15 min
35x Zyklen:		
Denaturierung	94 °C	1 min
Primer-Hybridisierung (annealing)	52 °C	30 sec
Elongation	72 °C	3 min
Finale Elongation	72 °C	10 min
Kühlung	4 °C	∞

Das PCR-Produkt wurde hinsichtlich der Amplikongröße und -anzahl mittels eines 2,5 %-igen TAE-Agarosegels analysiert. Konnte die Amplifikation unerwünschter,

³ Zusammensetzung der *nr*-Datenbank: alle GenBank + EMBL + DDBJ + PDB Sequenzen (keine EST, STS, GSS, oder Phase 0, 1 oder 2 HTGS-Sequenzen). Aufgrund von Rechenkosten nicht länger redundanzfrei.

zusätzlicher Produkte ausgeschlossen werden, wurde das Primerpaar in einem RT-qPCR Vorversuch getestet und dann zur Bestimmung der Importin- α mRNA-Expressionslevel im Hauptversuch verwendet (3.3.6).

3.3.6 Quantitative *Real-time* PCR (RT-qPCR)

Die quantitative *Real-time* PCR ermöglicht die Quantifizierung von PCR-Produkten in Echtzeit (*real-time*) noch während sie generiert werden und erlaubt damit einen Rückschluss auf die Menge eines mRNA-Transkripts in der Ausgangsprobe. Hierdurch können mRNA-Expressionslevel verschiedener Transkripte zueinander ins Verhältnis gesetzt werden. Die mRNA-Expressionslevel eines Gens unter bestimmten Versuchsbedingungen oder in verschiedenen Zelltypen kann so bestimmt werden. In der vorliegenden Arbeit sollten die mRNA-Expressionslevel der verschiedenen Importin- α Isoformen $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ und $\alpha 7$ miteinander verglichen werden. Hierbei sollten sowohl humane als auch murine Systeme untersucht werden, weshalb die humanen bzw. murinen Importin- α -isoformspezifischen RT-qPCR Primer erstellt wurden (2.13.3, 3.3.4). Dazu wurde die Methode der relativen Quantifizierung angewandt. Bei der relativen Quantifizierung wird das Verhältnis der Zielmoleküle – also der Transkripte der zu untersuchenden Gene (Importin- α Isoformen) – zu der Anzahl endogener Referenztranskripte bestimmt. Ziel- und Referenztranskripte werden aus der gleichen Nukleinsäureprobe amplifiziert, so dass in der anschließenden Analyse der Daten die Mengen der endogenen Referenz und des zu untersuchenden Transkripts in direkten Bezug zueinander gesetzt werden können (Jansohn, 2007). Als Referenzgen (*housekeeping gene*), diente die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Zur Detektion der amplifizierten Transkripte wurde der DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green I* eingesetzt. *SYBR Green I* bindet in jedem Reaktionszyklus bevorzugt an doppelsträngige DNA (dsDNA) und generiert dabei ein fluoreszentes Signal, das über einen weiten Bereich verschiedener DNA-Konzentrationen proportional zur DNA-Konzentration ist (Abb. 14). Dies ermöglicht die quantitative Messung der dsDNA-Akkumulation nach jedem Zyklus der RT-qPCR Reaktion. Zur Normalisierung des *SYBR Green I*-Signals wurde zudem der Referenz-Fluoreszenzfarbstoff ROX verwendet, wodurch die sogenannten *Rn*-Werte erhalten werden (*reporter normalisation*, *Rn*).

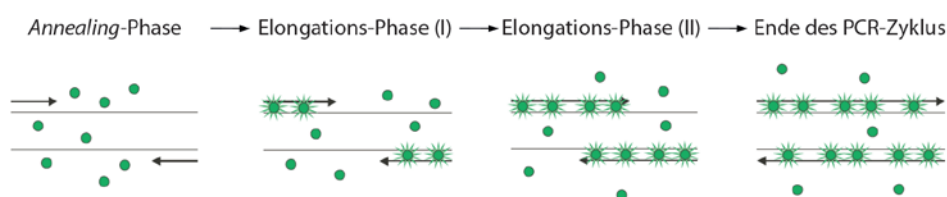


Abb. 14: *SYBR Green I* in der RT-qPCR. Die Fluoreszenzintensität von *SYBR Green I* steigt bei Bindung von dsDNA stark an. Während der Elongationsphase der PCR akkumuliert *SYBR Green I* am doppelsträngigen PCR-Produkt. Dies resultiert in proportional verstärkter Fluoreszenz. Infolgedessen wird in jedem folgenden Reaktionszyklus mehr Fluoreszenz detektiert (modifiziert nach van der Velden *et al.*, 2003).

Da bei Verwendung von *SYBR Green I* unmodifizierte, spezifische Primerpaare in Verbindung mit einem entsprechenden *SYBR Green*-Reagenz verwendet werden können, stellt diese Variante der RT-qPCR einen kostengünstigeren Assay als zum Beispiel die Verwendung von TaqMan®-Sonden dar, und kann zudem zügig entwickelt werden. Die RT-qPCR erlaubt somit eine genaue Quantifizierung der Ausgangs- bzw. Zielnukleinsäuremenge, da die Fluoreszenz in jedem Reaktionszyklus gemessen wird. Die Fluoreszenzintensität ist dabei in jedem Zyklus direkt proportional zur Menge an gebildetem PCR-Produkt (Abb. 15) und erlaubt somit Rückschlüsse auf die Menge an eingesetzter Zielnukleinsäure (Jansohn, 2007).

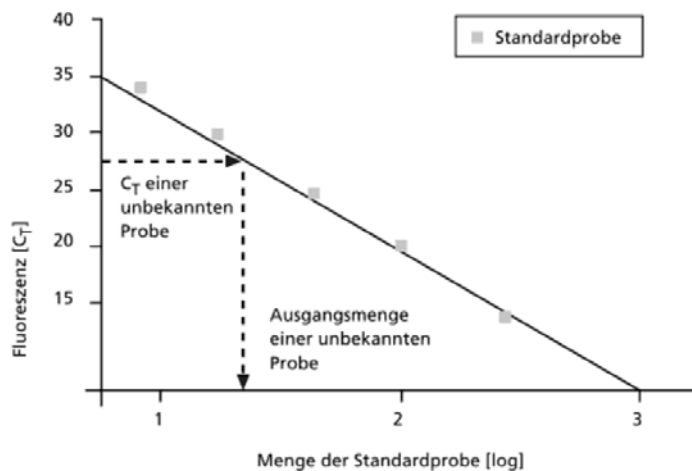


Abb. 15: Reaktionskinetik in der quantitativen *Real-time* PCR. (aus Jansohn, 2007).

3.3.6.1 Reverse Transkription (RT-PCR) zur cDNA-Generierung

Zur Bestimmung der mRNA-Expressionslevel der Importin- α Isoformen mittels RT-qPCR in diversen humanen und murinen Zellen, Geweben und Organen wurde die isolierte Gesamt-RNA zuallererst in *copy* DNA (cDNA) umgeschrieben. Die so generierte cDNA wurde dann in die anschließende RT-qPCR Reaktion als *DNA-template* zur Quantifizierung der Ziel- und Referenztranskriptmengen eingesetzt (siehe 3.3.6.2). Zur Generierung von cDNA wurde die reverse Transkriptionsreaktion genutzt (RT-PCR), bei der die reverse Transkriptase (eine RNA-abhängige DNA-Polymerase) RNA in cDNA umschreibt. Als Nukleinsäurematrize diente dabei isolierte Gesamt-RNA aus 3.3.3. Es wurden je nach Typ der Gesamt-RNA drei geringfügig verschiedene Protokolle verwendet, die im Folgenden näher beschrieben werden.

a) cDNA eukaryotischer Zellen und tierischer Organe

Die cDNA-Generierung aus Gesamt-RNA eukaryotischer Zelllinien, Primärzellen (3.3.3.1) und tierischen Organen (3.3.3.2 und 3.3.3.3) wurde nach den Protokollen des fertigen Reaktionssystems *SuperScript™ III Reverse Transcriptase* von Invitrogen durchgeführt.

Reaktionsansatz *first strand* cDNA-Synthese:

pd(N) ₉ -Primer (<i>random nonamer</i>)	2,0 µl (5 µM = 250 ng)
dNTP-Mix	2,0 µl (500 µM jeden dNTPs)
<i>template</i> Gesamt-RNA	<u>5 µg</u> ⁴
	ad 13 µl RNase-freies ddH ₂ O

Der Reaktionsansatz wurde im Thermocycler zur Denaturierung und Primer-Hybridisierung (*annealing*) für 5 min auf 65 °C erhitzt und anschließend für 1 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde er an zentrifugiert und folgende Komponenten wurden auf Eis hinzugegeben:

<i>5x First-Strand Buffer</i>	4,0 µl (1x)
0,1 M DTT	1,0 µl (5 mM)
<i>RiboLock RNase Inhibitor</i>	1,0 µl (40 U)
<i>SuperScript™ III Reverse Transcriptase</i>	<u>1,0 µl (200 U)</u>
Gesamtvolumen Reaktionsansatz	20,0 µl

Der Reaktionsansatz wurde gemischt, an zentrifugiert und folgendes RT-PCR Programm durchgeführt:

Zusatzschritt bei Verwendung

von <i>random</i> -Primer:	25 °C	5 min
cDNA-Synthese	50 °C	60 min
Inaktivierung	70 °C	15 min
Kühlung	4 °C	∞

b) cDNA des Bronchialepithels und Alveolargewebes der Maus

Die cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA (3.3.3.2) des murinen, mikrodisezierten Bronchialepithels oder Alveolargewebes wurde nach den Protokollen des fertigen Reaktionssystems *RevertAid H Minus Reverse Transcriptase* von Thermo Scientific durchgeführt. Zur Entfernung von DNA-Kontaminationen wurden die Gesamt-RNA Proben mit Dnase I behandelt und für 15 min bei RT inkubiert.

Dnase I Reaktionsansatz:

<i>template</i> Gesamt-RNA	2 µl
10x DNase I-Puffer	1,0 µl
DNase I (Sigma-Aldrich)	<u>1,0 µl (1 U)</u>
	ad 10 µl DEPC ddH ₂ O

⁴ oder das maximal mögliche Volumen bei geringer RNA-Konzentration der Probe

Der Reaktionsansatz wurde im Anschluss mit 1,5 µl EDTA (50 mM) versetzt und für 10 min bei 70 °C inkubiert. Der Ansatz wurde dann auf Eis abgekühlt, anzentrifugiert und für die folgende RT-PCR Reaktion verwendet:

5x <i>Reaction Buffer</i>	4,0 µl (1x)
5 mM DTT	2,0 µl (500 µM)
10mM dNTP-Mix (Peqlab)	1,0 µl (500 µM jeden dNTPs)
Primer pd(N) ₆ (250 ng/µl)	1,0 µl (250 ng)
DNase-behandelte Gesamt-RNA	11,5 µl
<i>RevertAid H Minus Reverse Transcriptase</i>	<u>0,5 µl (100 U)</u>
Gesamtvolumen Reaktionsansatz:	20,0 µl

Es wurde folgendes RT-PCR Programm verwendet:

Reverse Transkription	42 °C	50 min
-----------------------	-------	--------

Anschließend wurde das Reaktionsgefäß anzentrifugiert und weiter inkubiert:

Inaktivierung	70 °C	15 min
Kühlung	4 °C	∞

Die cDNA dieser Proben wurde von Kathy Budler aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter König generiert (Institut für Anatomie, Universität zu Lübeck, Lübeck, Deutschland). Die Durchführung der Importin- α -spezifischen RT-qPCR erfolgte am Heinrich-Pette-Institut, Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie (HPI, Hamburg, Deutschland).

c) cDNA aus humanem FFPE-Gewebe des oberen Respirationstraktes

Die aus FFPE-Gewebeschnitten des humanen oberen Respirationstraktes (ORT, Nasenmuschel) isolierte Gesamt-RNA (3.3.3.3) wurde mittels des fertigen Reaktionssystems *SuperScript™ III Reverse Transcriptase* von Invitrogen nach folgenden geringfügig modifizierten Protokollen in cDNA umgeschrieben. Als *RNA-Template* wurde Gesamt-RNA aus folgenden Biopsieproben des humanen ORTs verwendet: "H05-2603 IIB", "H05-10610 IIB", "H07-5600 IB", "H08-5041 I", "H07-15288 I" und "H05-18115 II".

Reaktionsansatz *first strand* cDNA-Synthese:

Random Primers (Promega)	1,0 µl (= 500 ng)
dNTP-Mix	1,0 µl (500 µM jeden dNTPs)
<i>template</i> Gesamt-RNA	<u>250 ng</u>
	ad 13 µl RNase-freies ddH ₂ O

Der Reaktionsansatz wurde im Thermocycler zur Denaturierung und Primer-Hybridisierung für 5 min auf 65 °C erhitzt und anschließend für 1 min auf Eis abgekühlt. Der

Reaktionsansatz wurde anzentrifugiert und folgende Komponenten wurden auf Eis hinzugegeben:

<i>5x First-Strand Buffer</i>	4,0 µl (1x)
0,1 M DTT	1,0 µl (5 mM)
<i>RNasin® Ribonuclease Inhibitor</i>	1,0 µl (40 U)
<i>SuperScript™ III Reverse Transcriptase</i>	<u>1,0 µl (200 U)</u>
Gesamtvolumen Reaktionsansatz	20,0 µl

Der Reaktionsansatz wurde gemischt, anzentrifugiert und folgendes RT-PCR Programm durchgeführt:

Zusatzschritt bei Verwendung

von <i>random</i> -Primer:	25 °C	5 min
cDNA-Synthese	50 °C	45 min
Inaktivierung	70 °C	15 min
Kühlung	4 °C	∞

Zu dem 20 µl RT-Ansatz wurden 80 µl RNase-freies ddH₂O gegeben. Die cDNA dieser Proben wurde von Lonneke Leijten aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thijs Kuiken (Department of Viroscience, EMC, Rotterdam, Niederlande) generiert und auf Trockeneis zum HPI geschickt.

3.3.6.2 RT-qPCR Reaktion

Die generierte cDNA (3.3.6.1) wurde als *DNA-Template* in die RT-qPCR Reaktion zur Quantifizierung der Ziel- und Referenztranskriptmengen eingesetzt. Es wurde nach den Protokollen des fertigen Reaktionssystems *Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG* von Invitrogen vorgegangen. Hierbei handelt es sich um einen gebrauchsfertigen 2x RT-qPCR Mix, der, bis auf die spezifischen Primer und den ROX-Referenzfarbstoff, alle benötigten Komponenten für die Amplifikation und Detektion von DNA in der RT-qPCR enthält. Der RT-qPCR Mix kombiniert zudem die automatische *hot-start*-Technologie der *Platinum® Taq DNA Polymerase* mit einer Technologie, die die Verschleppung und Amplifikation potentiell kontaminierender dUTP-haltiger Amplifikationsprodukte aus vorhergegangenen Reaktionen verhindert. Dies geschieht durch den Einsatz der Uracil-DNA-Glycosylase (UDG; *UDG carryover prevention technology*).

Folgender Reaktionsansatz wurde für die RT-qPCR pro Vertiefung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte (*MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate*) pipettiert:

<i>Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (2x)</i>	5,0 µl (1x)
<i>ROX Reference Dye (25 µM)</i>	0,2 µl 1:10-Verd. (50 nM)
Primer vorwärts (20 µM)	0,15 µl (300 nM)
Primer rückwärts (20 µM)	0,15 µl (300 nM)
<i>Template cDNA</i>	<u>1 µl</u>
ad 10 µl <i>UltraPure DNase / RNase-Free ddH₂O</i>	

Es wurde folgendes RT-qPCR Programm zur relativen Quantifizierung im *ABI 7500 Fast System* im *Standard 7500-Modus* unter Verwendung des Messmodus „*Relative Quantification (ddCt) Plate*“ verwendet:

UDG Reaktion	50 °C	2 min
Initiale PCR-Aktivierung / UDG-Inaktivierung	95 °C	3 min

3-Schritt Zyklen: 50x

Denaturierung	95 °C	15 sec
Primer-Hybridisierung (<i>annealing</i>)	65 °C	10 sec
Elongation	72 °C	30 sec

Der Anstieg von *SYBR Green I*-Fluoreszenz im Verlauf der RT-qPCR, und damit die Akkumulation von Reaktionsprodukt, wurde im Elongationsschritt jeden Reaktionszyklusses detektiert. Im Anschluss an den RT-qPCR Lauf wurde die Spezifität der entstandenen RT-qPCR Reaktionsprodukte anhand einer Dissoziationskurve überprüft (Ririe *et al.*, 1997). Hierbei wird das Reaktionsprodukt durch langsame Erhitzung bis zum Schmelzpunkt denaturiert. Die Analyse des Schmelzpunktes T_m ermöglicht einen Rückschluss auf die Länge des Reaktionsproduktes und somit auch eine Identifikation fälschlicherweise amplifizierter Reaktionsprodukte falscher Länge. Dies ermöglicht die Überprüfung der Spezifität der RT-qPCR Reaktion in jedem Reaktionsansatz (Ririe *et al.*, 1997). Die Bestimmung der Dissoziationskurven wurde im *ABI 7500 Fast System* im *Standard 7500-Modus* mit folgenden Parametern durchgeführt:

Denaturierung	95 °C	15 sec
Primer-Hybridisierung (<i>annealing</i>)	60 °C	1 min
Denaturierung	95 °C	15 sec
(<i>Ramp Rate: 100 %</i>)		

Anschließend wurden die Reaktionsansätze mit DNA-Ladepuffer versetzt und mittels eines 2,5 %-igen 1x TAE-Agarosegels analysiert. Gelegentlich traten in den Dissoziationskurven oder Gelelektrophoreseanalysen einzelner Reaktionsansätze Fehlamplikate auf. Diese Messwerte wurden bei der Auswertung der RT-qPCR Messdaten von der Analyse ausgeschlossen.

3.3.6.3 Analyse der RT-qPCR Daten

In der vorliegenden Arbeit wurden die mRNA-Expressionslevel der Importin- α Isoformen $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ und $\alpha 7$ mittels RT-qPCR bestimmt und mittels relativer Quantifizierung miteinander verglichen. Bei dieser Methode wird die Menge der Zieltranskripte (Importin- α) ins Verhältnis zur Anzahl endogener Referenztranskripte (GAPDH) gesetzt. Die Transkriptmenge wird dabei in C_T -Werten angegeben. Der C_T -Wert (Schwellenwert-Zyklus, *cycle threshold*) bezeichnet den Zyklus der RT-qPCR, in dem das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal exponentiell und signifikant über den unspezifischen Hintergrundwert ansteigt (Jansohn, 2007). Bei Auftragung der R_n -Werte gegen die Anzahl der Reaktionszyklen erhält man den C_T -Wert des Zieltranskriptes, indem man den Schnittpunkt der Schwellenwert-Geraden mit der Amplifikationskurve im linearen Bereich ihrer exponentiellen Phase bildet (Abb. 16). Je niedriger der C_T -Wert, desto höher ist die Konzentration dieses Transkriptes in der Ursprungsprobe.

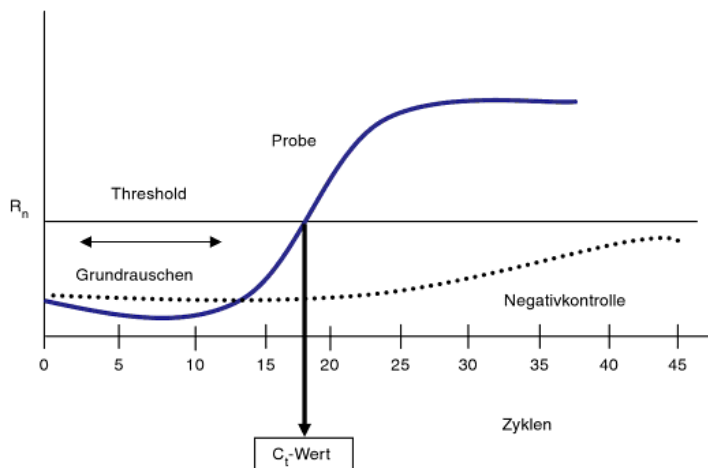


Abb. 16: Ermittlung des C_T -Wertes. (aus Busch, 2010).

Zur weiteren Analyse der Daten wurde eine modifizierte $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode verwendet. Da der C_T -Wert ein exponentieller Wert ist, wird im Falle einer idealen Amplifikation des Ausgangstranskriptes von einer PCR-Effizienz von 1 (100 %) ausgegangen. Eine Erhöhung des C_T -Wertes um 1 besagt demnach, dass es sich um eine doppelt so hohe Expression handelt. Eine Primereffizienz von genau 100 %, und damit eine theoretische Verdopplung des PCR-Produktes in jedem Zyklus, ist jedoch in der Realität nur selten gegeben. Daher kann die Verwendung der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode zu falschen Schlussfolgerungen führen. Aufgrund dessen wurde in dieser Arbeit die nach Ruijter *et al.* und Ramakers *et al.* modifizierte $E^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode zur Analyse der Daten verwendet (Ramakers *et al.*, 2003; Ruijter *et al.*, 2009). Diese Methode berücksichtigt die individuellen, tatsächlichen Primereffizienzen E der verschiedenen Primerpaare und korrigiert die erhaltenen C_T -Werte mit diesen. Von den RT-qPCR Messdaten wurden mithilfe der *SDS Software v1.3.1* lediglich die mit ROX-

normalisierten *SYBR Green I*-Rohdaten (*Rn*-Werte) als .csv-Datei exportiert und die anschließende Analyse mit der online frei verfügbaren *LinRegPCR Software v.11.1* durchgeführt (<http://www.hartfaalcentrum.nl/index.php?main=files&sub=LinRegPCR>; Ruijter *et al.*, 2009). Dieses Programm verwendet die *Rn*-Rohdaten der RT-qPCR (*non-baseline corrected Rn-values*) zur individuellen Basislinienkorrektur jeder einzelnen Probe. Weiterhin bestimmt das Programm ein *window-of-linearity*, um dann mittels einer linearen Regressionsanalyse eine Gerade durch das PCR-Datenset zu legen. Anhand der Steigung dieser Geraden wird die PCR-Effizienz jeder einzelnen Probe ermittelt. Die gemittelte PCR-Effizienz eines Amplicons, z.B. des GAPDH-Amplicons, und der individuelle C_T -Wert jeder Probe dieses Amplicons werden anschließend verwendet um die Startkonzentration N_0 in der Probe zu berechnen. Der N_0 -Wert wird in arbiträren Fluoreszenzeinheiten angegeben (Ruijter *et al.*, 2010). Anschließend wurde der aus Triplettmessungen gemittelte N_0 -Wert eines Zieltranskriptes, z.B. der von Importin- $\alpha 1$, ins Verhältnis zu dem aus Triplettmessungen gemittelten N_0 -Wert des Referenztranskriptes GAPDH in dieser Probe gesetzt. Die so erhaltenen $N_0 \text{ Zieltranskript} / N_0 \text{ GAPDH}$ -Werte aus verschiedenen, gleich behandelten Proben wurden anschließend ebenfalls gemittelt. Zum besseren Vergleich einer differenziellen mRNA-Expression der verschiedenen Importin- α Isoformen, wurde der gemittelte $N_0 \text{ Importin-}\alpha 1 / N_0 \text{ GAPDH}$ -Wert der Importin- $\alpha 1$ Isoform als Referenz gleich 1 gesetzt. Alternativ wurde für den Vergleich der mRNA-Expression einer bestimmten Isoform in verschiedenen Geweben des Respirationstraktes untereinander der gemittelte $N_0 \text{ Importin-}\alpha 1 / N_0 \text{ GAPDH}$ -Wert z.B. des oberen Respirationstraktes als Referenz gleich 1 gesetzt.

3.3.7 DNA- und siRNA-Transfektion

Für die Transfektion von eukaryotischen HEK 293T-Zellen wurden $2 \cdot 10^6$ Zellen pro Vertiefung einer 6-Loch-Mikrotiterplatte in HEK-Zellkultivierungsmedium ohne Antibiotika (Transfektionsmedium) ausgesät. Die Zellen wurden mit Hilfe des fertigen Transfektionsreagenzes *Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent* der Firma Invitrogen nach Herstellerangaben transient transfiziert. Hierzu wurden für die siRNA-Transfektion 200 pmol Importin- $\alpha 3$ siRNA, bzw. 200 pmol *Allstars negative siRNA* als Kontrolle, unter Verwendung von 10 μl *Lipofectamine® 2000* in suspendierte Zellen eingebracht (*Lipofectamine® 2000* [μl] : siRNA [μg] im Verhältnis 3,4:1). Die transfizierten Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂, 96 % rH inkubiert und 6-8 h nach der Transfektion wurde das Medium durch frisches Transfektionsmedium ersetzt. 48 h nach der siRNA-Transfektion wurden je $2 \cdot 10^6$ der siRNA-transfizierten HEK 293T-Zellen pro Vertiefung einer 6-Loch-Mikrotiterplatte mit den Plasmiden für den Versuch zur Untersuchung der Polymeraseaktivität transfiziert. Es wurden je 0,5 μg der für PB1, PB2, PA und NP kodierenden pHW2000-Konstrukte von SC35 bzw. SC35M (H7N7) sowie je 0,5 μg der Reporterstrukture pPol-I-NP-Luc-human und pRL-

TK eingesetzt. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit je 0,5 µg der beiden Reporterplasmide und 2 µg des pHW2000-Leervektors transfiziert wurden. Für die Plasmid-DNA-Transfektion wurden die Zellen nach Herstellerangaben in Suspension transfiziert (*Lipofectamine® 2000* [µl] : Plasmid-DNA [µg] im 1:1-Verhältnis) und für weitere 24 h bei 37 °C, 5 % CO₂, 96 % rH inkubiert. Anschließend wurde die Polymeraseaktivität analysiert (3.4.3).

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Gesamtproteinextraktion aus eukaryotischen Zellen

Zum Erhalt von Gesamtproteinlysaten aus eukaryotischen Zellen wurden diese mit Hilfe von Zellschabern auf Eis geerntet und mit eiskaltem 1x PBS (PAA) gewaschen. Das nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1000 x g und 4 °C erhaltene Zellpellet wurde in 100 µl Zellysepuffer resuspendiert. Nach 15minütiger Inkubation auf Eis wurden die lysierten Zellen unter Verwendung eines Ultraschallprozessors (Zyklus 1, Amplitude 90 %) bei 4 °C zweimal für je 30 sec sonifiziert. Im Zellysate vorhandene Zelltrümmer wurden bei 18000 x g und 4 °C für 10 min pelletiert. Der Zellysate-Überstand wurde abgenommen und mit 4x Laemmli-Proteinprobenpuffer versetzt. Die Zellysate-Proben wurden für 5 min bei 95 °C und 450 rpm aufgeköcht, auf Eis abgekühlt und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert. 5-10 µl der Zellysate wurden zur anschließenden Western-Blot-Analyse auf 8 %-ige SDS-PAGE-Gele aufgetragen (3.4.2). Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte über das fertige Reaktionssystem *Micro BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers.

3.4.2 SDS-PAGE und Western-Blot

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-Page) und der spezifische Nachweis von Proteinen mittels Western-Blot Analyse wurden nach Standardprotokollen durchgeführt (Sambrook und Russell, 2001). In dieser Arbeit wurden SDS-PAGE-Gele mit 8 %-igem Trenngel und 5 %-igem Sammelgel verwendet. Für den Western-Blot wurden primäre Antikörper (2.14) in SuperBlock T20 (TBS) verdünnt und für ca. 16 h bei 4 °C mit den Western-Blot Membran inkubiert. Der sekundäre Antikörper (2.15) wurde in Western-Blot-Blockinglösung verdünnt und bei RT mit der Western-Blot-Membran inkubiert. Zur Detektion der an den Sekundärantikörper gekoppelten Meerrettichperoxidase (HRP, *horse radish peroxidase*) wurde das *SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate* nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Detektion erfolgte am Dokumentationssystem *Imagequant LAS 4000* von GE Healthcare und wurde mit der *ImageQuant Tools Ver. 3.0* Software ausgewertet und quantifiziert.

3.4.3 Analyse von Polymeraseaktivitäten

Zur Bestimmung der Polymeraseaktivität von Influenzaviren in humanen HEK 293T-Zellen wurde ein dualer *in vitro* Luciferase-Reporterversuch verwendet. In diesem Versuchssystem werden humane HEK 293T-Zellen mit eukaryotischen Expressionsplasmiden für alle Untereinheiten des RNP-Komplexes (PB1, PB2, PA und NP) zusammen mit zwei Reporterplasmiden transfiziert (Durchführung siehe 3.3.7). Das erste Reporterplasmid (pPol-I-NP-Luc-human) kodiert für die *Firefly*-Luciferase des Leuchtkäfers *Photinus pyralis*. Das Luciferase-Gen wird in diesem Vektor von den nichtkodierenden 3'- und 5'-Bereichen der viralen Genom-Segmente von A/WSN/33 (H1N1) flankiert und steht unter der Kontrolle eines humanen Polymerase-I-Promotors (Pol-I). Zur Standardisierung der Transfektionseffizienz wird zusätzlich ein Reporterplasmid transfiziert, das für die Renilla-Luciferase aus der Seefeder *Renilla reniformis* kodiert. Das Renilla-Luciferasegen steht in diesem Vektor unter der Kontrolle eines konstitutiv exprimierten Promotors. Die zelluläre, DNA-abhängige RNA-Polymerase I führt zu einer schwachen Expression der vRNA (-ssRNA) des *Firefly*-Luciferase Reportergens. In Kombination mit den gleichzeitig transfizierten vier RNP-Untereinheiten führt dies zur Rekonstitution von funktionellen viralen RNP-Komplexen (vRNP-Komplexen). Dies resultiert in der Transkription und anschließenden Translation der vRNA des ersten Reporterproteins. Die Expression des *Firefly*-Luciferase Reportergens wird über die Replikation der vRNA weiter verstärkt, da die entstehende cRNA als Matrize für weitere vRNA dienen kann. Die Detektion der Expression beider Reportergene erfolgt über die Zugabe des Substrates Luciferin, welches bei Metabolisierung in detektierbarer Biolumineszenz resultiert. HEK 293T-Zellen wurden 24 h nach der vRNP-Transfektion (d.h. 72 h nach siRNA-Transfektion) nach Angaben des Herstellers unter Verwendung des fertigen Reaktionssystems *Dual-Luciferase® Reporter Assay System* (Promega) lysiert. Mit Hilfe desselben Reaktionssystems wurden die Luciferaseaktivitäten in den Lysaten nach Angaben des Herstellers für 6-Loch-Mikrotiterplatten im Mikrotiterplatten-Lesegerät *Tristar LB 941* (Berthold Technologies) mit Hilfe der *Mikrowin2000-Software v.4.41* gemessen.

3.5 Virologische Methoden

3.5.1 Virusanzucht im embryonierten Hühnerei

Die Anzucht von hochpathogenen aviären Influenza A Viren (HPAIV) des H7N7-Subtyps erfolgte im embryonierten Hühnerei. Dazu wurden 11 Tage alte, embryonierte und spezifiziert pathogenfreie Hühnereier (SPF) zur Generierung von Virusstocks mit den Influenzaviren SC35 und SC35M, den Einzelpunktmutanten SC35-PB2_{701N} und SC35-NP_{319K} und der Doppelpunktmutante SC35-PB2_{701N}-NP_{319K} infiziert. Zur Infektion wurde vom

Ausgangsvirusstock eine 10^{-3} - oder eine 10^{-4} -verdünnte Virussuspension in 1x PBS (PAA) hergestellt. Die bebrüteten Hühnereier wurden vor der Infektion mittels Durchleuchten auf das Vorhandensein eines Embryos hin überprüft (d.h. sichtbare Bewegung und ausgebildete Gefäße). Embryonierte Eier wurden mit dem stumpfen Ende, an dem sich die Luftblase befindet, nach oben orientiert und mit Iodlösung desinfiziert. Mit einem ebenfalls desinfizierten Handbohrer wurde ein kleines Loch in die Eischale gebohrt. 200 μ l der Virusverdünnung wurden anschließend mit einer 1 ml-Spritze und Einmal-Injektionskanüle (25G 1“, 0,5 x 25 mm) in die Allantoishöhle injiziert. Nach der Inokulation wurden die Injektionsöffnungen mit einem Tropfen Bastelklebstoff versiegelt und für 48 h im CO₂-Inkubator bei 37 °C, 96 % rH, 5 % CO₂ inkubiert. Nach 48 h wurden die Eier über Nacht (~15 h) bei 4 °C gekühlt, was eine Kontraktion der Gefäße und ein Absterben des Embryos bewirkt. Für die Ernte von virushaltiger Allantoisflüssigkeit wurden die Eier im Bereich der Luftblase vorsichtig mit einer desinfizierten Pinzette geöffnet. Die Allantoisflüssigkeit wurde mit einer 10 ml-Einwegvollpipette entnommen und in ein 15 ml-Reaktionsgefäß auf Eis überführt. Sie sollte bei erfolgreicher Infektion möglichst klar und nicht durch Dotter verunreinigt sein. Anschließend wurden die abgenommenen Allantoisflüssigkeiten für 5 min bei 1000 x g und 4 °C zentrifugiert. Mit Hilfe des Hämagglutinationstests (HA-Test, 3.5.2) wurde die Viruskonzentration in den Allantoisflüssigkeiten bestimmt. Allantoisflüssigkeiten mit ähnlichem HA-Titer wurden vereinigt, aliquotiert und bei -80 °C in Kryoröhrchen archiviert. Zur Bestimmung der Anzahl der infektiösen Viruspartikel wurde der Virustiter nach einem Einfrier-Auftauzyklus mittels Plaquetest auf MDCK-Zellen bestimmt (siehe 3.5.3).

3.5.2 Hämagglutinationstest (HA-Test)

Influenzaviren besitzen die Fähigkeit an Erythrozyten zu binden. Dies geschieht aufgrund einer spezifischen Bindung des viralen Hämagglutinins an terminale Sialinsäuren auf Glykokonjugaten der Erythrozytenoberfläche. Aufgrund mehrfacher Bindungsmöglichkeiten eines Viruspartikels an Erythrozyten entsteht eine Quervernetzung der Viren mit den Erythrozyten (Hämagglutination). Mit Hilfe zunehmender Virusverdünnungen bei gleichbleibender Erythrozytenkonzentration lassen sich daher quantitative Aussagen über die Anzahl hämagglutinierender Partikel treffen. Der Titer der Hämagglutinationseinheit (HAU-Titer, *hemagglutination unit*) ist der reziproke Wert der Verdünnungsstufe bei der gerade noch eine Hämagglutination der Erythrozyten erkennbar ist. Mit Hilfe des HA-Tests lässt sich jedoch keine Unterscheidung zwischen infektiösen und nichtinfektiösen Partikeln oder Membrantrümmern treffen, da alle zur Hämagglutination beitragen.

Zur Herstellung einer 1 %-igen Erythrozytenlösung wurden 5 ml Hühnervollblut mit 5 ml 0,9 %-iger Natriumchlorid-Lösung in einem 15 ml-Reaktionsgefäß gewaschen. Nach

anschließender 5-minütiger Zentrifugation bei 1000 x g und 4 °C wurden der Überstand (Serum) und die Interphase (Leukozyten und Blutplättchen) vorsichtig abgenommen und verworfen. Der Waschvorgang wurde so oft wiederholt, bis sich oberhalb der Erythrozytenphase weder Serum noch Interphase ansammelten. Die 100 %-ige Erythrozytenlösung wurde zur Verwendung auf 1 % mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung verdünnt.

Zur Durchführung des HA-Tests wurden 50 µl 1x PBS in alle Vertiefungen der Spalten 2-12 einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit v-förmigen Böden vorgelegt. 100 µl der Virussuspensionen, bzw. PBS als Negativkontrolle, wurden in die Vertiefungen der Spalte 1 gegeben. Hiervon wurden je 50 µl entnommen und in 2er-Schritten bis zu einer Verdünnung von 1:2¹¹ weiter verdünnt. Danach wurden, ausgehend von der höchsten Verdünnungsstufe, in alle Vertiefungen 50 µl einer 1 %-igen Hühnererythrozytensuspension pipettiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis (max. 1 h) wurde der HAU-Titer bestimmt. Eine Hämagglutination war durch die gleichmäßige Verteilung der Erythrozyten zu erkennen, während nicht-agglutinierte Erythrozyten sedimentierten und distinkte Punkte (sog. "Knöpfchen") am Boden der Vertiefung bildeten.

3.5.3 Virustiterbestimmung mittels Plaquetest

Zur Bestimmung der Anzahl der infektiösen und replikationskompetenten Viruspartikel in der Allantoisflüssigkeit (3.5.1), in Überständen der Wachstumskurven (3.5.4) oder in infizierten Organhomogenisate (3.7.5), wurden Plaqueteste auf MDCK-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden MDCK-Zellen einen Tag vorher für eine 90 %-ige Konfluenz zum Zeitpunkt der Titration in 6- oder 24-Loch-Mikrotiterplatten ausgesät. Die zu titrierende, virushaltige Flüssigkeit wurde in 1:10-Schritten in sterilem 1x PBS (PAA) verdünnt (z.B. 10⁻¹ bis 10⁻⁷) und zur Inokulation der zuvor einmal mit 1x PBS gewaschenen MDCK-Zellen verwendet. Es wurden je 333 µl Inokulum pro Vertiefung der 6-Loch-Mikrotiterplatte bzw. 100 µl pro Vertiefung der 24-Loch-Mikrotiterplatte eingesetzt. Während einer 30-minütigen Inkubation der Platten im CO₂-Inkubator bei 37 °C, 96 % rH, 5 % CO₂ wurden diese nach 15 min kurz geschwenkt, um eine bessere Anheftung der Viruspartikel zu gewährleisten. Anschließend wurden die infizierten MDCK-Zellen mit 3 ml bzw. 1 ml Avicel-Overlay-Medium überschichtet und im CO₂-Inkubator bei 37 °C für weitere 72 h ohne Bewegung inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde das Avicel-Overlay-Medium abgezogen, die Zellen 2x mit 1x PBS gewaschen und mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Zur Detektion der Virusplaques wurden die Zellen mit Kristallviolett-Lösung angefärbt. Durch eine Influenzavirus-Infektion zerstörte bzw. abgelöste Zellen lassen sich als deutlich sichtbare Plaques im Zellrasen erkennen und auszählen. Virustiter werden in p.f.u./ml (*plaque-forming units/ml*), also plaquebildenden Einheiten pro ml angegeben.

3.5.4 Analyse des viralen Wachstumsverhaltens in Importin- α^3 ^{-/-} MEF-Zellen

Um zu untersuchen, welchen Einfluss das Fehlen der Importin- α^3 oder - α^7 Isoform auf das virale Wachstum des HPAIV SC35 (H7N7) und der mausadaptierten Variante SC35M hat, wurden Wildtyp (WT), Importin- α^3 ^{-/-} und Importin- α^7 ^{-/-} MEF-Zellen mit den entsprechenden Viren infiziert. Die Importin- α^3 ^{-/-} MEF Zellen wurden von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Bader aus homozygoten *knockout*-Mausembryonen der Importin- α^3 ^{-/-} und α^7 ^{-/-} C57BL/6-Zucht generiert.

Pro Vertiefung einer 6-Loch-Mikrotiterplatte (9,5 cm² Fläche/Vertiefung) wurden 7*10⁵ MEF-Zellen in MEF-Wachstumsmedium ausgesät und 5-6 h später, nach Erreichen der Adhärenz, infiziert. Dazu wurde das Wachstumsmedium von den MEF-Zellen abgezogen und diese mit 2 ml Virusinokulum (angesetzt in serumfreiem MEF-Infektionsmedium) der jeweiligen Multiplizität der Infektion (MOI, *multiplicity of infection*) für 30 min bei 37 °C, 5 % CO₂ und 96 % rH inkubiert. Die Zellen wurden im Falle von SC35 mit einer MOI von 0,1 bzw. 1 und von SC35M mit einer MOI von 0,1, 0,01 bzw. 0,001 infiziert. Nach dreimaligem, vorsichtigem Waschen mit saurem, serumhaltigem MEF-Infektionsmedium (pH 5,0) zur Inaktivierung nicht-adsorbierter, freier Viruspartikel, wurden exakt 2 ml serumhaltiges MEF-Infektionsmedium auf die Zellen gegeben. Die infizierten Zellen wurden für 4 Tage bei 37 °C, 5 % CO₂ und 96 % rH inkubiert. Jeweils nach 0, 24, 48, 72 und 96 h nach Infektion (p.i., *post infection*) wurden je 100 µl des Zellüberstands abgenommen und bei -20 °C zur späteren Virustiterbestimmung mittels Plaquetest (siehe 3.5.3) gelagert. Für die Infektion der MEF-Zellen konnte im Gegensatz zum Infektionsmedium anderer Zelllinien nicht auf den Zusatz von 1 % fötalem Kälberserum (FCS) verzichtet werden. Gegenüber dem sonst verwendeten Ersatz in Infektionsmedien (0,2 % BSA) waren die MEF-Zellen nicht tolerant.

3.6 Histologische Methoden

3.6.1 Präparation von Mausorganen und humanem Biopsiematerial zur Herstellung von FFPE-Gewebeschnitten

Zur Erzeugung von formalinfixierten, paraffineingebetteten (FFPE)-Gewebeschnitten wurden die präparierten murinen Organe aus 3.7.5 (Lunge, Trachea, Leber, Milz) in 5 ml-Reaktionsgefäßen mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) bzw. der komplette, gehäutete Caput in mit 4 % PFA befüllten 50 ml-Reaktionsgefäßen überführt. Humane Biopsieproben wurden ebenfalls zuerst in 4 % PFA fixiert. Die Fixierung erfolgte in beiden Fällen mindestens über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurde das PFA durch 1x PBS ersetzt und bis zur histologischen Färbung bei 4°C gelagert. Die formalinfixierten Maus-Capita wurden zusätzlich vor der Einbettung in Paraffin dekalzifiziert. Hierzu wurden sie für 8 Tage in

Dekalzifizierungslösung inkubiert, sagittal halbiert und in frischer Dekalzifizierungslösung weitere drei Tage inkubiert.

3.6.2 Herstellung von FFPE-Gewebeschnitten am Mikrotom

Die formalinfixierten Proben wurden in sequentiellen Inkubationsschritten in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe und mit Hilfe des Intermediums Xylol entwässert und dann mit Paraffin infiltriert. Hierzu wurde folgendes Programm im Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomaten ASP300 verwendet:

Schritt	Dauer	Temperatur
Ethanol (70 %)	1 h	RT
Ethanol (80 %)	1 h	RT
Ethanol (90 %)	1 h	RT
Ethanol (95 %)	1 h	RT
Ethanol (100 %)	1 h	RT
Ethanol (100 %)	1,5 h	RT
Xylol I	1 h	RT
Xylol II	1 h	RT
Paraffin	1 h	58 °C
Paraffin	1 h	58 °C
Paraffin	1 h	58 °C

Im Anschluss an die Infiltration wurden die Gewebe mit Hilfe einer Paraffinausgießstation in Paraffinblöcke eingebettet, deren weitere Lagerung bei RT im Dunkeln erfolgte. Die Paraffinblöcke wurden über eine Kühlplatte für ~12 h auf -13 °C vorgekühlt bevor sie mit dem Mikrotom HM325 geschnitten wurden. Es wurden 3 µm dicke Schnitte hergestellt, die nach Strecken bei 42 °C in einem Wasserbad auf SuperFrost/Plus-Objektträger aufgenommen wurden. Die Schnitte wurden über Nacht bei 37 °C in einem Umluftwärmeschrank getrocknet, bevor sie bei RT gelagert bzw. (immun-)histochemisch gefärbt wurden.

3.6.3 Entparaffinierung und Rehydrierung von FFPE-Gewebeschnitten

Zur histochemischen oder immunhistochemischen Färbung der FFPE-Gewebeschnitte wurden diese zuerst entparaffiniert und rehydriert. Dies erfolgte für die Influenzavirus-Antigenfärbung manuell über sequentielle Inkubationsschritte in Xylol-Ersatz und eine absteigende Alkoholreihe.

Es wurden *Ottix Shaper* als Alkohol-Ersatz und *Ottix Plus* als Xylol-Ersatz verwendet.

Schritt	Dauer
<i>Ottix Plus</i> (I)	5 min
<i>Ottix Plus</i> (II)	5 min
<i>Ottix Plus</i> (III)	5 min
<i>Ottix Plus</i> (IV)	5 min
<i>Ottix Shaper</i> (I)	2 min
<i>Ottix Shaper</i> (II)	2 min
<i>Ottix Shaper</i> (III)	2 min
<i>Ottix Shaper</i> (IV)	2 min
ddH ₂ O	2 min
ddH ₂ O	2 min

Für die Visualisierung der Importin- α Isoformen in humanen und murinen FFPE-Gewebeschnitten des Respirationstraktes wurden die Schnitte am EMC, Rotterdam wie folgt entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert.

Schritt	Dauer
Xylol	3 min
Xylol	3 min
Ethanol (100 %)	2 min
Ethanol (96 %)	2 min
Ethanol (90 %)	2 min
Ethanol (80 %)	2 min
Ethanol (70 %)	2 min
Ethanol (50 %)	2 min
1x PBS	5 min

3.6.4 Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Zur mikroskopisch genaueren Beurteilung der Gewebemorphologie wurden die histologischen FFPE-Schnitte einer Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung) unterzogen. Hämalaun färbt alle sauren bzw. basophilen Strukturen blau bis violett an, insbesondere den Zellkern und das raue Endoplasmatische Retikulum (rER). Basische (eosinophile) Strukturen werden hingegen durch den synthetischen sauren Farbstoff Eosin rötlich angefärbt (z.B. Zellplasmaproteine, Mitochondrien, sER). Für die HE-Färbung wurden die entparaffinierten FFPE-Gewebeschnitte für 4 min bei RT in Mayers Hämalaunlösung gefärbt und kurz unter Leitungswasser geschwenkt. Zum Differenzieren wurden die Schnitte dann für einige Sekunden in 100 %-iges Ethanol mit 3 % HCl getaucht und unter fließendem Leitungswasser für 5 min bei RT gebläut. Es folgte eine Inkubation in Eosin für 25 sec bei RT. Die Gewebeschnitte wurden dann über eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol entwässert.

Als Alkohol- und Xylol-Ersatz wurden wieder *Ottix Shaper* bzw. *Ottix Plus* verwendet.

Schritt	Dauer
<i>Ottix Shaper</i> (I)	10x eintauchen
<i>Ottix Shaper</i> (II)	10x eintauchen
<i>Ottix Shaper</i> (III)	10x eintauchen
<i>Ottix Shaper</i> (IV)	5 min
<i>Ottix Plus</i> (I)	10x eintauchen
<i>Ottix Plus</i> (II)	10x eintauchen
<i>Ottix Plus</i> (III)	10x eintauchen
<i>Ottix Plus</i> (IV)	10x eintauchen
Xylol	10x eintauchen und mindestens 10 min inkubieren

Anschließend wurden die HE-gefärbten FFPE-Gewebeschnitte mit Hilfe von Eukitt eingedeckelt und bei RT gelagert.

3.6.5 Immunhistochemische Färbung von FFPE-Gewebeschnitten (IHC-P)

Um eine Aussage über die zelltyp- und gewebespezifische Expression der Importin- α Isoformen zu treffen oder den Zell- und Gewebetropismus von Influenzaviren in verschiedenen Organen zu visualisieren, wurden FFPE-Gewebeschnitte indirekt immunhistochemisch gefärbt (IHC-P).

Zur Detektion der Importin- α Isoformen wurden die entparaffinierten und rehydrierten Gewebeschnitte aus 3.6.3 zuerst zur Antigen-Demaskierung für 15 min in Citratpuffer aufgekocht und anschließend 1x für 5 min in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit den in 1x PBS (inkl. 0,1 % BSA) verdünnten Importin- α 1, - α 3 und - α 5/ α 7 Primärantikörpern für 1 h bei RT inkubiert (Verdünnungen siehe 2.14). Nach zweimaligem Waschen mit Waschpuffer IHC-P erfolgte die einstündige Inkubation mit dem biotinkonjugierten Anti-Kaninchen-Sekundärantikörper bei RT (Verdünnung siehe 2.15). Anschließend wurde erneut zweimal mit 1x PBS gewaschen, bevor der gebundene Sekundärantikörper mit einem Peroxidase-konjugierten Avidin-Biotin-Komplex-Reaktionssystem und dem HRP-Substrat AEC nach Herstellerangaben (DAKO) detektiert wurde. Hierzu wurden 50 ml Natriumacetatlösung mit 2,5 ml AEC (gelöst in DMF) und 25 μ l H₂O₂ versetzt, die Schnitte für 10 min bei RT inkubiert und nach ausreichender Färbung zweimal mit 1x PBS gewaschen. Dieser immunhistochemischen Färbung wurde eine Gegenfärbung mit Hämalaun (3.6.4), jedoch ohne die Eosin-Färbung und mit Einbettung in Kaisers Glyceringelatine, angeschlossen. Die Kontrolle der Antikörperspezifität mittels Blockingpeptiden (2.16) erfolgte mit drei verschiedenen Peptidkonzentrationen (0,2 μ g/ml, 2 μ g/ml bzw. 20 μ g/ml). Hierzu wurden die primären Antikörper mit den Peptiden in den angegebenen Konzentrationen versetzt und für 30 min inkubiert.

Zur immunhistochemischen Detektion von viralem Antigen wurden die entparaffinierten und rehydrierten Gewebeschnitte aus 3.6.3 zuerst zur Antigen-Demaskierung in *Citrat Plus Puffer* in einer Mikrowelle aufgekocht (16 min bei 850 Watt, 5 min bei 450 Watt, 20 min Abkühlung) und anschließend 1x für 5 min in PBS gewaschen. Da in dieser Arbeit ein HRP-Konjugat zur Detektion verwendet wurde, wurde die endogene Peroxidase zur Reduktion von zu hoher DAB-Hintergrundfärbung blockiert. Hierzu erfolgte eine 15-minütige Inkubation der Schnitte in Methanol (inkl. 3 % H₂O₂) bei RT, gefolgt von zwei 5-minütigen Waschschritten in PBS bei RT. Zur Avidin/Biotin-Blockierung wurden die Gewebeschnitte mit dem *Avidin/Biotin Blocking Kit SP2001* behandelt (je Lösung 15 min, RT). Nach dreimaligem Waschen für 5 min in PBS wurden die Schnitte zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungen mit dem *ZytoChemPlus (HRP) Broad Spectrum (DAB) Kit* für 5 min bei RT behandelt und erneut dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Bindung des Sekundärantikörpers folgte eine 30-minütige Inkubation in 10 %-igem Eselserum in PBS bei RT. Anschließend wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper (Kaninchen anti-FPV, 1:2000, in PBS) für 75 min bei RT inkubiert. Es wurde zuerst 3x für 5 min mit PBS-T gewaschen, dann 3x für 5 min mit PBS. Zur Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen-Biotin, 1:200, in PBS mit 2 % Eselserum) wurden die Gewebeschnitte für 25 min bei RT inkubiert und anschließend 3x für 5 min mit PBS gewaschen. Nach der darauffolgenden 15-minütigen Inkubation mit dem Streptavidin-HRP-Konjugat aus dem *ZytoChemPlus (HRP) Broad Spectrum (DAB) Kit* bei RT und zwei weiteren 5-minütigen Waschschritten in PBS, wurde das Influenzavirusantigen mit dem Substrat der HRP, 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), indirekt immunhistochemisch detektiert. Die Farbentwicklung wurde am Mikroskop kontrolliert und die Reaktion nach etwa 3-5 min mit ddH₂O abgestoppt. Dieser immunhistochemischen Färbung wurde eine Gegenfärbung mit Hämalaun in Abhängigkeit von der DAB-Intensität (3.6.4) angeschlossen.

3.6.6 Bildaufnahme der histologischen und immunhistologischen Färbungen

Die Bildaufnahme erfolgte über ein NIKON AZ100-Mikroskop mit einer NIKON DS-Ri1 *high-resolution* Mikroskopkamera. Als Objektive wurden das AZ Plan Fluor 5x und das AZ Plan Apo 1x benutzt. Für die Bildaufnahme wurde der NIKON Digital Sight DS-L2 *Imaging Controller* verwendet. Die Bildverarbeitung erfolgte mit Hilfe der NIS-Elements *Advanced Research (AR) Imaging Software v.4.12.00 (Build 887)* (Nikon Instruments Europe B.V) und der Adobe® *Photoshop® CS4 Extended v.11.0.2* Software. Alternativ wurden ein BX41-Mikroskop (Olympus) sowie die *cellSens* Software (Olympus) verwendet.

3.6.7 Laser Microbeam-Mikrodissektion (LMM)

Mit Hilfe der *Laser Microbeam-Mikrodissektion* (LMM, *Laser Microbeam Microdissection*) wurden gezielt Bronchialepithel und Alveolargewebe aus der Mauslunge isoliert. Die LMM wurde am *PALM MicroBeam System* (P.A.L.M. Microlaser Technologies GmbH / ZEISS) durchgeführt. Zur Präparation der Mauslungen für die LMM wurden diese mit Hilfe des Plastikschauchs eines Einmal-Katheters (*BD Venflon™ Pro Peripheral IV*) und einer 2 ml-Spritze mit ca. 1 ml 50 %-igem *Tissue Tek® Compound* Kryoschnitt-Einbettmedium (gelöst in 1x PBS) befüllt. Anschließend wurden die befüllten Lungen für 1 min in schmelzendem Isopentan (-80 °C) schockgefroren, in rechte und linke Lungenhälfte geteilt, in *Tissue Tek®* eingebettet und bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Am Kryotom CM3050 S (LEICA) wurden 10 µm dicke Gefrierschnitte bei -20 °C angefertigt. Die anschließende Färbung mit Kresylviolett erfolgte nach 5-minütigem Trocknen im Gerät bei -20 °C:

Schritt	Dauer	Temperatur
Ethanol (70 %)	2 min	-20 °C
Kresylviolett-färbelösung	ca. 2 sec	RT
Ethanol (70 %)	30 sec	-20 °C
Ethanol (100 %)	30 sec	-20 °C

Nachdem die Schnitte abgetropft waren, wurden sie bei RT in eine mit Trocknungsmittel befüllte Küvette gestellt. Für die Mikrodissektion wurde die Deckelinnenseite eines RNase-freien 0,5 ml-Reaktionsgefäßes mit Mineralöl beschichtet und das so präparierte Reaktionsgefäß in den *PALM CapMover* des *PALM MicroBeam Systems* zum Auffangen der hochkatapultierten, mikrodissektierten Gewebefragmente eingespannt. Zur Steuerung des Gerätes wurde die *PALM RoboSoftware v2.2* verwendet. Nach Markieren des gewünschten Gewebeareals mit Hilfe des Freihandmodus wurde bei einer UV-Energie des Lasers von 72, einem UV-Fokus von 63 und einer Schneidegeschwindigkeit von 25 mikrodissektiert. Anschließend wurde die RNA aus den mikrodissektierten Proben isoliert (3.3.3.2: „*RNA-Isolierung aus murinem mikrodissektiertem Bronchialepithel und Alveolargewebe*“) und mittels RT-qPCR die Importin- α mRNA-Expressionslevel bestimmt (3.3.6).

3.7 Tierversuche

In der vorliegenden Arbeit wurde das Tiermodell der Maus verwendet. Die Ermittlung der Überlebensrate (*survival*), des Gewichtsverlustes und des Organotropismus im Mausmodell erlauben einen Rückschluss auf die Virulenz und Pathogenität der untersuchten Influenzaviren. Alle in dieser Arbeit beschriebenen Tierversuche wurden unter Bedingungen der Biologischen Schutzstufe 2 (BSL-2 (*biosafety level 2*): SC35M, Punktmutanten von SC35) oder 3 (BSL-3: SC35) im Heinrich-Pette-Institut, Leibniz-Institut für Experimentelle

Virologie (HPI) in Hamburg nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Die Genehmigung des Tierversuchsvorhabens erfolgte unter der Genehmigungsnummer 29/09 durch die Behörde für Stadtentwicklung und Umwelt Hamburg. In dieser Arbeit wurden Mäuse des genetischen C57BL/6-Hintergrunds verwendet. Die Generierung der Importin- α *knockout* Mäuse in diesem Hintergrund erfolgte durch Prof. Dr. M. Bader und Prof. Dr. E. Hartmann (MDC, Berlin-Buch, Deutschland bzw. Institut für Biologie, Universität zu Lübeck, Lübeck, Deutschland). Importin- $\alpha 3$ *knockout*-Mäuse (Importin- $\alpha 3^{-/-}$) sowie ihre Wildtyp (WT, +/+) Wurfgeschwister (*littermates*) wurden am HPI in Hamburg gezüchtet.

3.7.1 Narkose und Infektion

Zur intranasalen (i.n.) Infektion von WT bzw. Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mäusen (♀ und ♂, Alter: 8-25 Wochen) mit Influenzaviren wurden diese nach inhalativer Isofluran-Kurzarkose zur Stilllegung intraperitoneal (i.p.) narkotisiert. Dazu wurde als Narkosemittel eine in physiologischer Kochsalzlösung gelöste Mischung aus Ketamin (70 mg/kg) und Xylazin (7 mg/kg) verabreicht, welche mit einer Einweg-Injektionskanüle (*Microlance™* 3: 26G 3/8“, 0,45 x 10 mm) i.p. appliziert wurde. Die Virusdosis wurde mit sterilem 1x PBS (PAA) eingestellt und in einem Gesamtvolumen von 50 μ l intranasal mittels einer 100 μ l-Pipette verabreicht.

3.7.2 Überlebensversuch (MLD₅₀-Bestimmung)

Zur Bestimmung der Virulenz der untersuchten Viren in WT und Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mäusen wurde die mittlere Maus-letale Dosis (MLD₅₀) nach der Methode von Reed und Muench bestimmt (Reed und Muench, 1938). Dazu wurden die Versuchstiere mit verschiedenen Infektionsdosen des HPAIV SC35 (H7N7) und der mausadaptierten Variante SC35M infiziert (siehe 3.7.1). Über einen Zeitraum von 14 Tagen wurden der Gewichtsverlust und die Überlebenszeit der infizierten Tiere überwacht. Bei einem Gewichtsverlust von >25 % im Vergleich zum Ausgangsgewicht, bzw. nach Ablauf der 14 Tage, wurden die Tiere durch inhalative Isofluran-Narkose und anschließende zervikale Dislokation euthanasiert.

3.7.3 Organentnahme und Töten der Versuchstiere

Organe wurden von infizierten bzw. nicht-infizierten Kontrolltieren nach verschiedenen Zeitpunkten der Infektion (1, 3 und 6 d p.i.) entnommen, um in diesen Importin- α mRNA-Expressionslevel und die Viruslast zu bestimmen oder histologische Untersuchungen vorzunehmen. Die Organentnahme erfolgte entweder nach inhalativer Isofluran-Narkose und anschließender zervikaler Dislokation oder es erfolgte vorher eine intrakardiale Perfusion.

Dazu wurden die Tiere, wie in 3.7.4 beschrieben, narkotisiert und behandelt. Für die finale Blutentnahme wurde nach Ausfall des Zwischenzehenreflexes mittels einer Einmal-Injektionskanüle (*Microlance™* 3: 25G 1“, 0,5 x 25 mm) das Vollblut durch Herzpunktion entnommen, in ein 200 µl-EDTA-Kapillarblutentnahme-Röhrchen überführt und die Maus anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Zur Entnahme von Lunge, Trachea, Leber und Milz wurde die Maus in Rückenlage positioniert, falls erforderlich an den Extremitäten auf der Unterlage fixiert, der Thorax sowie der Bauchraum von ventral mit einer Schere eröffnet und die Organe freipräpariert und entnommen. Um das Gehirn zu entnehmen, musste die Schädeldecke mit einer Schere vom *Foramen magnum* ausgehend geöffnet werden. Für die Präparation von FFPE-Gewebeschnitten des oberen Respirationstraktes (ORT) und des Gehirns wurde der Caput mit einer großen Schere oberhalb des ersten Halswirbels (Atlas) abgetrennt, gehäutet und, wie in 3.6.1 beschrieben, weiterverarbeitet. Das Gewebe des ORTs (Nasenmuschel) wurde entnommen, indem der Schädel ebenfalls vom *Foramen magnum* ausgehend bis zur Nase mittig sagittal mit einer Schere aufgeschnitten und gespalten wurde. Mit einer sterilen, RNase-freien Präpariernadel wurde das Gewebe der Nasenmuschel vorsichtig aus dem halbierten Schädel geschabt und in ein Reaktionsgefäß mit *RNAlater* zur Gesamt-RNA Isolierung (3.3.3.2) überführt.

3.7.4 Intrakardiale Perfusion

Falls im Verlauf des weiteren Versuchs blutfreie Organe der Maus benötigt wurden, wurde vor der Organentnahme (3.7.3) eine intrakardiale Perfusion des gesamten Organismus durchgeführt. Da hierzu ein funktionierendes Herz-Kreislaufsystem benötigt wurde, wurden die Mäuse nach kurzer inhalativer Isofluran-Narkose zur Stilllegung mit einer Überdosis narkotisiert (140 mg/kg Ketamin und 14 mg/kg Xylazin in physiol. Kochsalzlösung; i.p.-Applikation mit Einweg-Injektionskanüle *Microlance™* 3: 26G 3/8“, 0,45 x 10 mm). So wurde während der anschließenden Perfusion eine tiefe Narkose ohne mögliches Aufwachen mit intaktem Herz-Kreislaufsystem gewährleistet. Eine tiefe Narkose war gewöhnlich nach 5-10 min erreicht und wurde über Kontrolle des Zwischenzehenreflexes mehrfach überprüft. Nur wenn ein kompletter Ausfall von diesem gegeben war, wurde die Maus in Rückenlage an den Extremitäten auf der Unterlage fixiert und der Thorax von ventral mit einer Schere eröffnet. Die Kanüle (*Microlance™* 3: 25G 1“, 0,5 x 25 mm) einer mit 10 ml DEPC-1x PBS befüllten Spritze wurde in den linken Ventrikel des noch schlagenden Herzens eingeführt und das rechte Atrium mit einer Schere eröffnet. Anschließend wurde das Kreislaufsystem der Maus mit dem in der Spritze vorliegenden PBS in 3-4 min perfundiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass eine gleichmäßige Flussrate gewährleistet war. Nach erfolgreicher Perfusion und Entfernung des Herzens wurde die Organentnahme durchgeführt (3.7.3).

3.7.5 Präparation von murinen Organen für Folgeuntersuchungen

Je nach Versuchsvorhaben wurden die erhaltenen Organe wie folgt aufgearbeitet: Organe, aus denen Gesamt-RNA isoliert werden sollte, wurden zügig entnommen, in Stückchen mit einer Kantenlänge von ≤ 5 mm zerteilt und in mit *RNAlater* gefüllte 2 ml-Reaktionsgefäße auf Eis überführt. Nach ca. 16-stündiger Inkubation bei 4 °C wurden die Organstückchen aus dem *RNAlater* entnommen und zur Lagerung bei -80 °C in ein frisches 2 ml-Reaktionsgefäß überführt oder direkt weiter aufgearbeitet (3.3.3.2). Die zur Virustiterbestimmung entnommenen Organe wurden in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt, welche mit ca. 500 μ l Glasperlen (\emptyset 0,50-0,75 mm) und 1 ml sterilem 1x PBS (PAA) befüllt waren, und das Gewicht der Organe bestimmt. Nach 10-minütiger Homogenisierung in der Schwingmühle MM400 (Retsch) bei 30 Hz und 4 °C wurden die Organhomogenisate für 5 min bei 6000 x g und 4 °C zentrifugiert und die Überstände in 2 ml-Kryoröhrchen überführt. Bis zur Bestimmung des Virustiters mittels Plaquetest auf MDCK-Zellen (3.5.3) wurden die Organhomogenisate bei -80 °C gelagert. Die Erstellung von FFPE-Gewebeschnitten für die IHC-P oder von Kryoschnitten für die Mikrodissektion (LMM) ist in 3.6.1 bzw. 3.6.7 näher beschrieben.

3.8 Statistische Auswertungen

Die statistischen Auswertungen der Daten erfolgten mit Hilfe der kommerziellen Statistiksoftware *GraphPad Prism 5 v.5.03* für Windows (Graphpad Software, Inc.) und der online frei verfügbaren Statistiksoftware *PAST v.2.17c* (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>; Hammer *et al.*, 2001). Eine statistische Signifikanz lag vor, wenn der p-Wert $\leq 0,05$ war. Die weitere Klassifizierung der statistischen Signifikanz wurde wie folgt gekennzeichnet: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Statistisch signifikante Unterschiede in den Überlebensraten zwischen WT und Importin- $\alpha 3^{-/-}$ C57BL/6 Mäusen (4.5.3) wurden mittels Log-Rank (Mantel-Cox)-Test und den Daten der Kaplan-Meier-Überlebenskurven mit Hilfe von *GraphPad Prism 5* berechnet. Die statistische Signifikanz der bestimmten Importin- α mRNA-Expressionslevel (4.3, 4.4.2-4.4.3) wurde mit Hilfe des nichtparametrischen Kruskal-Wallis *One-Way Analysis of Variance*-Tests unter Verwendung der *PAST*-Software berechnet. Die statistischen Signifikanzen aller restlichen Daten dieser Arbeit wurden mit Hilfe des Student's-*t*-Tests unter Verwendung von *GraphPad Prism 5* ermittelt.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss des Importin- α 3 Gens auf die Influenza A Virus Replikation *in vitro*

Um ein genaueres Verständnis des Einflusses der Importin- α 3 Isoform auf die Replikationseigenschaften von Influenzaviren zu erlangen, wurden die viralen Polymeraseaktivitäten sowie die Importin- α 3 Proteinlevel nach Infektion *in vitro* bestimmt.

a) Polymeraseaktivität aviärer und säugeradaptierter H7N7 vRNP-Komplexe in Importin- α 3 herabregulierten humanen Zellen

Für die wirtsadaptive Signatur E627K im PB2-Protein konnte bereits *in vitro* gezeigt werden, dass die virale Polymeraseaktivität in humanen Zellen durch die Herabregulierung einzelner Importin- α Isoformen differenziell reguliert wird. Unabhängig von der Wirtsspezifität führt eine Herabregulierung der Importin- α 3 Isoform in humanen HEK 293T-Zellen zu einer Erhöhung der Polymeraseaktivität von aviären PB2 627E-RNP und humanen PB2 627K-RNP Komplexen. Im Gegensatz dazu verringert die Herabregulierung der Importin- α Isoformen α 1 und α 7 nur die Polymeraseaktivität des humanen PB2 627K RNP-Komplexes (Hudjetz und Gabriel, 2012). Der inhibitorische Effekt der Importin- α 3 Isoform auf die Polymeraseaktivität sollte in dieser Arbeit auch für die wirtsadaptiven Signaturen PB2 D701N und NP N319K der verwendeten H7N7 Viren untersucht werden. Dazu wurden *in vitro* Polymerase-Reporterversuche in Importin- α 3 herabregulierten humanen Zellen durchgeführt (siehe 3.4.3). Hiermit sollte zudem die Relevanz der Importin- α 3 Isoform für Viren verschiedener Wirtsspezifitäten im humanen System näher definiert werden. Mittels Importin- α 3-spezifischer siRNA (Hudjetz und Gabriel, 2012) wurde die Importin- α 3 Isoform in humanen HEK 293T-Zellen herabreguliert. Zuvor war auf Proteinebene nachgewiesen worden, dass die verminderte Expression einzelner Importin- α Isoformen keinen Einfluss auf die Expression der übrigen Importin- α Isoformen hat (Hudjetz und Gabriel, 2012). Um zusätzliche, unspezifische Effekte der siRNA-Transfektion auszuschließen, wurden HEK 293T-Zellen zur Kontrolle mit einer kommerziellen und ebenfalls validierten Negativ-Kontroll-siRNA (*AllStars Negative Control siRNA*, QIAGEN) transfiziert. Nach erfolgter siRNA-Transfektion wurden in diesen Zellen die vRNP-Komplexe des aviären HPAIV SC35 oder der säugeradaptierten SC35M-Variante rekonstituiert. Die Polymeraseaktivitäten der vRNP-Komplexe in den Importin- α 3 herabregulierten humanen Zellen wurden 24 h nach der Transfektion bestimmt (3.4.3). Die erfolgreiche Herabregulierung der Importin- α 3 Isoform wurde zudem mittels Western-Blot Analyse kontrolliert (Abb. 17A). Die Polymeraseaktivität in den Kontroll-siRNA-behandelten Zellen zeigte nur minimale Unterschiede zu den unbehandelten Zellen. Daher wurde die Polymeraseaktivität in den unbehandelten Zellen als

Referenz gleich 100 % gesetzt. Eine herabregulierte Importin- α 3 Expression führte zu einem signifikanten Anstieg der Polymeraseaktivität der vRNP-Komplexe von SC35 und SC35M (Abb. 17B). Die Polymeraseaktivität von SC35 mit den aviären Signaturen PB2 701D und NP 319N war bei verringerter Importin- α 3 Expression signifikant auf einen Wert von 330 % im Vergleich zu den unbehandelten Zellen erhöht. Doch auch die Polymeraseaktivität von SC35M mit den humanen Signaturen PB2 701N und NP 319K zeigte in den HEK 293T-Zellen bei herabregulierter Importin- α 3 Expression eine signifikante Erhöhung auf 170 % (Abb. 17B). Generell besitzt die aviäre Polymerase von SC35 in der humanen Wirtsumgebung eine um etwa 80 % niedrigere Polymeraseaktivität als die des säugeradaptierten Virus (Gabriel *et al.*, 2005).

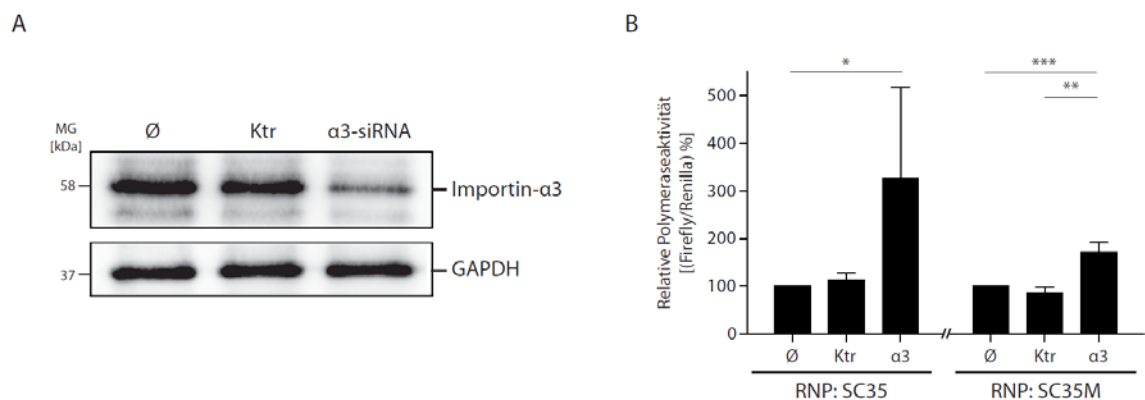


Abb. 17: Polymeraseaktivität von HPAIV H7N7 in Importin- α 3 herabregulierten humanen Zellen. HEK 293T-Zellen wurden entweder nur mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine-2000 behandelt (\emptyset), oder zur Herabregulierung von Importin- α 3 mit spezifischer siRNA (α 3-siRNA) bzw. Negativ-Kontroll-siRNA (Ktr) transfiziert. (A) Die siRNA-vermittelte Importin- α 3 Herabregulierung wurde in einer Western-Blot Analyse überprüft, wobei das Protein GAPDH als Ladekontrolle diente. (B) Aviäre SC35 (H7N7) und säugeradaptierte SC35M (H7N7) vRNP-Komplexe wurden 48 h nach der siRNA-Transfektion in den humanen Importin- α 3 herabregulierten HEK 293T-Zellen rekonstituiert. Dabei wurden auch die Expressionsplasmide der für die *Firefly*-Luciferase kodierenden vRNA (-ssRNA) und der Renilla-Luciferase transfiziert, die hierbei als interne Kontrolle fungiert. Die Polymeraseaktivität wurde 24 h nach der vRNP-Transfektion unter Verwendung des *Dual-Luciferase Reporter Assay Systems* (Promega) *in vitro* bestimmt. Die mit dem Assay-Hintergrund normalisierte Polymeraseaktivität der vRNP-Komplexe in unbehandelten Zellen (\emptyset) wurde gleich 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Polymeraseaktivitäten mit Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's-*t*-Tests ermittelt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Zusammenfassend zeigen die erhaltenen Ergebnisse, dass eine Herabregulierung der Importin- α 3 Isoform, unabhängig von der Wirtsspezifität, zu einer Erhöhung der Polymeraseaktivität führt. Dies bestätigte die bereits für die wirtsadaptive Signatur PB2 E627K publizierten Daten (Hudjetz und Gabriel, 2012). Die negativ regulatorische Funktion der Importin- α 3 Isoform konnte somit auch für die Polymeraseaktivität von vRNP-Komplexen mit der wirtsadaptiven Signatur PB2 D701N gezeigt werden. Demnach fungiert die Importin- α 3 Isoform hier ebenfalls als Inhibitor der viralen Polymeraseaktivität.

b) Bestimmung der Importin- α 3 Proteinlevel in murinen Zellen nach Infektion mit aviären und säugeradaptierten H7N7-Viren *in vitro*

Als nächstes sollte geklärt werden, ob die Infektion mit Influenzaviren verschiedener Wirtsspezifitäten einen Einfluss auf die Expression der negativ regulatorischen Importin- α 3 Isoform hat. Dazu wurden Wildtyp (WT) MEF-Zellen (murine embryonale Fibroblasten) mit SC35 und SC35M mit einer MOI von 0,1 infiziert. Als Kontrolle wurden die Zellen statt mit virushaltigem Inokulum mit serumfreiem MEF-Infektionsmedium inkubiert (3.5.4). 48 Stunden p.i. wurden der Virustiter des Zellkulturüberstands mittels Plaquetest

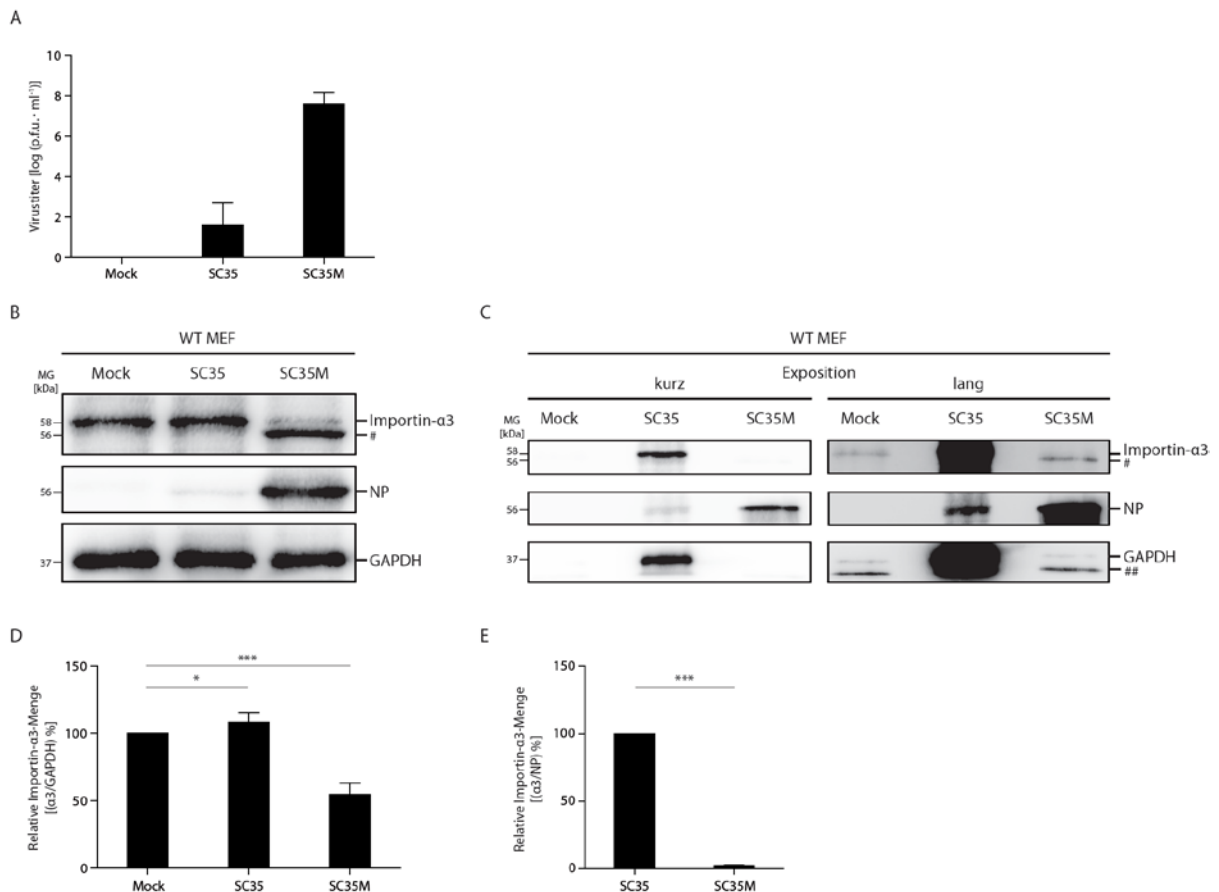


Abb. 18: Bestimmung der Importin- α 3 Proteinlevel nach Infektion mit HPAIV H7N7 Influenzaviren *in vitro*. (A) Murine embryonale Wildtyp-Fibroblasten (WT-MEFs) wurden zur Bestimmung der Importin- α 3 Proteinlevel nach Infektion mit einer Multiplizität der Infektion (MOI) von 0,1 des SC35 bzw. SC35M-Virus inokuliert. Als Kontrollzellen wurden mit sterilem Infektionsmedium behandelte MEF-Zellen verwandt (Mock). Die Virustiter wurden anschließend auf MDCK-Zellen mittels Plaquetest bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der logarithmischen Virustiter 48 h p.i. mit Standardabweichungen aus vier unabhängigen Experimenten. (B, C) Weiterhin wurden infizierte WT-MEF-Zellen 48 h p.i. lysiert und endogene Importin- α 3 Proteinmengen unter Verwendung eines Importin- α 3-spezifischen Antikörpers mittels Western-Blot detektiert. NP-Mengen wurden ebenfalls bestimmt und GAPDH als Ladekontrolle verwendet. (#) markiert eine Bande im Importin- α 3 Blot, die auf eine Kreuzreaktivität des Importin- α 3 Antikörpers mit dem viralen NP zurückzuführen ist. (##) markiert ein falsch-positives Signal des GAPDH-Antikörpers an der Lauffront. Es wurden entweder die GAPDH-Proteinmengen angeglichen (B) oder näherungsweise die NP-Proteinmengen (C). (D, E) Die Western-Blot Ergebnisse wurden mit dem Dokumentationssystem *Imagequant LAS 4000* und der Auswertungssoftware *ImageQuant Tools* quantifiziert. Die Importin- α 3 Proteinmenge in der Probe wurde dabei gegen die GAPDH-Menge normalisiert und die relative Importin- α 3 Menge der Kontrollprobe (Mock) gleich 100 % gesetzt (D). Alternativ wurde die NP-Menge in den SC35-infizierten WT-MEFs rechnerisch gleich 100 % gesetzt und die relativen Importin- α 3 Mengen im Verhältnis dazu berechnet (E). Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Mengen an Importin- α 3 Protein mit Standardabweichungen aus vier unabhängigen Experimenten (D, E). Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's-*t*-Tests ermittelt (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

bestimmt (3.5.3) und Gesamtproteinextrakte der infizierten Zellen hergestellt (3.4.1). Anschließend wurden die Mengen von endogenem Importin- α 3 Protein, viralem Nukleoprotein (NP) und GAPDH als endogener Referenz in den Gesamtproteinextrakten mittels Western-Blot detektiert und quantifiziert (3.4). Wie erwartet führte die Infektion mit dem schon an den Säuger adaptierten SC35M zu einem höheren detektierbaren Virustiter im Zellüberstand ($7,64 \log_{10}$ p.f.u./ml), als die mit SC35 ($1,64 \log_{10}$ p.f.u./ml; Abb. 18A). Die erhöhte Produktion von Virusnachkommen zeigte sich im Falle von SC35M auch bei Detektion des viralen Nukleoproteins (NP) in den Lysaten der infizierten Zellen (Abb. 18B, C). In den SC35M-infizierten Zellen war deutlich mehr NP detektierbar als in den SC35-infizierten Zellen, obwohl eine identische MOI verwendet wurde. Weiterhin war eine differenziell regulatorische Wirkung der Influenzavirus Infektion auf die Importin- α 3 Expression auf Proteinebene sichtbar. Die Infektion mit SC35 führte zu einer geringfügigen, jedoch signifikanten Erhöhung der relativen Importin- α 3 Proteinmenge auf etwa 110 % in den murinen Zellen bei Angleichung der GAPDH-Mengen (Abb. 18D). Im Gegensatz dazu, hatte eine Infektion mit SC35M eine signifikante Reduktion der relativen Importin- α 3 Proteinmenge auf etwa 55 % der Ausgangsproteinmenge zur Folge. Alternativ wurden die NP-Proteinmengen quantifiziert und die Importin- α 3 Mengen dazu ins Verhältnis gesetzt. In dieser Darstellung der Ergebnisse hatte die SC35M Infektion eine drastische Reduktion der Importin- α 3 Proteinmenge auf 2 % der in den SC35-infizierten Zellen vorliegenden Importin- α 3 Menge zur Folge (Abb. 18E).

Somit üben Influenzaviren einen differenziellen Effekt auf die Regulierung der endogenen Importin- α 3 Isoform aus, die auf Proteinebene nachweisbar ist. Die Infektion mit einem HPAIV führt *in vitro* zu einer erhöhten Importin- α 3 Expression, während ein säugeradaptiertes Influenzavirus die Expression dieser Isoform herabreguliert. Zudem ist hervorzuheben, dass die differenzielle Importin- α 3 Regulierung wirtsspezifisch erfolgt.

4.2 Wachstumsverhalten von H7N7-Viren in murinen Importin- α *knockout* Zellen

Im letzten Abschnitt konnte gezeigt werden, dass die Expression der Importin- α 3 Isoform nach einer Influenzavirus Infektion differenziell reguliert wird und die virale Polymeraseaktivität und Replikation beeinflusst. Daher sollte untersucht werden, welchen Einfluss der vollständige Verlust der negativ regulatorischen Importin- α 3 Isoform bzw. der proliferativen Importin- α 7 Isoform auf das Wachstum von SC35 und SC35M im Kontext der wirtsadaptiven Mutationen PB2 D701N und NP N319K hat. Hierzu wurden Wachstumskinetiken in Wildtyp (WT) und Importin- α *knockout*-Zellen einer murinen, embryonalen Fibroblastenzelllinie (MEF) durchgeführt (3.5.4). Um den Einfluss unterschiedlicher Replikationseffizienzen auf die Importin- α -abhängige Influenzavirus

Replikation zu untersuchen, wurden Wachstumskinetiken mit einer niedrigen und einer hohen MOI durchgeführt. WT, Importin- $\alpha 3^{-/-}$ und Importin- $\alpha 7^{-/-}$ MEFs wurden bei SC35 mit einer MOI von 0,1 und 1 infiziert (Abb. 19A bzw. C), während zur Infektion mit SC35M eine MOI von 0,01 und 0,001 verwendet wurde (Abb. 19B bzw. D). SC35 zeigte in WT MEF-Zellen bei niedriger und hoher MOI nur ein geringes Wachstum mit einem maximalen Titer von $2,4 \log_{10}$ p.f.u./ml, während die Infektion von WT MEF-Zellen mit SC35M zu hohen Titern von $6,8 \log_{10}$ p.f.u./ml führte. Der Verlust der Importin- $\alpha 3$ bzw. der Importin- $\alpha 7$ Isoform hatte unterschiedliche Auswirkungen auf das Wachstum der Viren unterschiedlicher Spezies. SC35 zeigte in den Importin- $\alpha 3^{-/-}$ MEFs nach Infektion mit niedriger und hoher MOI im Vergleich zum WT ($2,4 \log_{10}$ p.f.u./ml) ein stark und signifikant erhöhtes Wachstum mit bis zu $5,9 \log_{10}$ p.f.u./ml. Hingegen war das Wachstum von SC35 in Importin- $\alpha 7^{-/-}$ MEF-Zellen vergleichbar zu dem im WT (maximal $1,2 \log_{10}$ p.f.u./ml; Abb. 19A und C). Im Gegensatz dazu hatte nur das Fehlen der Importin- $\alpha 7$ Isoform eine drastische Auswirkung auf das Wachstum von SC35M (Abb. 19B bzw. D).

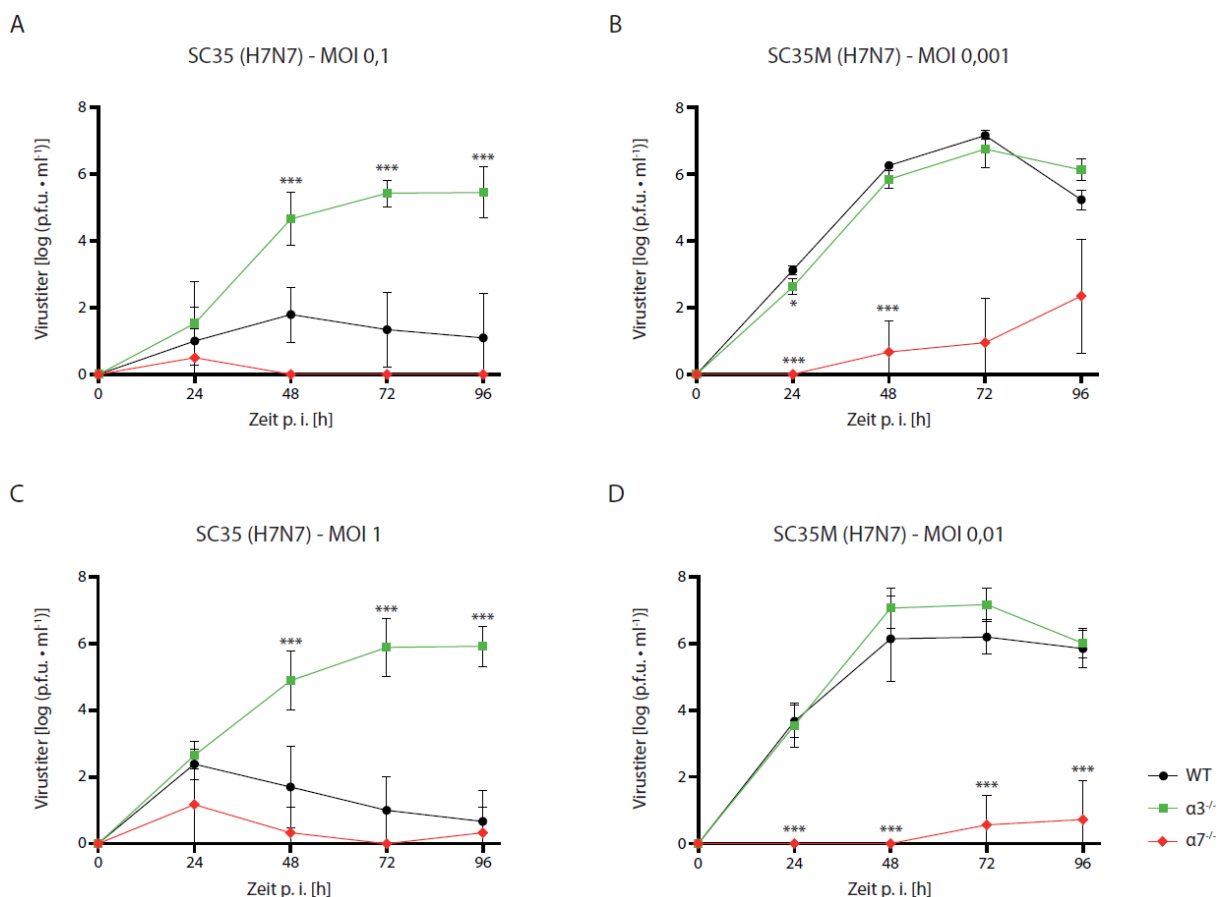


Abb. 19: Wachstumsverhalten des aviären HPAIV SC35 (H7N7) und des säugeradaptierten SC35M Virus (H7N7) in murinen Importin- α defizienten Zellen. Wildtyp (WT), Importin- $\alpha 3^{-/-}$ und Importin- $\alpha 7^{-/-}$ MEFs (murine embryonale Fibroblasten) wurden im Falle von SC35 mit einer Multiplizität der Infektion (MOI) von 0,1 und 1 (A bzw. C) inokuliert bzw. bei SC35M mit einer MOI von 0,001 und 0,01 (B bzw. D). Die Virustiter wurden mittels Plaquetest auf MDCK-Zellen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der logarithmischen Virustiter (0, 24, 48, 72 und 96 h.p.i.) aus 3-8 unabhängigen Experimenten. Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's-*t*-Tests ermittelt (***) $p < 0,001$.

Die Virustiter von SC35M in den Importin- $\alpha 7^{-/-}$ MEFs waren im Vergleich zum WT ($7,2 \log_{10}$ p.f.u./ml) zu allen untersuchten Zeitpunkten und bei niedriger sowie hoher MOI stark auf 0 bis $2,3 \log_{10}$ p.f.u./ml erniedrigt (Abb. 19B bzw. D). Weiterhin hatte das komplette Fehlen der Importin- $\alpha 3$ Isoform keine signifikante Auswirkung auf das Wachstum von SC35M.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Importin- $\alpha 3$ Isoform in murinen Zellen einen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum des aviären, noch nicht an den Säuger adaptierten SC35 Virus hat, während das schon säugeradaptierte SC35M Virus die Importin- $\alpha 7$ Isoform für eine effiziente Replikation benötigt.

Im Anschluss an die Untersuchung der differentiellen Importin- α Funktionen auf die Replikationseigenschaften von Influenzaviren *in vitro*, sollten ihr Vorkommen und ihre Rolle bei der Influenzavirus Infektion im Säuger *in vivo* analysiert werden.

4.3 Bestimmung der Importin- α mRNA-Expressionslevel

In dieser Arbeit wurden die differentiellen mRNA-Expressionslevel der Importin- α Isoformen in diversen Zelltypen des Säugers, u.a. im Respirationstrakt des Menschen und der Maus, charakterisiert. Hierzu wurde eine quantitative *Real-time* PCR mit isoformspezifischen humanen bzw. murinen Importin- α Primern etabliert. Aus den zu untersuchenden Proben wurde Gesamt-RNA isoliert (3.3.3) und mittels RT-PCR und eines *Random*-Primers wurde cDNA generiert (3.3.6.1). Anschließend wurde die cDNA in die RT-qPCR mit human- oder mausspezifischen Importin- α Primern eingesetzt (2.13.3). Die mRNA-Expressionslevel der Importin- α Isoformen ($\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$) und des endogenen Referenztranskripts GAPDH wurden dabei in einem Triplett- oder Vierfachansatz pro Transkript bestimmt (3.3.6.2). Als Negativkontrolle dienten RT-qPCR Reaktionsansätze ohne cDNA (NTC, *no template control*). Die Transkriptmengen der Importin- α Isoformen wurden nach relativer Quantifizierung analysiert und ins Verhältnis gesetzt. Dabei wurde der relative Importin- $\alpha 1$ Wert als Referenz gleich 1 gesetzt (3.3.6.3). Im Rahmen der RT-qPCR Etablierung wurden die generierten, isoformspezifischen Importin- α Primer zuerst in einer *OneStep* RT-PCR (3.3.5) und dann in einer RT-qPCR validiert (3.3.6).

4.3.1 Importin- α mRNA-Expressionslevel in humanen und murinen Zelllinien

Die RT-qPCR wurde zuerst in diversen humanen und murinen immortalisierten Zelllinien validiert. Für diese immortalisierten Zelllinien wurde bereits eine stark erhöhte Importin- $\alpha 1$ Expression als charakteristisches Merkmal beschrieben (Christiansen und Dyrskjöt, 2012). Dieses Ergebnis konnte in dieser Arbeit reproduziert werden: In allen untersuchten, humanen Zelllinien HEK 293T, A549 und HeLa (Abb. 20A-C) sowie der

murinen Zelllinie der WT-MEFs (Abb. 20D) zeigte Importin- α 1 eine um 2- bis 8-fach erhöhte Expression im Vergleich zu den restlichen Isoformen.

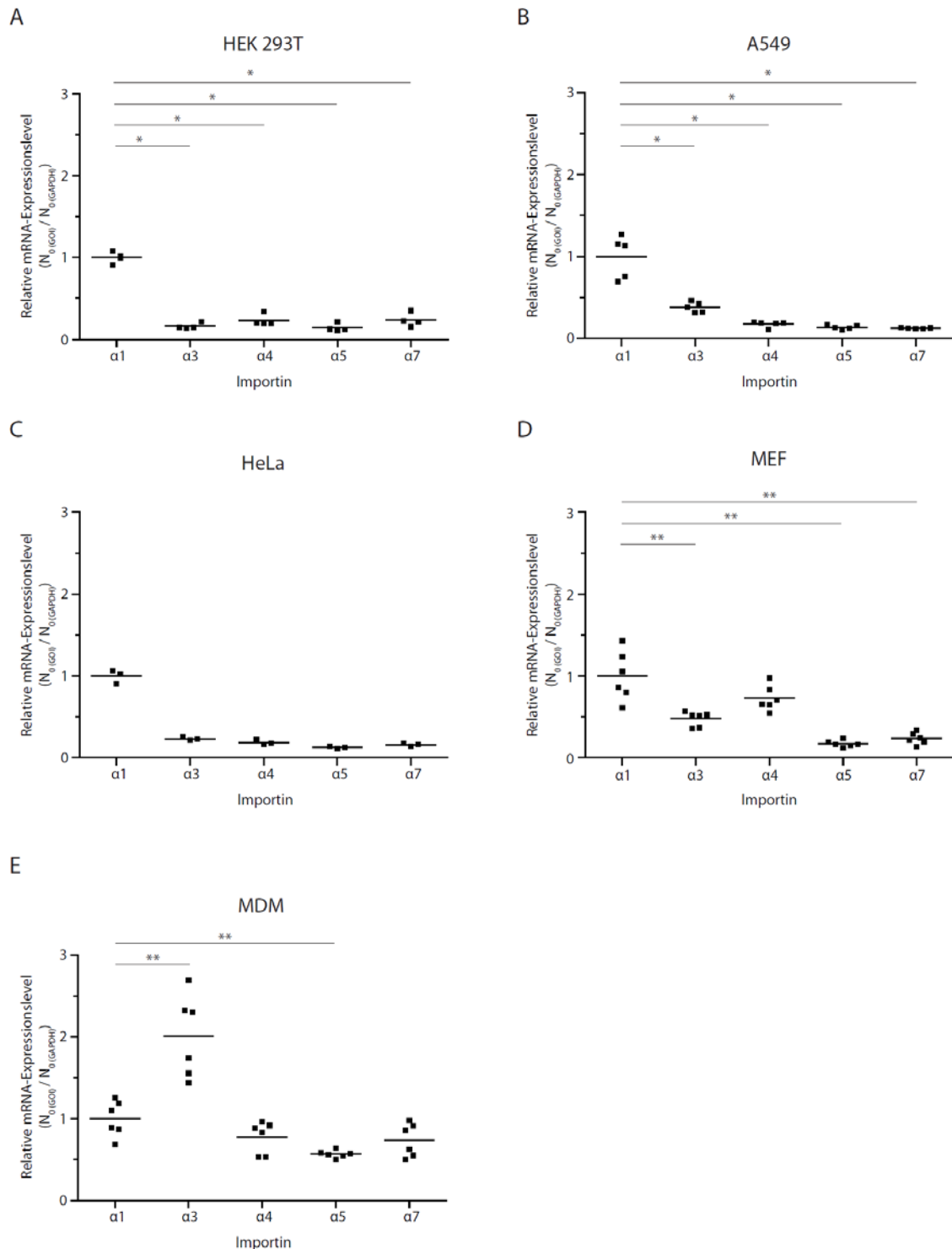


Abb. 20: Importin- α mRNA-Expressionslevel in Säugerzelllinien. Gesamt-RNA wurde aus den humanen Zelllinien HEK 293T (A), A549 (B) und HeLa (C) sowie einer murinen Zelllinie (Wildtyp-MEF, murine embryonale Fibroblasten, D) und aus primären, humanen MDM (*monocyte-derived macrophages*, E) isoliert. Nach cDNA-Generierung erfolgte die Bestimmung der Importin- α mRNA-Expressionslevel mit human- bzw. mausspezifischen Importin- α Primern mittels quantitativer *Real-time* PCR (RT-qPCR). Die Importin- α Expressionslevel wurden gegen die detektierten GAPDH-Expressionslevel normalisiert und die relativen Werte der Importin- α 1 Isoform als Referenz gleich 1 gesetzt. Jeder Datenpunkt repräsentiert eine individuelle Probe. Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Kruskal-Wallis *One-Way Analysis of Variance*-Tests ermittelt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Als Kontrolle dienten primäre humane MDM (*monocyte-derived macrophages*), in denen Importin- α 1 keine Überexpression zeigte (Abb. 20E).

Das erhaltene Ergebnis spiegelt somit sehr gut den derzeitigen Wissensstand über die erhöhte Importin- α 1 Expression in Krebszellen wider (Christiansen und Dyrskjöt, 2012). Die gewonnenen Daten stellen weiterhin eine gute Validierung des in dieser Arbeit etablierten Importin- α Isoformdetektionssystems auf Transkriptionsebene dar.

4.3.2 Importin- α mRNA-Expressionslevel muriner Organe

Im Folgenden sollten die Importin- α mRNA-Expressionslevel in verschiedenen Geweben und Organen der Maus (C57BL/6-Stamm) bestimmt werden.

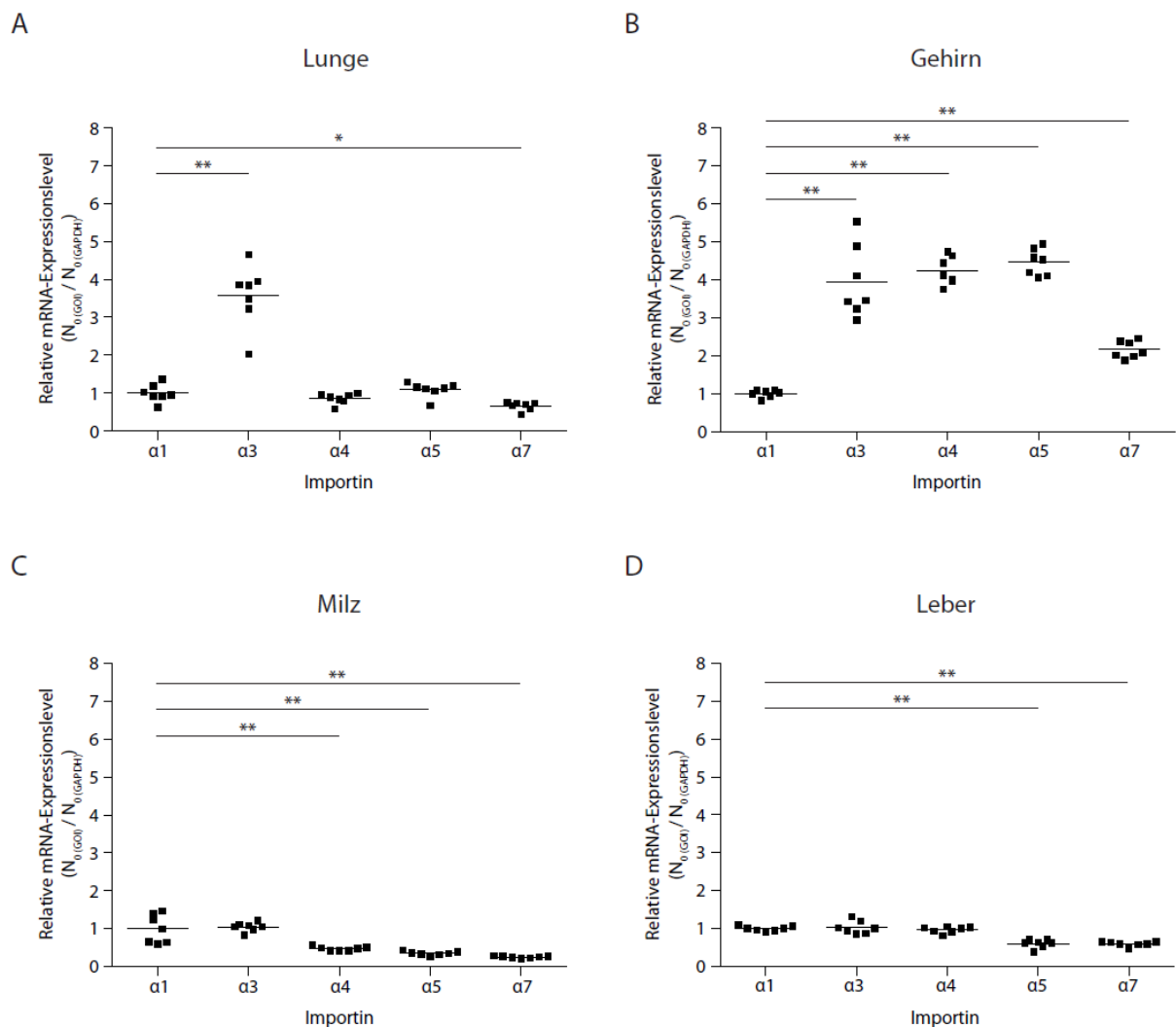


Abb. 21: Importin- α mRNA-Expressionslevel in murinen Organen. Gesamt-RNA wurde aus ganzen perfundierten Organen uninfizierter Wildtyp (WT) C57BL/6-Mäuse isoliert. Nach cDNA-Generierung erfolgte die Bestimmung der Importin- α mRNA-Expressionslevel in der Lunge (A), im Gehirn (B), in der Milz (C) und in der Leber (D) mit mausspezifischen Importin- α Primern mittels quantitativer *Real-time* PCR (RT-qPCR). Die Importin- α Expressionslevel wurden gegen die detektierten GAPDH-Expressionslevel normalisiert und die relativen Werte der Importin- α Isoform als Referenz gleich 1 gesetzt. Jeder Datenpunkt repräsentiert eine individuelle Organprobe/Maus. Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Kruskal-Wallis *One-Way Analysis of Variance*-Tests ermittelt (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001).

Eine differenzielle Expression der Importin- α Isoformen wurde bereits für diverse Zellen während der Proliferation und Differenzierung sowie für einige murine Organe gezeigt (Köhler *et al.*, 2002; 1999). Als Ausgangspunkt dienten perfundierte Mausorgane (3.7.4). Aus der isolierten Gesamt-RNA (3.3.3.2) wurde cDNA generiert (3.3.6.1), die in die RT-qPCR mit mausspezifischen Importin- α Primern (2.13.3) eingesetzt wurde. Die nach relativer Quantifizierung und Auswertung (3.3.6.3) erhaltenen Daten zeigten, dass die Importin- α Isoformen in der Maus differenziell und organspezifisch exprimiert werden (Abb. 21). Importin- $\alpha 3$ besaß in der gesamten Lunge die höchsten mRNA-Expressionslevel (3,5-fach erhöhte Expression im Vergleich zu Importin- $\alpha 1$; Abb. 21A). Im Gehirn der Maus waren die Importin- $\alpha 4$ und - $\alpha 5$ Isoformen am stärksten exprimiert (4,2 - bis 4,5-fach erhöhte Expression im Vergleich zu Importin- $\alpha 1$; Abb. 21B). Auch die mRNA-Expressionslevel der Importin- $\alpha 3$ und - $\alpha 7$ Isoformen waren im Gehirn im Vergleich zu Importin- $\alpha 1$ erhöht (3,8 - bzw. 2,3-fach). In der Milz wurden etwa doppelt so hohe Importin- $\alpha 1$ und - $\alpha 3$ mRNA-Expressionslevel wie die von Importin- $\alpha 4$, - $\alpha 5$ und - $\alpha 7$ detektiert (Abb. 21C). Die Importin- $\alpha 1$, - $\alpha 3$ und - $\alpha 4$ mRNA-Expressionslevel in der Leber waren ebenfalls etwa doppelt so hoch im Vergleich zu Importin- $\alpha 5$ und - $\alpha 7$ (Abb. 21D).

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass die Lunge das einzige Organ war, in dem ausschließlich die Importin- $\alpha 3$ mRNA-Expressionslevel im Vergleich zu den restlichen Isoformen deutlich erhöht waren. Außerdem wurde aus den Ergebnissen deutlich, dass die gemessenen Werte für die Importin- $\alpha 3$ Isoform in einigen Organen, wie z.B. der Lunge und dem Gehirn (Abb. 21A bzw. B), eine größere Streuung als in anderen Organen aufweisen (Milz oder Leber, Abb. 21C bzw. D). Dies könnte auf eine größere Varianz bei der Expression der Importin- $\alpha 3$ Isoform in verschiedenen Individuen hindeuten.

Die gewonnenen Daten zeigen eindrucksvoll, dass die Importin- α Isoformen in den verschiedenen Mausorganen eine differenzielle Expression auf mRNA-Ebene aufweisen. In den folgenden Versuchen sollte die Importin- α Expression im oberen (ORT) und unteren Respirationstrakt (URT) des Säugers, und damit dem Hauptort der Influenzavirus Replikation, analysiert werden (4.4).

4.4 Importin- α Isoformen im Respirationstrakt des Säugers

Während der Adaptation von HPAIV an den Säuger findet ein *Switch* von Importin- $\alpha 3$ zu Importin- $\alpha 7$ Abhängigkeit statt (Gabriel *et al.*, 2011). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob potenziell unterschiedliche Importin- α Expressionslevel im Respirationstrakt des Säugers einen Selektionsdruck für den folgenden *Switch* in der Importin- α Nutzung darstellen könnten. Diese Hypothese basiert darauf, dass eine zelltypabhängige Importin- α Expression beobachtet wurde (Köhler *et al.*, 2002; Miyaura *et al.*, 1985; Murao *et*

al., 1983; Suzuki *et al.*, 2008; 2006). Im Folgenden sollten potenzielle Unterschiede in den Importin- α Expressionsleveln im Respirationstrakt des Säugers nachgewiesen werden. Hierdurch könnte der Selektionsdruck, der möglicherweise dem *Switch* in der Importin- α Nutzung zugrunde liegt, bestimmt werden. Daher wurde das Vorkommen der Importin- α Isoformen immunhistochemisch im oberen (ORT) und unteren Respirationstrakt (URT) des Säugers untersucht (4.4.1). Weiterhin wurden die Importin- α mRNA-Expressionslevel des ORTs und URTs bestimmt (4.4.2). Der murine URT wurde dabei zusätzlich in Bronchialepithel und Alveolargewebe dissektiert, um die verschiedenen Gewebe in Hinblick auf die vorherrschenden Importin- α mRNA-Expressionsleveln zu untersuchen (4.4.2).

4.4.1 Importin- α Vorkommen im Respirationstrakt des Säugers

Das Vorkommen der verschiedenen Importin- α Isoformen im murinen und humanen Respirationstrakt wurde als Erstes mittels immunhistochemischer Analysen untersucht. Formalinfixierte, paraffineingebettete (FFPE) Gewebeschnitte des ORT und URT wurden immunhistochemisch mit Importin- α isoformspezifischen Antikörpern gefärbt. Hierbei wurde ein Fokus auf die Importine $\alpha 1$, $\alpha 3$ und $\alpha 7$ gelegt, da diese Isoformen bei der Adaptation an den Säuger eine wichtige Rolle spielen, während Importin- $\alpha 4$ und - $\alpha 5$ keinen Einfluss haben (Gabriel *et al.*, 2011; Hudjetz und Gabriel, 2012). Die Spezifität der verwendeten Antikörper wurde mit Hilfe von spezifischen Blockingpeptiden für jede Isoform bestätigt (siehe 2.16). Sowohl bei Peptidkonzentrationen von 2 $\mu\text{g/ml}$, als auch 20 $\mu\text{g/ml}$, traten keine unspezifischen Signale auf (Daten nicht gezeigt). Für den verwendeten Importin- $\alpha 7$ Antikörper war zudem bekannt, dass er mit der Importin- $\alpha 5$ Isoform kreuzreagiert (Gabriel *et al.*, 2011). Die drei untersuchten Importin- α Isoformen $\alpha 1$, $\alpha 3$ und $\alpha 7$ zeigten sowohl im humanen als auch im murinen Respirationstrakt eine ausgedehnte Expression (Abb. 22 und Abb. 23). Die Epithelzellen des humanen und murinen Respirationstraktes, einschließlich der Zellkerne des Bronchialepithels, waren für alle getesteten Importin- α Isoformen antigenpositiv. Die Zellkerne des Alveolargewebes und der alveolären Makrophagen beider Spezies zeigten ebenfalls positive Signale (Abb. 22 und Abb. 23). Tendenziell wiesen sowohl murine als auch humane Epithelzellen des Alveolargewebes mehr antigenpositive Bereiche für Importin- $\alpha 3$ und Importin- $\alpha 5/7$ auf, als für Importin- $\alpha 1$. Im Allgemeinen wurden in den Epithelzellen des Respirationstraktes mehr Importin- α positive Signale detektiert, als in den Basalzellen. Eine quantitative Aussage hinsichtlich der Importin- α Expressionslevel im Respirationstrakt des Säugers ist mit dieser Methode nicht möglich, da verschiedene Antikörperaffinitäten eine direkte Quantifizierung ausschließen.

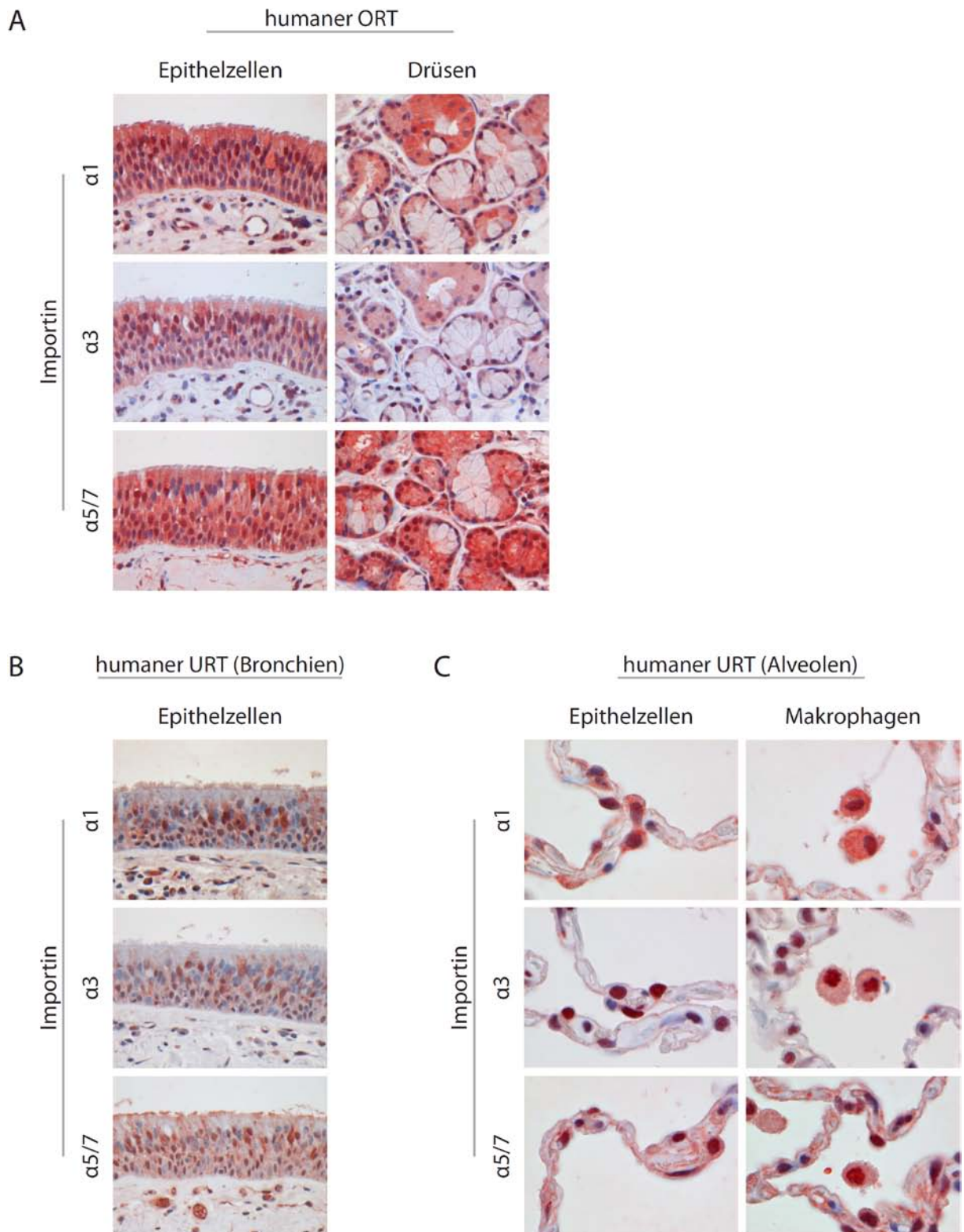


Abb. 22: Importin- α Expression im humanen Respirationstrakt. Biopsiematerial des humanen oberen (ORT, Nasenmuschel, A) und unteren Respirationstraktes (URT, Bronchien und Alveolen, B bzw. C) wurden zur Herstellung formalinfixierter, paraffineingebetteter (FFPE) Gewebeschnitte verwendet. Importin- $\alpha 1$, - $\alpha 3$ oder - $\alpha 5/7$ wurden immunhistochemisch mittels Importin- α isoformspezifischen Antikörpern gefärbt (2.14, 3.6.5). Die Detektion erfolgte mit einem Peroxidase-konjugierten Avidin-Biotin-Komplex Reaktionssystem und dem HRP-Substrat AEC (DAKO). Importin- α antigenpositive Zellen sind rot angefärbt. Der Importin- $\alpha 7$ Antikörper kreuzreagiert mit der Importin- $\alpha 5$ Isoform. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun. Für die Aufnahme der Bilder wurde ein Lichtmikroskop bei 200-facher (A, B) bzw. 400-facher (C) Auflösung verwendet.

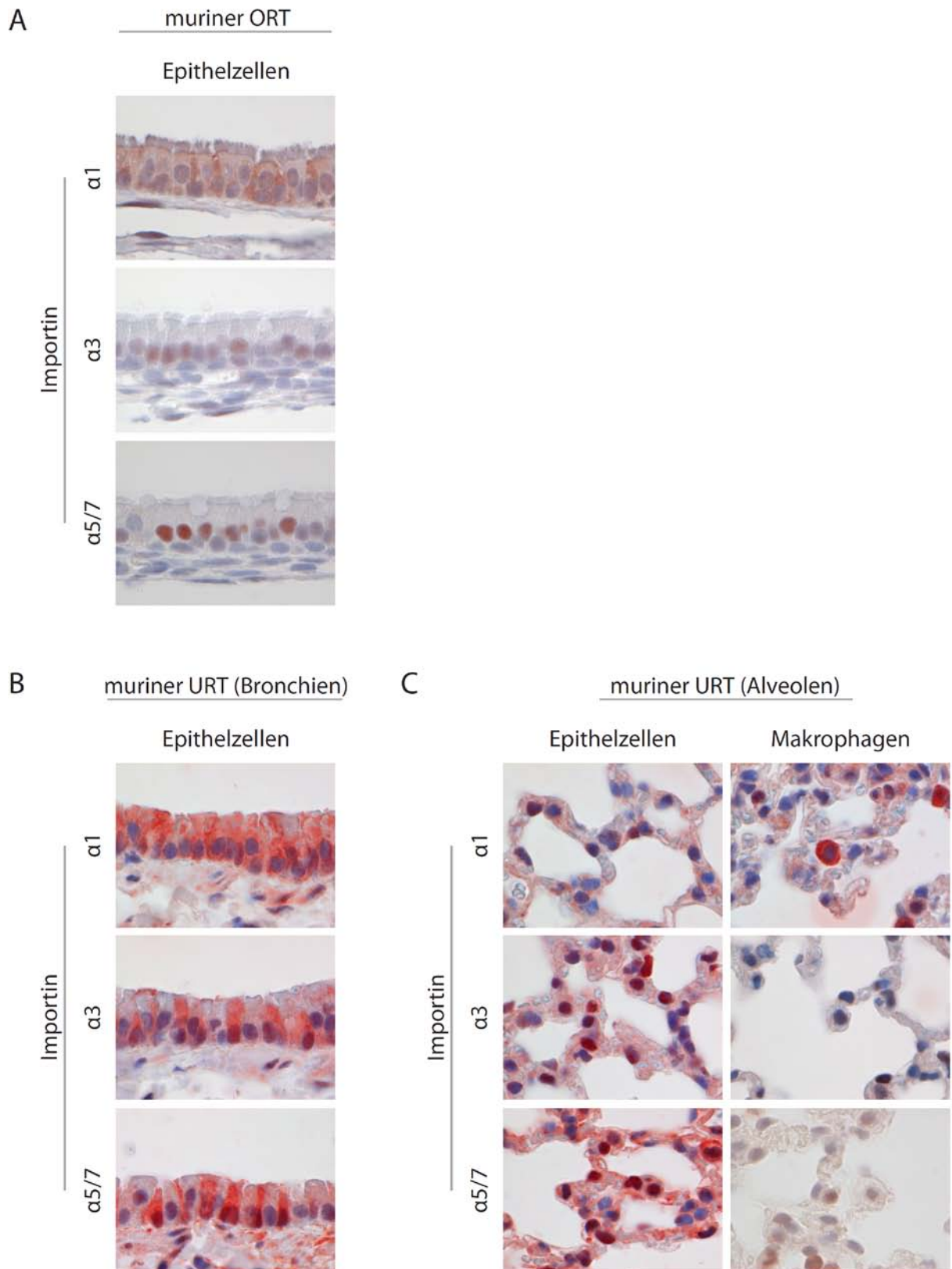


Abb. 23: Importin- α Expression im murinen Respirationstrakt. Gewebe des murinen oberen (URT, Nasenmuschel, A) und unteren Respirationstraktes (URT, Bronchien und Alveolen, B bzw. C) wurden zur Herstellung formalinfixierter, paraffineingebetteter (FFPE) Gewebeschnitte verwendet. Importin- $\alpha 1$, - $\alpha 3$ oder - $\alpha 5/7$ wurden immunhistochemisch mittels Importin- α isoformspezifischen Antikörpern gefärbt (2.14, 3.6.5). Die Detektion erfolgte mit einem Peroxidase-konjugierten Avidin-Biotin-Komplex Reaktionssystem und dem HRP-Substrat AEC (DAKO). Importin- α antigenpositive Zellen sind rot angefärbt. Der Importin- $\alpha 7$ Antikörper kreuzreagiert mit der Importin- $\alpha 5$ Isoform. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun. Für die Aufnahme der Bilder wurde ein Lichtmikroskop bei 400-facher Auflösung verwendet.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Importin- α Isoformen in den für die Influenzavirus Infektion primär relevanten Geweben und Organen des Säugers in hohem Maße präsent sind. Sie könnten somit einen wichtigen Einfluss auf die Replikationseigenschaften von Influenzaviren im Respirationstrakt ausüben. Um zusätzlich Aufschluss über die Importin- α mRNA-Expressionslevel in verschiedenen Zelltypen des humanen und murinen Respirationstraktes zu erlangen, wurde dies mittels quantitativer *Real-time* PCR untersucht (4.4.2).

4.4.2 Importin- α mRNA-Expressionslevel im oberen und unteren Respirationstrakt des Säugers

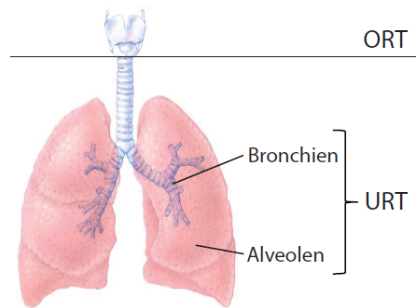
Für ein besseres Verständnis des Selektionsdrucks, der dem *Switch* in der Importin- α Nutzung von $\alpha 3$ - zu $\alpha 7$ -Abhängigkeit zugrunde liegen könnte, wurde die Verteilung der Importin- α Isoformen im oberen (ORT) und unteren Respirationstrakt (URT) des Säugers bestimmt. Zusätzlich sollte festgestellt werden, ob das Tiermodell der Maus in Bezug auf das Importin- α Expressionsmuster im Respirationstrakt die Situation im Menschen adäquat widerspiegelt. Falls ja, würde dies die Nutzung der Maus als Modellorganismus zum Studium der Importine- α in dieser Arbeit rechtfertigen. Die Importin- α mRNA-Expressionslevel der einzelnen Isoformen wurden analog zu 4.3.2 im humanen und murinen Respirationstrakt mittels RT-qPCR bestimmt. Hierbei wurden zudem die Gewebe des ORT und URT getrennt voneinander betrachtet, um festzustellen, ob räumliche Unterschiede in den Importin- α Expressionsmustern innerhalb des Respirationstraktes vorherrschen. Für den murinen URT (C57BL/6-Stamm) wurden zusätzlich noch das Bronchialepithel und das Alveolargewebe der Lunge nach erfolgter Mikrodissektion getrennt voneinander analysiert.

Sowohl im humanen ORT (Nasenmuschel), als auch im URT (hauptsächlich Alveolargewebe) wies Importin- $\alpha 3$ die stärksten mRNA-Expressionslevel mit etwa 5-fach höheren relativen Werten als Importin- $\alpha 1$ auf (Abb. 24). Insbesondere im humanen ORT (Abb. 24B) zeigte sich zudem eine 2,5-fache Erhöhung der Importin- $\alpha 7$ mRNA-Expressionslevel, welche sich, wenn auch in geringerem Ausmaß, signifikant im URT widerspiegelte (Abb. 24C). Die anderen Isoformen zeigten im Vergleich zu Importin- $\alpha 1$ keine signifikanten Unterschiede in ihren Expressionsleveln.

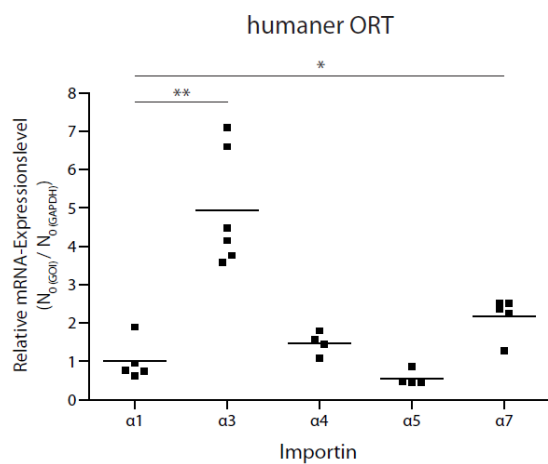
In allen untersuchten Bereichen des murinen Respirationstraktes wies ebenfalls Importin- $\alpha 3$ die höchsten Expressionslevel auf (etwa 3,5-fach erhöht im Vergleich zu Importin- $\alpha 1$; Abb. 25). Der murine ORT und auch das Alveolargewebe des murinen URTs zeigten ebenfalls signifikant erhöhte Importin- $\alpha 7$ mRNA Expressionslevel (Abb. 25B bzw. D). Vergleichbar mit den Daten für den humanen Respirationstrakt (Abb. 24) waren diese im ORT höher als im Alveolargewebe (Abb. 25B und D: 2,5-fach bzw. 1,8-fach erhöht). Zusätzlich waren die

mRNA-Expressionslevel von Importin- α 4 und - α 5 im murinen ORT signifikant um das 1,5-fache erhöht.

A



B



C

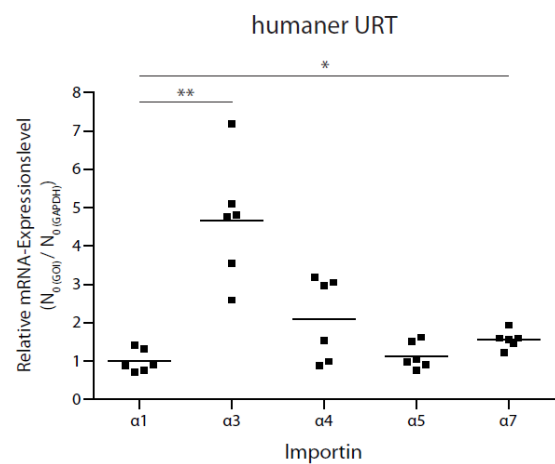


Abb. 24: Importin- α mRNA-Expressionslevel des humanen Respirationstraktes. (A) stellt die Unterteilung des Respirationstraktes in oberen (ORT) und unteren Respirationstrakt (URT) schematisch dar (modifiziert nach http://cdn.comluv.com/wp-content/uploads/2011/11/healthy_lung.jpg). Gesamt-RNA wurde aus Biopsieproben des humanen ORTs (Nasenschleimhaut, B) und URTs (hauptsächlich Alveolargewebe, C) aus gesunden Spendern isoliert. Hieraus generierte cDNA wurde in eine quantitative *Real-time* PCR (RT-qPCR) mit humanspezifischen Importin- α Primern zur Bestimmung der Importin- α mRNA-Expressionslevel eingesetzt. Die Importin- α Expressionslevel wurden gegen die detektierten GAPDH-Expressionslevel normalisiert und die relativen Werte der Importin- α 1 Isoform als Referenz gleich 1 gesetzt. Für die Werte des ORTs wurden z.T. Duplettmessungen durchgeführt, während im URT jeder Datenpunkt einen individuellen Biopsiedonor repräsentiert. Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Kruskal-Wallis *One-Way Analysis of Variance*-Tests ermittelt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die Importin- α 3 Isoform, welche die Polymeraseaktivität inhibitorisch reguliert, eine hohe Expression im humanen und murinen Respirationstrakt aufweist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die proliferative Importin- α 7 Isoform die am zweithöchsten exprimierte Isoform nach Importin- α 3 sowohl im humanen als auch im murinen Respirationstrakt darstellt.

Eine alternative Darstellung der erhaltenen Daten lieferte zusätzliche Erkenntnisse der Importin- α mRNA-Expression des murinen Respirationstraktes. In dieser wurde die mRNA-Expression jeder Isoform in den verschiedenen Geweben des Respirationstraktes gesondert betrachtet. Dabei wurden die relativen Werte des ORTs als Referenz jeweils

gleich 1 gesetzt. Hier konnte festgestellt werden, dass die fünf untersuchten Importin- α Isoformen vom ORT zum URT hin alle einen Anstieg ihrer Expressionslevel aufwiesen (Abb. 26). Dabei zeigten alle Isoformen, bis auf Importin- α 7, im Bronchialepithel des URT eine um etwa 3-fach erhöhte Expression im Vergleich zum ORT. Die Importin- α 7 mRNA-Expression wies hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen dem ORT und dem Bronchialepithel auf (Abb. 26E). Weiterhin waren die Importin- α Expressionslevel der untersuchten Isoformen im Alveolargewebe um das 5- bis 6-fache im Vergleich zu denen des ORTs erhöht.

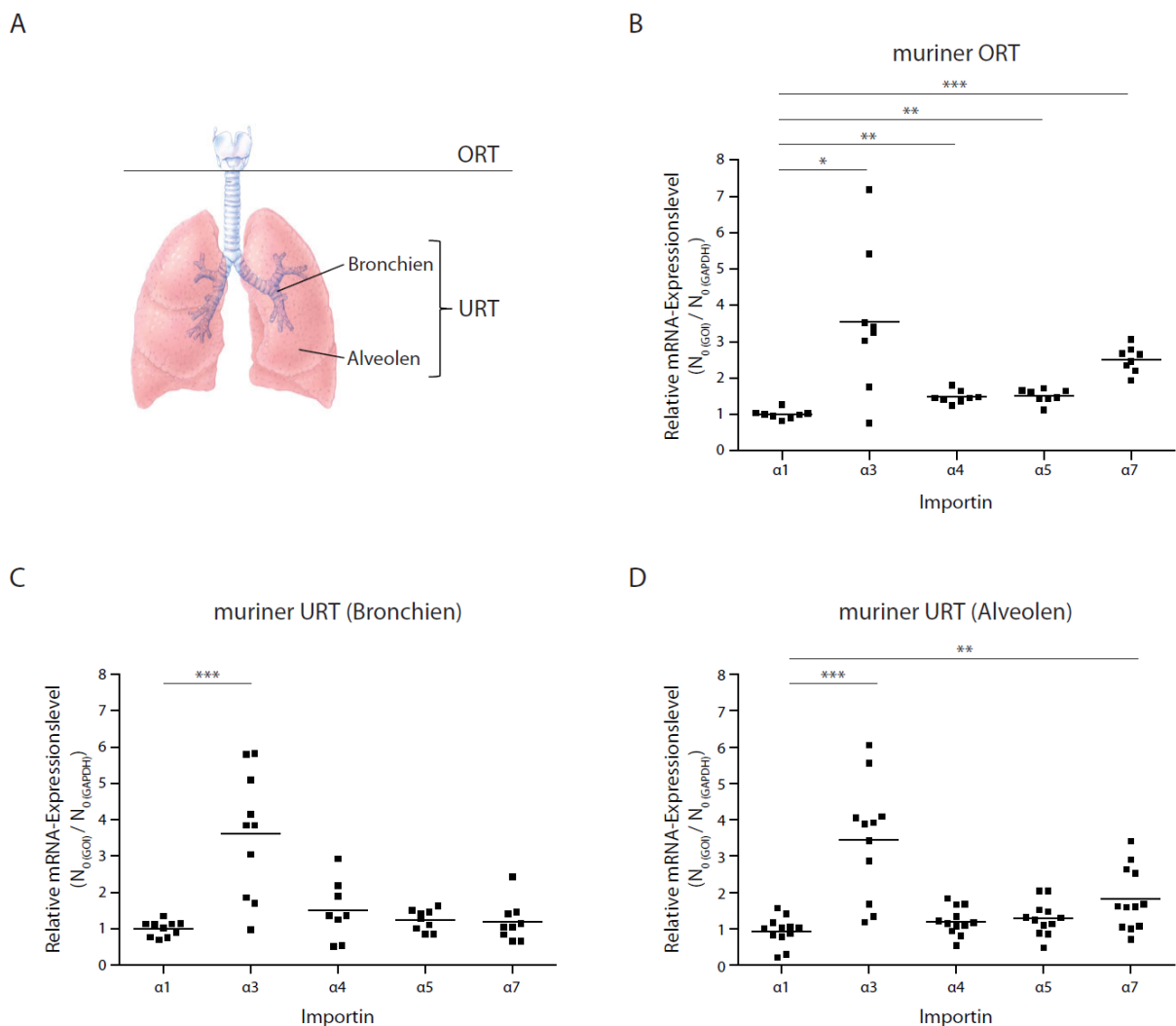


Abb. 25: Importin- α mRNA-Expressionslevel des murinen Respirationstraktes. (A) stellt die Unterteilung des Respirationstraktes in oberen (ORT) und unteren Respirationstrakt (URT) schematisch dar (modifiziert nach http://cdn.comlucv.com/wp-content/uploads/2011/11/healthy_lung.jpg). Gesamt-RNA wurde aus der Nasenmuschel des murinen ORTs (B) isoliert oder aus dem Bronchialepithel und Alveolargewebe des murinen URTs mittels *Laser Microbeam* Mikrodisektion (LMM) gewonnen und isoliert (C bzw. D). Nach cDNA-Generierung wurden die Importin- α mRNA-Expressionslevel mit mausspezifischen Importin- α Primern in einer quantitativen *Real-time* PCR (RT-qPCR) bestimmt. Die Importin- α Expressionslevel wurden gegen die detektierten GAPDH-Expressionslevel normalisiert und die relativen Werte der Importin- α 1 Isoform als Referenz gleich 1 gesetzt. Jeder Datenpunkt repräsentiert eine individuelle Organprobe/Maus. Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Kruskal-Wallis *One-Way Analysis of Variance*-Tests ermittelt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Für den humanen Respirationstrakt lieferte diese alternative Auswertung, u.a. aufgrund der unterschiedlichen Ausgangsmaterialien für die Gesamt-RNA Isolierung (FFPE-Gewebeschnitte für den ORT bzw. *RNAlater* fixierte Lungenbiopsien für den URT) und stark voneinander abweichenden *ct*-Werten des Referenztranskriptes GAPDH im ORT und URT, keine zuverlässigen Daten.

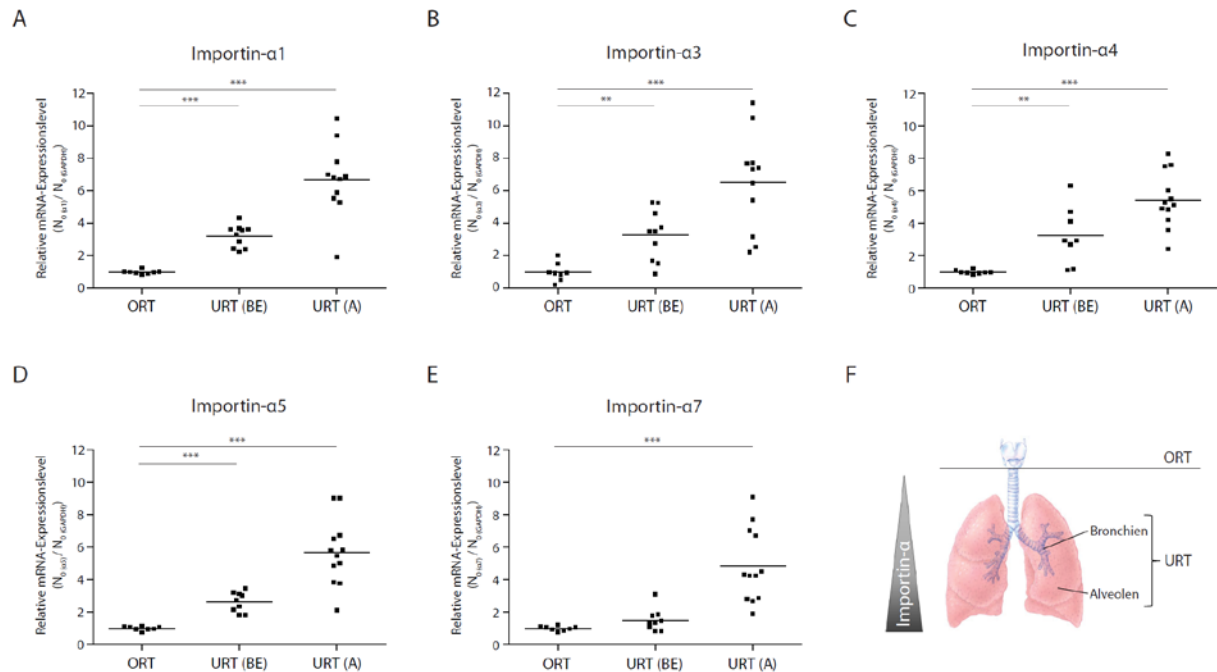


Abb. 26: Vergleich der Importin- α mRNA-Expression im ORT und URT des murinen Respirationstraktes. Gesamt-RNA wurde aus der Nasenmuschel des murinen oberen Respirationstraktes (ORT) isoliert oder aus dem Bronchialepithel (BE) und Alveolargewebe (A) des murinen unteren Respirationstraktes (URT) mittels *Laser Microbeam* Mikrodisektion (LMM) gewonnen und isoliert. Nach cDNA-Generierung wurden die Importin- α mRNA-Expressionslevel mit mausspezifischen Importin- α Primern in einer quantitativen *Real-time* PCR (RT-qPCR) bestimmt. Die Importin- α Expressionslevel wurden gegen die detektierten GAPDH-Expressionslevel normalisiert und jeweils der relative Wert von Importin- α 1 (A), α 3 (B), α 4 (C), α 5 (D) bzw. α 7 (E) im murinen ORT als Referenz gleich 1 gesetzt. Jeder Datenpunkt repräsentiert eine individuelle Organprobe/Maus. (F) stellt die Unterteilung des Respirationstraktes in ORT und URT und die vom ORT zum URT ansteigenden Importin- α Expressionslevel schematisch dar (modifiziert nach http://cdn.comluv.com/wp-content/uploads/2011/11/healthy_lung.jpg). Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des *Kruskal-Wallis One-Way Analysis of Variance*-Tests ermittelt (** p < 0,01, *** p < 0,001).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die verschiedenen Isoformen nicht nur ein differenzielles Expressionsmuster in einem bestimmten Gewebe aufweisen, sondern, dass auch jede einzelne Isoform differenziell innerhalb der verschiedenen Bereiche des murinen Respirationstraktes exprimiert wird. Interessant dabei ist, dass sie alle die niedrigste Expression im ORT und die stärkste Expression im Alveolargewebe des URTs aufweisen. Dies deutet daraufhin, dass in der hohen Expression sowohl der negativ regulatorischen Importin- α 3 Isoform, als auch der proliferativen Importin- α 7 Isoform im Alveolargewebe der selektive Druck bei der Wirtsadaptation hier ebenfalls am höchsten sein könnte.

Weiterhin stellt die Maus aufgrund der hohen Ähnlichkeit des humanen und murinen Respirationstraktes hinsichtlich der Importin- α mRNA-Expressionslevel somit ein adäquates

Modell dar, um deren Einfluss auf die Replikation von Influenzaviren in der Lunge zu studieren.

4.4.3 Importin- α mRNA-Expressionslevel in der murinen Lunge nach Infektion mit aviärem und säugeradaptiertem HPAIV H7N7

Weiterhin war es von großem Interesse zu untersuchen, ob die Importin- α Isoformen *in vivo* bei einer Infektion mit Influenzaviren in ihrem natürlichen Expressionsmuster dysreguliert werden. Nachdem *in vitro* im Zellkulturmodell nachgewiesen wurde, dass die Influenzavirus Infektion je nach Adaptationsgrad des Virus in einer differenziellen Regulierung der Importin- α 3 Proteinexpression resultiert (siehe 4.1), sollte dies auch genauer im Mausmodell untersucht werden. Hierbei war es insbesondere interessant, ob ein noch nicht adaptiertes HPAIV und ein schon säugeradaptiertes Virus unterschiedliche Effekte auf die Expression der Importin- α Isoformen ausüben. In dieser Arbeit wurden die rekombinanten SC35 (H7N7) und SC35M (H7N7) Viren verwendet, welche als Modellviren für das Studium der Säugeradaptation eines HPAIV beschrieben wurden (siehe 1.1.9; Gabriel *et al.*, 2005). Dazu wurden Wildtyp C57BL/6-Mäuse intranasal mit dem aviären SC35 bzw. der mausadaptierten SC35M-Variante infiziert, während der Kontrollgruppe PBS verabreicht wurde. Die verwendete Virusdosis entsprach der 100-fachen Maus-letalen Dosis 50 (MLD₅₀) von SC35M (bestimmt in BALB/c-Mäusen; Gabriel *et al.*, 2005). Die detaillierte Durchführung der Experimente ist in Kapitel 3.7 beschrieben. An Tag 1 und 3 nach der Infektion wurden perfundierte Organe zur Bestimmung der Virustiter und der Importin- α mRNA-Expressionslevel entnommen. Es wurden perfundierte Organe verwendet, um eine Verfälschung der Resultate durch vorhandene Blutzellen im Lungengewebe zu vermeiden und nur das Lungengewebe zu analysieren. Aus den perfundierten ganzen Lungen wurde Gesamt-RNA isoliert (3.3.3.2) und nach cDNA-Generierung (3.3.6.1) in die mausspezifische Importin- α RT-qPCR eingesetzt (3.3.6.2). Die Virustiter in den entnommenen Organen wurden mittels Plaquetest bestimmt (3.5.3 und 3.7.3-3.7.5).

Bei der Analyse der Daten wurde festgestellt, dass die Importin- α mRNA-Expressionslevel in den Lungen PBS-behandelter Kontrollmäuse einen Tag nach intraperitonealer Narkose und PBS-Behandlung dysreguliert waren (Abb. 27A). Durch die erfolgte Behandlung waren alle Importin- α Isoformen auf etwa das Niveau der Importin- α 1 Isoform herabreguliert (Abb. 27A). 3 Tage nach Narkose und PBS-Behandlung hatte das Importin- α Expressionsmuster in den PBS-behandelten Kontrolllungen (Abb. 27A) jedoch wieder die Ausgangswerte der Lungen der narkotisierten und unmittelbar perfundierten Mäusen erreicht (Importin- α 3: 3,5-fach erhöht; vgl. Abb. 21A). Die Importin- α 3 Isoform war 3 d.p.i. mit ca. 4-fach erhöhten Expressionsleveln gegenüber Importin- α 1 wieder die am stärksten exprimierteste Isoform in der uninfizierten, murinen Lunge.

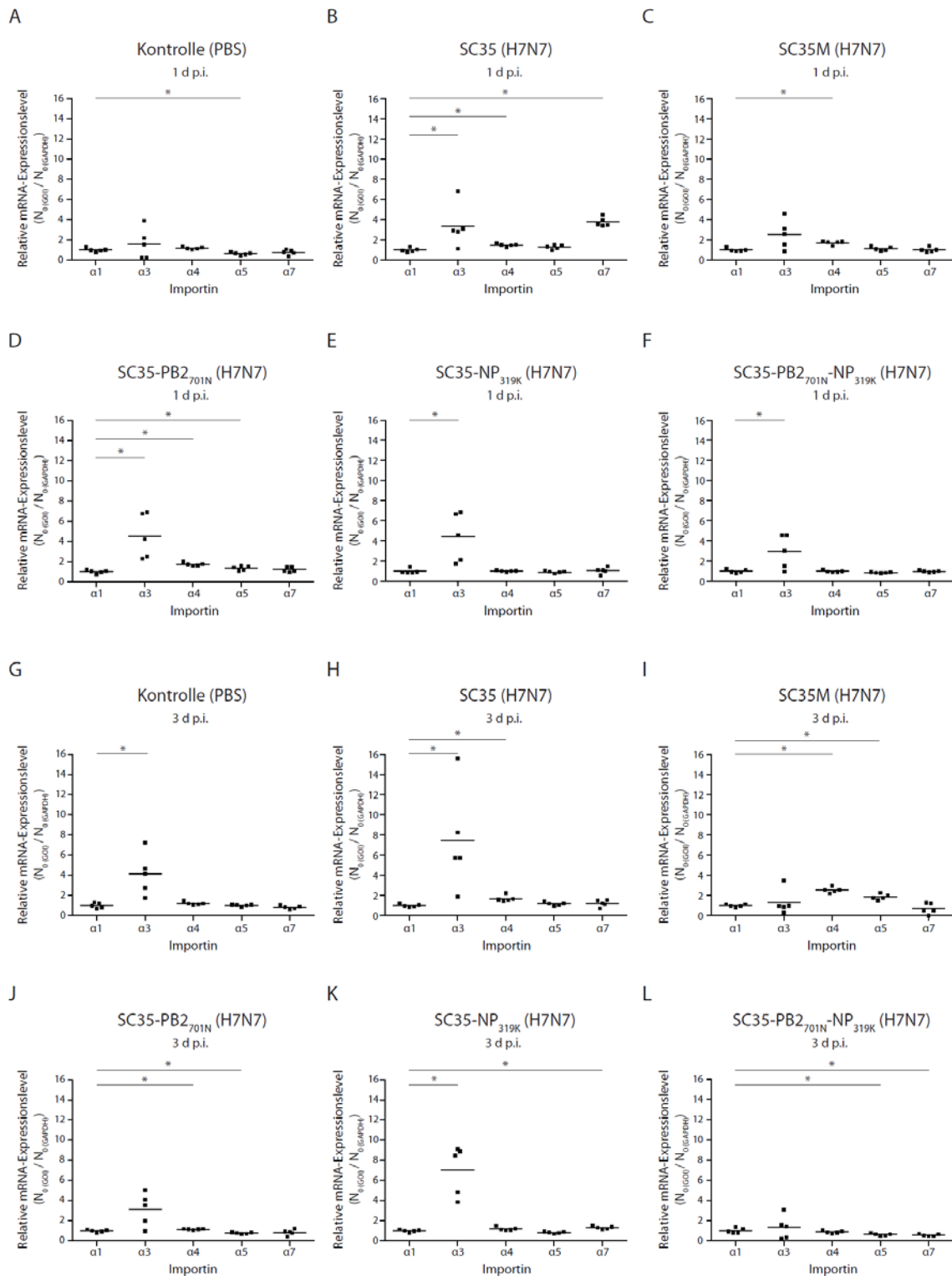


Abb. 27: Importin- α mRNA-Expressionslevel in der murinen Lunge nach Infektion mit H7N7-Viren. C57BL/6-Mäuse wurden intranasal mit $6 \cdot 10^4$ p.f.u. (100-fache MLD₅₀ von SC35M in BALB/c) des aviären SC35 (H7N7, B, H), des mausadaptierten SC35M (C, I), der Einzelpunktmutanten SC35-PB2_{701N} (D, J), SC35-NP_{319K} (E, K) bzw. der Doppelmutante SC35-PB2_{701N}-NP_{319K} (F, L) infiziert. An Tag 1 und 3 p.i. wurde Gesamt-RNA aus der gesamten Lunge infizierter (B-F bzw. H-L) oder PBS-behandelter Kontrollmäuse (A bzw. G) isoliert. Nach cDNA-Generierung wurden die Importin- α mRNA Expressionslevel der infizierten Mauslungen mit mausspezifischen Importin- α Primern in einer quantitativen *Real-time* PCR (RT-qPCR) bestimmt. Die Importin- α Expressionslevel wurden dabei gegen die detektierten GAPDH-Expressionslevel normalisiert und die relativen Werte der Importin- α Isoform als Referenz gleich 1 gesetzt. Jeder Datenpunkt repräsentiert eine individuelle Organprobe/Maus. Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Kruskal-Wallis *One-Way Analysis of Variance*-Tests ermittelt (* $p < 0,05$).

Auch in den infizierten Lungen war ein Unterschied der Importin- α Expressionslevel zwischen den beiden Organentnahmezeitpunkten sichtbar. Im Gegensatz zu den PBS-behandelten Lungen waren die Importin- α 3 mRNA-Expressionslevel in den 1 d.p.i. entnommenen Lungen SC35- oder SC35M-infizierter Mäuse im Vergleich zu Importin- α 1 um das 3,5- bzw. 2,8-fache erhöht (Abb. 27B bzw. C). Dies war vergleichbar mit der Importin- α 3 Expression der Kontrolllungen an Tag 3 p.i. (Abb. 27G). Auffällig war, dass die Importin- α 7 Expressionslevel in den SC35-infizierten Lungen an Tag 1 p.i. signifikant auf 3,8-fache Werte erhöht waren (Abb. 27B), was an Tag 3 p.i. jedoch nicht zu beobachten war. Dafür zeigte sich an Tag 3 p.i. zwischen den SC35- und SC35M-infizierten Lungen ein gewaltiger Unterschied in der Importin- α 3 Expression: Die Infektion mit SC35 führte in der Mauslunge zu einem weiteren Anstieg der Importin- α 3 mRNA-Expressionslevel von 4-fach auf 7-fach erhöhte Expression im Vergleich zu der nicht-infizierten Kontrollgruppe (Abb. 27G bzw. H). Interessanterweise hatte die Infektion mit SC35M einen gegenteiligen Effekt: Eine Infektion mit SC35M führte 3 Tage nach der Infektion zu stark, bis auf das Niveau der Importin- α 1 Isoform, herabregulierten Importin- α 3 mRNA Expressionsleveln. Gleichzeitig waren die Importin- α 4 und - α 5 Werte signifikant um das 2,5- bzw. 2-fache erhöht im Vergleich zu Importin- α 1 (Abb. 27I). Damit ließ sich die *in vitro* beobachtete und durch die Influenzavirus Infektion hervorgerufene, differenzielle Regulierung der Importin- α 3 Expression auf Proteinebene (4.1) auch *in vivo* im Mausmodell auf mRNA-Ebene bestätigen.

Um herauszufinden, welche wirtsadaptiven Mutationen für diese Effekte verantwortlich sind, wurden Wildtyp C57BL/6-Mäuse intranasal mit Virusmutanten im SC35-Hintergrund infiziert, die die säugeradaptiven Signaturen PB2 701N und/oder NP 319K besitzen. Es wurden Infektionsdosen der Einzelpunktmutanten SC35-PB2_{701N}, SC35-NP_{319K} bzw. der Doppelmutante SC35-PB2_{701N}-NP_{319K} verwendet, die der 100-fachen MLD₅₀ von SC35M entsprachen (Gabriel *et al.*, 2005, bestimmt in BALB/c-Mäusen). Für die Doppelpunktmutante SC35-PB2_{701N}-NP_{319K} konnte schon gezeigt werden, dass die Kombination dieser wirtsadaptiven Mutationen sowohl verantwortlich für die erhöhte Polymeraseaktivität, als auch für die erhöhte Virulenz und Pathogenität von SC35M im Mausmodell ist (Gabriel *et al.*, 2005). Weiterhin vermitteln diese beiden wirtsadaptiven Mutationen in Kombination bei der Adaptation den *Switch* in der Importin- α Abhängigkeit von der α 3- zur α 7-Isoform (Gabriel *et al.*, 2011) und tragen zu einer generell erhöhten Bindung an die humanen Importin- α Isoformen *in vitro* bei (Gabriel *et al.*, 2008; 2011). Die Importin- α mRNA-Expressionslevel in den infizierten Lungen wurden wieder an Tag 1 und 3 nach Infektion bestimmt. Dabei wiesen die mit den Einzelpunktmutanten infizierten Lungen (Abb. 27D und E) an Tag 1 p.i. etwas höhere Importin- α 3 Expressionslevel auf (4,5-fach), als die mit der Doppelmutante infizierten Lungen (2,5-fach; Abb. 27F). An Tag 3 p.i. zeigten sich

hingegen große Unterschiede zwischen den Importin- α 3 Expressionsleveln der drei Mutanten: Mit der PB2-Mutante SC35-PB2_{701N} infizierte Lungen (Abb. 27J) zeigten um etwa 3-fach erhöhte, und damit zu den PBS-behandelten Kontrolllungen (Abb. 27G) vergleichbare, Importin- α mRNA-Expressionslevel. Der Effekt der NP-Mutante SC35-NP_{319K} auf die Importin- α Expressionslevel in der murinen Lunge an Tag 3 der Infektion (Abb. 27K) war vergleichbar mit dem des aviären SC35 Virus (Abb. 27H). Beide Viren führten zu einer signifikanten Erhöhung der Importin- α 3 Level um etwa das 7-fache im Vergleich zur Importin- α 1 Isoform. Da bei keiner der Einzelpunktmutanten der stark herabregulierende Effekt des SC35M Virus zu verzeichnen war, wurden WT C57BL/6-Mäuse zusätzlich mit der SC35-PB2_{701N}-NP_{319K}-Mutante infiziert, die die beiden wirtsadaptiven Mutationen in Kombination besitzt. Die Importin- α 3 mRNA Expressionslevel in Lungen von Mäusen, die mit dieser rekombinanten Doppelmutante infiziert worden waren, waren 3 Tage p.i. signifikant herabreguliert (Abb. 27L) und vergleichbar mit den 3 Tage p.i. bestimmten Importin- α 3 Leveln in SC35M-infizierten Lungen (Abb. 27I).

Damit konnte in dieser Arbeit nun zusätzlich gezeigt werden, dass die wirtsadaptiven Mutationen PB2 701N und NP 319K die Herabregulierung der Importin- α 3 mRNA-Expressionslevel in der infizierten Mauslunge vermitteln (Abb. 27L).

4.4.4 Korrelation der Importin- α mRNA-Expressionslevel der infizierten Lunge mit dem Organotropismus der H7N7-Viren in der Maus

Des Weiteren sollte untersucht werden inwieweit die differenzielle Dysregulierung der Importin- α 3 mRNA-Expressionslevel den Verlauf der Influenzavirus Infektion und den Organotropismus der verschiedenen Viren beeinflusst oder bedingt. Hierfür wurden die perfundierten Organe (Lunge, Trachea, Leber, Milz, Gehirn) der in 4.4.3 mit SC35, SC35M, den beiden Einzelpunktmutanten oder der Doppelmutante infizierten Tiere entnommen. Der Virustiter der Organhomogenisate (3.7.5) wurde mittels Plaquetest auf MDCK-Zellen bestimmt (3.5.3). Die Organe für die Virustiterbestimmung stammten dabei aus denselben infizierten Mäusen, deren infizierte Lungen für die Bestimmung der Importin- α mRNA-Expressionslevel verwendet worden waren. Daher konnte ein direktes Korrelat zwischen dem Organotropismus und der Importin- α 3 Dysregulierung gebildet werden. In den hier verwendeten WT C57BL/6-Mäusen blieb die Infektion mit SC35, wie bereits vorher für BALB/c-Mäuse beschrieben (Gabriel *et al.*, 2005; Scheiblaue *et al.*, 1995), auf den Respirationstrakt beschränkt (Abb. 28B). Im Gegensatz dazu führte die Infektion mit SC35M sehr früh nach der Infektion (1 d p.i.), ebenfalls wie vorher für BALB/c-Mäuse beschrieben, zu einer systemischen Infektion (Abb. 28C). Die Infektionen mit den Einzelpunktmutanten SC35-PB2_{701N} (Abb. 28D), SC35-NP_{319K} (Abb. 28E) bzw. der Doppelmutante SC35-PB2_{701N}-NP_{319K} (Abb. 28F) führten spätestens an Tag 3 p.i. zu einer systemischen Infektion der

C57BL/6-Maus, im Gegensatz zur SC35 Infektion (Abb. 28B). Die SC35-NP_{319K}-Mutante mit der niedrigsten Virulenz ($\log_{10}\text{MLD}_{50} >6,0$) zeigte in dieser Studie die niedrigsten Virustiter und an Tag 1 p.i. noch keine systemische Infektion.

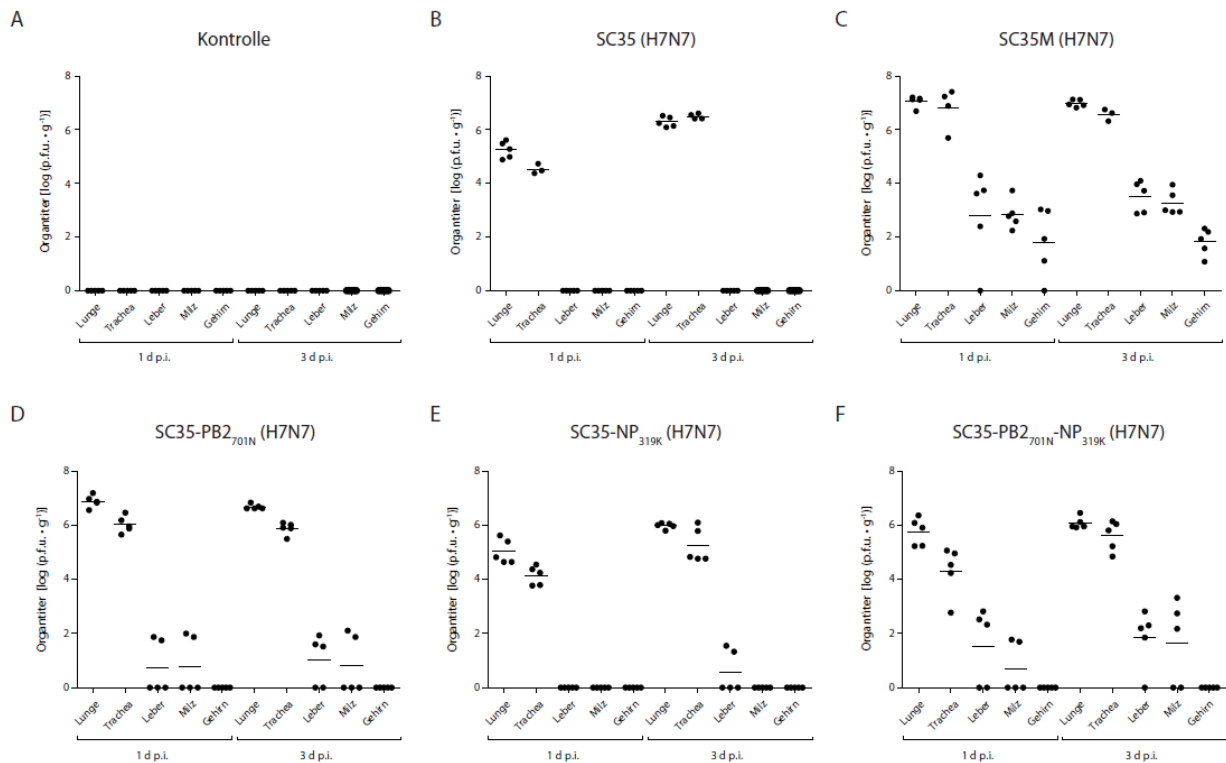


Abb. 28: Organotropismus von H7N7-Viren in der Maus. WT C57BL/6-Mäuse wurden intranasal mit $6 \cdot 10^4$ p.f.u. (≈ 100 -fache MLD_{50} von SC35M in BALB/c) des aviären SC35 (H7N7, B), der mausadaptierten SC35M-Variante (C), der Einzelpunktmutanten SC35-PB2_{701N} (D), SC35-NP_{319K} (E) bzw. der Doppelmutante SC35-PB2_{701N}-NP_{319K} (F) infiziert. Als Kontrollgruppe dienten PBS-behandelte Mäuse (A). Die Virustiter in der Lunge, Trachea, Leber, Milz und im Gehirn von jeweils 5 Tieren pro Zeitpunkt wurden an den Tagen 1 und 3 p.i. mittels Plaque-Test bestimmt. Dargestellt sind die individuellen logarithmischen Virustiter jedes Organs sowie ihre Mittelwerte.

Hingegen wies die Infektion mit der SC35-PB2_{701N}-Mutante ($\log_{10}\text{MLD}_{50} = 6,0$) bereits an Tag 1 und 3 p.i. höhere systemische Virustiter auf. Trotz ihrer immer noch geringen Virulenz ($\log_{10}\text{MLD}_{50} = 5,5$ in BALB/c-Mäusen) resultierte die Infektion mit der Doppelmutante SC35-PB2_{701N}-NP_{319K} in stark erhöhten systemischen Titern im Vergleich zu den Einzelpunktmutanten. Bei keiner der Infektionen mit den rekombinanten Virusmutanten konnten, im Gegensatz zur Infektion mit dem mausadaptierten SC35M Virus, Virustiter im Gehirn nachgewiesen werden (Abb. 28C). Zusammengefasst zeigen die hier erhaltenen Daten (4.4.3, 4.4.4), dass eine Erhöhung der endogenen Importin- $\alpha 3$ Level mit einer auf den Respirationstrakt beschränkten Infektion des aviären HPAIV SC35 korrelierte. Ebenso korrelierte die Herabregulierung der Importin- $\alpha 3$ Isoform mit einer systemischen Infektion des säugeradaptierten SC35M in der Maus. Weiterhin wurde festgestellt, dass dies durch die Kombination der wirtsadaptiven Mutationen PB2 701N und NP 319K vermittelt wurde. Die Infektion mit dieser Doppelmutante führte ebenfalls zu einer Herabregulierung der Importin- $\alpha 3$ Expressionslevel in der Lunge und zu einer systemischen Infektion.

Hieraus lässt sich folgern, dass die wirtsadaptiven Signaturen PB2 D701N und NP N319K sowohl eine entscheidende Rolle bei der Herabregulierung von Importin- $\alpha 3$ spielen, als auch von großer Bedeutung für den systemischen Verlauf einer Influenzavirus Infektion in der Maus sind. Weiterhin zeigen diese Ergebnisse, dass die Fähigkeit zur Herabregulierung der Importin- $\alpha 3$ Isoform eine entscheidende Rolle bei der Virusreplikation und Adaptation an den Säuger spielt. Im nächsten Schritt sollten die Pathogenität und der Tropismus dieser beiden Viren verschiedener Wirtsspezifitäten im Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mausmodell ausführlicher charakterisiert werden.

4.5 Pathogenität und Organtropismus von H7N7-Viren verschiedener Wirtsspezifitäten im Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mausmodell

Nachdem in 4.2 untersucht wurde, welchen Einfluss das Fehlen des Importin- $\alpha 3$ bzw. des Importin- $\alpha 7$ Gens auf das Wachstum aviärer und säugeradaptierter Viren des H7N7-Subtyps *in vitro* hat, sollte nun *in vivo* im Mausmodell deren Einfluss auf die Pathogenität und den Zelltropismus dieser Viren untersucht werden. Für das Importin- $\alpha 7^{-/-}$ Mausmodell wurde bereits gezeigt, dass mit dem Grad der Säugeradaptation die Importin- $\alpha 7$ Isoform zunehmend große Bedeutung für eine effiziente Replikation und Pathogenese im Säuger erlangt (Gabriel *et al.*, 2011). H5N1 und H7N7 Influenzaviren besitzen in Importin- $\alpha 7^{-/-}$ Mäusen eine geringere Pathogenität als in WT-Mäusen. Zudem verleiht das Fehlen der Importin- $\alpha 7$ Isoform den Mäusen eine Resistenz gegenüber dem 2009 pandemischen H1N1 Influenzavirus. Die Importin- $\alpha 7$ Isoform ist somit auch *in vivo* ein positiver Regulator des Viruswachstums säugeradaptierter Influenzaviren. Für das Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mausmodell lagen noch keine *in vivo*-Daten vor. Importin- $\alpha 3$ war zuvor jedoch schon als negativer Regulator der Polymeraseaktivität identifiziert worden (Hudjetz und Gabriel, 2012) und auch die *in vitro*-Daten dieser Arbeit deuten auf eine negative Funktion für das Wachstum von Influenzaviren hin (4.1, 4.2). Daher wurde vermutet, dass eine Influenzavirus Infektion in Mäusen, denen diese inhibitorische Isoform komplett fehlt, schwerer verlaufen würde, als in WT-Mäusen. Zudem hatte die Bestimmung der Importin- α mRNA-Expressionslevel nach Influenzavirus Infektion gezeigt (4.4.3), dass eine Herabregulierung der Importin- $\alpha 3$ Level mit einer systemischen Infektion der Maus korreliert. Somit wurde die Hypothese aufgestellt, dass das komplette Fehlen dieser Isoform noch gravierendere Auswirkungen, im Gegensatz zu einer transienten Herabregulierung, haben würde. Zur Klärung der Rolle von Importin- $\alpha 3$ in der Pathogenese wurde nachfolgendes Experiment im Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mausmodell durchgeführt. Dazu wurden der Organ- und Zelltropismus von SC35 und SC35M in WT und Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mäusen (C57BL/6-Hintergrund) sowie in beiden Tiergruppen die MLD₅₀ beider Viren bestimmt. Die Durchführung der Experimente erfolgte wie unter 3.7 beschrieben.

4.5.1 Zelltropismus von H7N7 Influenza A Viren unterschiedlicher Importin- α Abhängigkeiten im Respirationstrakt der Maus

Im Rahmen der Bestimmung des Organtropismus der beiden H7N7 Viren in WT und Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mäusen wurden Organe zur Erstellung formalinfixierter, paraffineingebetteter (FFPE) Gewebeschnitte entnommen (3.6.1, 3.6.2). Hierfür wurden WT und Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mäuse intranasal mit SC35 bzw. mit SC35M infiziert, während der Kontrollgruppe PBS verabreicht wurde. Die verwendete Virusdosis entsprach der 100-fachen MLD_{50} von SC35M (Gabriel *et al.*, 2005: bestimmt in BALB/c-Mäusen $\cong 6 \cdot 10^4$ p.f.u. $\cong 30$ -fache MLD_{50} in WT C57BL/6 (4.5.3)) und der für die Bestimmung der Importin- α mRNA-Expressionslevel nach Influenzavirus Infektion verwendeten Dosis (siehe 4.4.3). An Tag 1 und 3 p.i. wurden unperfundierte Organe des oberen (ORT, Nasenmuschel) und unteren Respirationstraktes (URT, Lunge) entnommen. Zur Untersuchung des Zelltropismus der beiden Viren im Respirationstrakt wurden von den Organen FFPE-Gewebeschnitte erstellt (3.6.1, 3.6.2). Diese wurden immunhistochemisch zur Visualisierung des viralen Antigens gefärbt. Die immunhistochemischen Färbungen der infizierten ORTs und URTs zeigten, dass SC35M, wie erwartet, im Respirationstrakt beider Mausgruppen und zu beiden untersuchten Zeitpunkten eine sehr viel höhere Viruslast als SC35 aufwies (Abb. 29). Dies ging mit einer massiven Zerstörung des Lungengewebes und einer erhöhten interstitiellen und entzündlichen Infiltration des Gewebes einher. Bezüglich des Gewebetropismus der beiden Viren im URT konnte festgestellt werden, dass einen Tag nach der Infektion SC35 hauptsächlich das Bronchialepithel infiziert hatte, während SC35M zusätzlich mehrere antigenpositive Foci im Alveolargewebe aufwies (Abb. 29i-t). Drei Tage p.i. zeigten sich auch in den SC35-infizierten Lungen einige viruspositive Foci im Alveolargewebe, die jedoch nur sehr vereinzelt auftraten (Abb. 29ag-ah). Im Gegensatz dazu wiesen die Lungen der mit SC35M infizierten WT-Mäuse 3 Tage p.i. eine erhebliche Infektion des Bronchial- und Alveolargewebes auf (Abb. 29aa-ab, ae-af, ai-aj). Beim Vergleich der infizierten Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Lungen mit den infizierten WT-Lungen konnten zwei Beobachtungen gemacht werden: Zum Einen wurde deutlich, dass das Fehlen der Importin- $\alpha 3$ Isoform keinen Einfluss auf den Zell- und Gewebetropismus der beiden Viren verschiedener Wirtsspezifitäten im Respirationstrakt der Maus hatte. SC35 wies in den Lungen beider Mausgruppen einen größtenteils auf das Bronchialepithel beschränkten Tropismus auf, während SC35M auch in der Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Lunge zu einer fulminanten Infektion sowohl des Bronchialepithels als auch des Alveolargewebes führte. In den infizierten Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Lungen konnte, unabhängig vom verwendeten Virus, geringfügig mehr viruspositives Antigen detektiert werden als in den WT-Lungen. Hierbei handelte es sich zumeist um eine verstärkte Infektion des Alveolargewebes. Im SC35M-infizierten ORT der Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mäuse wurden im Vergleich zum WT ebenfalls geringfügig mehr antigenpositive Bereiche nachgewiesen.

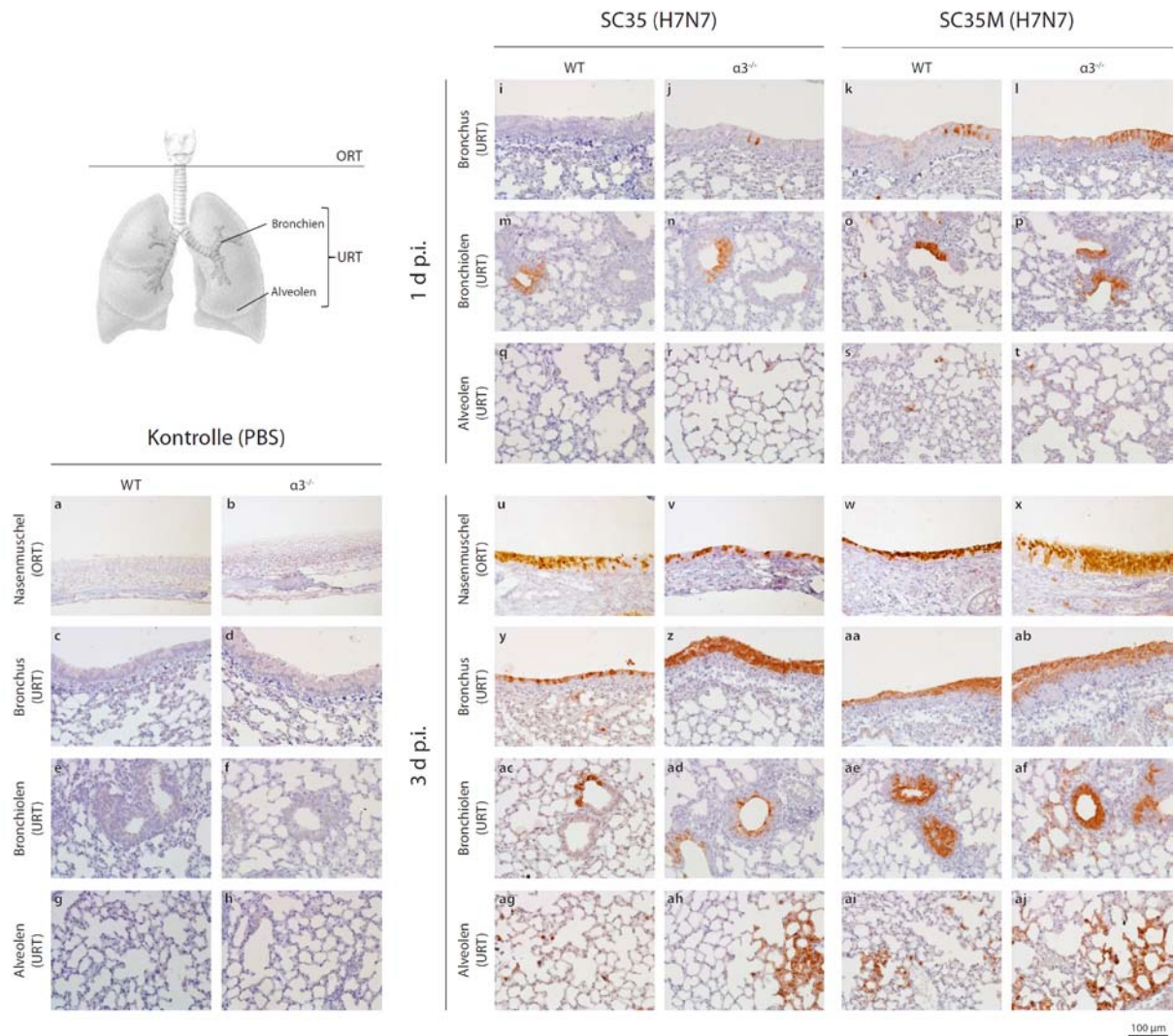


Abb. 29: Zelltropismus von H7N7 Viren unterschiedlicher Importin- α Abhängigkeiten im Respirationstrakt von WT und Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mäusen. Die Unterteilung des Respirationstraktes in ORT und URT ist schematisch dargestellt (modifiziert nach http://cdn.comlucv.com/wp-content/uploads/2011/11/healthy_lung.jpg). Wildtyp (WT) und Importin- $\alpha 3^{-/-}$ ($\alpha 3^{-/-}$) C57BL/6-Mäuse wurden mit $6 \cdot 10^4$ p.f.u. ($\pm 100x$ MLD₅₀ von SC35M in BALB/c) des HPAIV SC35 oder der mausadaptierten SC35M-Variante (H7N7) infiziert. PBS-behandelte Mäuse wurden als Kontrollgruppe verwendet. An Tag 1 und 3 d p.i. (i-t bzw. u-aj) wurden unperfundierte Organe zur Herstellung formalinfixierter, paraffineingebetteter (FFPE) Gewebeschnitte entnommen. Virales Antigen wurde immunhistochemisch mittels anti-FPV-Antikörper in den FFPE-Gewebeschnitten des murinen oberen (ORT, a-b, u-x) und unteren Respirationstraktes (URT, c-t, y-aj) gefärbt (2.14, 3.6.5). Die Detektion erfolgte mit einem Streptavidin-HRP-Konjugat und dem HRP-Substrat DAB. Virusantigenpositive Zellen sind rot-braun gefärbt. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun. Für die Aufnahme der Bilder wurde ein Lichtmikroskop verwendet. Der Maßstab stellt 100 μ m dar.

Zusammenfassend konnten weder an Tag 1 noch an Tag 3 p.i. beträchtliche Unterschiede im Gewebetropismus der beiden Viren in den beiden Mausgruppen festgestellt werden. Jedoch wurde eine verstärkte generelle Virusreplikation sowohl des aviären SC35 Virus, wie auch der säugeradaptierten SC35M-Variante, in den Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Lungen detektiert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Importin- $\alpha 3$ Isoform die Replikation von SC35 und SC35M auch *in vivo* hemmt.

4.5.2 Organtropismus von aviären und säugeradaptierten H7N7 Influenza A Viren im Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mausmodell

Um die Rolle des Importin- $\alpha 3$ Gens hinsichtlich des Organtropismus zu studieren, wurden WT und Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mäuse mit den rekombinanten SC35 und SC35M Viren infiziert (3.7). Hierbei wurden für das mauspathogene SC35M-Virus eine niedrige und eine hohe Infektionsdosis gewählt ($0,5 \times \text{MLD}_{50} \cong 10^3$ p.f.u. bzw. $30 \times \text{MLD}_{50} \cong 6 \cdot 10^4$ p.f.u. von SC35M in C57BL/6). Für die Infektion mit dem HPAIV SC35, das für die Maus niedrigpathogen ist, wurde nur eine hohe Infektionsdosis verwendet ($0,1 \times \text{MLD}_{50} \cong 6 \cdot 10^4$ p.f.u. von SC35 in C57BL/6). An den Tagen 1, 3 und 6 nach Infektion erfolgte die Entnahme unperfundierter Organe (Lunge, Trachea, Leber, Milz, Gehirn). In den Organhomogenisaten wurden die Virustiter mittels Plaquetest auf MDCK-Zellen bestimmt (3.5.3).

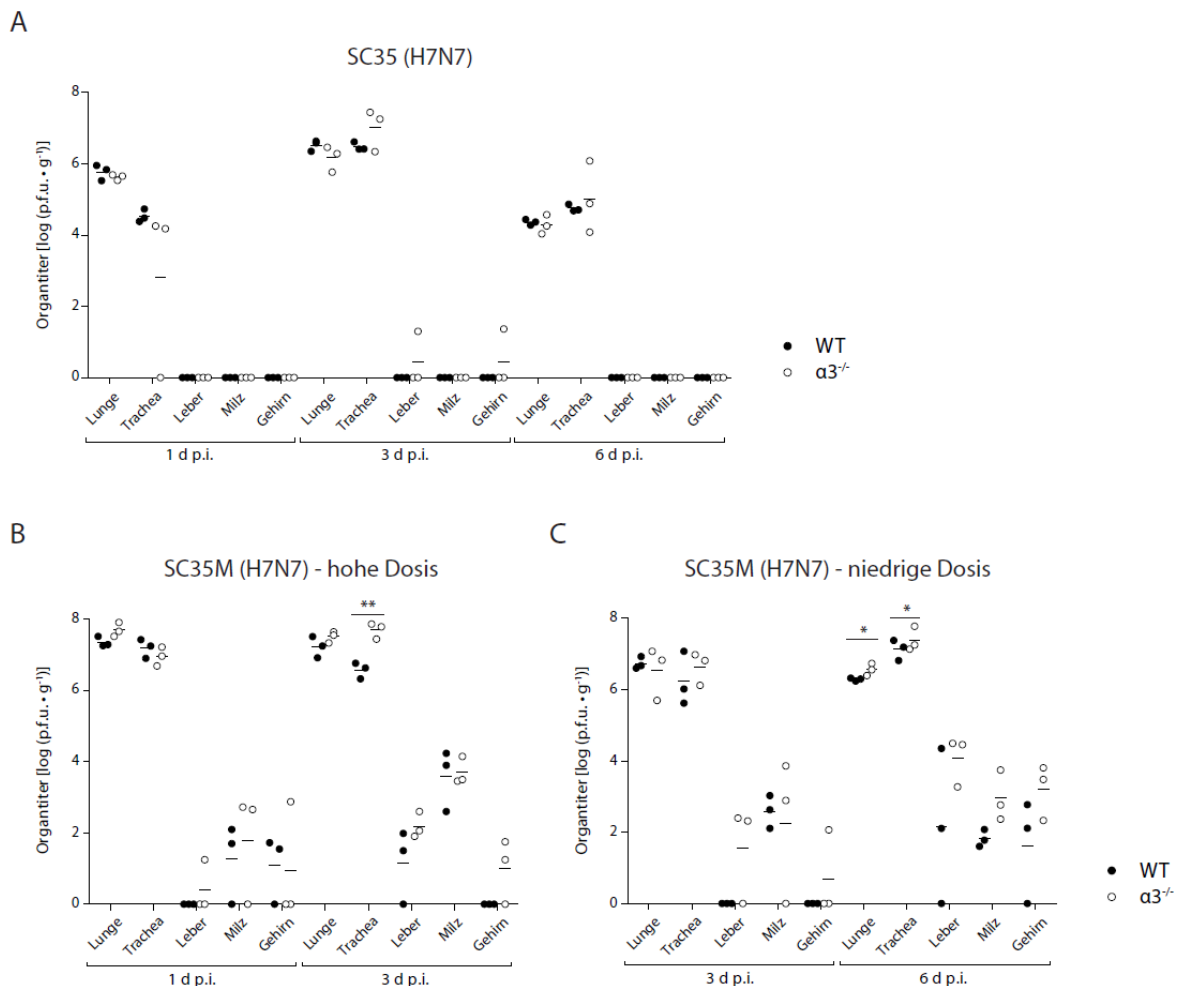


Abb. 30: Organtropismus von H7N7 Viren unterschiedlicher Importin- α Abhängigkeiten in WT und Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mäusen. Wildtyp (WT) oder Importin- $\alpha 3^{-/-}$ ($\alpha 3^{-/-}$) C57BL/6-Mäuse wurden intranasal mit dem aviären HPAIV SC35 (A; $6 \cdot 10^4$ p.f.u. $\cong 0,1 \times \text{MLD}_{50}$ von SC35 in C57BL/6) oder einer hohen und niedrigen Dosis (B und C, $6 \cdot 10^4$ p.f.u. $\cong 30 \times \text{MLD}_{50}$ bzw. 10^3 p.f.u. $\cong 0,5 \times \text{MLD}_{50}$ von SC35M in C57BL/6) des mausadaptierten SC35M-Virus infiziert. Die Virustiter in den unperfundierten Organen (Lunge, Trachea, Leber, Milz, Gehirn) von jeweils 3 Tieren pro Zeitpunkt wurden an den Tagen 1, 3 und 6 p.i. mittels Plaquetest bestimmt. Dargestellt sind die individuellen logarithmischen Virustiter jedes Organs sowie ihre Mittelwerte. Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's-*t*-Tests ermittelt (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Die Infektion der WT-Mäuse mit SC35 blieb zu allen untersuchten Zeitpunkten auf den Respirationstrakt beschränkt und das Virus zeigte keine systemische Ausbreitung (Abb. 30A, vgl. auch Abb. 28). Im Gegensatz dazu wiesen SC35-infizierte Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mäuse systemische Virustiter in der Leber und im Gehirn an Tag 3 p.i. auf (Abb. 30A). Die Infektion beider Mausgruppen mit niedrigen und hohen Infektionsdosen von SC35M resultierte sowohl in WT als auch in Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mäusen in einer systemischen Ausbreitung zu allen untersuchten Zeitpunkten (Abb. 30B und C). Die Virustiter in Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mäusen waren, verglichen mit WT-Mäusen, in einigen Organen (Lunge, Trachea, Milz) signifikant um bis zu 1,2 Log-Stufen erhöht (Abb. 30B und C).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Deletion des Importin- $\alpha 3$ Gens die Virusreplikation, vor allem des SC35M-Virus, verstärkt und die systemische Ausbreitung fördert. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Importin- $\alpha 3$ Isoform *in vivo* einen restringierenden Effekt auf die Vermehrung der mausadaptierten SC35M Variante ausübt.

4.5.3 Virulenz von H7N7-Viren verschiedener Wirtsspezifitäten im Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mausmodell

Abschließend wurde die Maus-letale Dosis 50 (MLD₅₀) von SC35 und SC35M in WT und Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mäusen bestimmt (Durchführung siehe 3.7.2). Aus den ermittelten Gewichtsverläufen und Überlebensraten der infizierten Tiere wurde die MLD₅₀ der rekombinanten Viren in beiden Tiergruppen berechnet und verglichen. Bei allen verwendeten Infektionsdosen wiesen die SC35-infizierten Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mäuse einen höheren Gewichtsverlust im Vergleich zum WT auf (Abb. 31A, C, E). Die Infektion mit der höchsten Dosis (10^6 p.f.u.) von SC35 resultierte zudem nur in einer 78 %-igen Letalität für die WT-Mäuse, während sie für die Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mäuse zu 100 % letal war (Abb. 31F, Tab. 7). Beim Vergleich der Gewichtsverläufe und Überlebensraten der SC35M-infizierten Tiere beider Gruppen wurde ein dosisabhängiger Gewichtsverlust festgestellt, der auch in der Pathogenität sichtbar wurde (Abb. 32, Tab. 7). Die SC35M Infektion führte bei allen drei verwendeten Infektionsdosen zu einem stärkeren Gewichtsverlust (Abb. 32A, C, E) und einer deutlich erhöhten Pathogenität des Virus in den Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mäusen, die sich speziell bei den beiden niedrigeren Infektionsdosen in einer stark erhöhten Letalität äußerte (Abb. 32B bzw. D, Tab. 7). Eine Infektion mit 10^2 p.f.u. von SC35M hatte eine Letalität von 37,5 % in der Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Maus gegenüber 0 % Letalität im WT zur Folge bzw. bei einer Dosis von 10^3 p.f.u. von 100 % ($\alpha 3^{-/-}$) zu 25 % (WT) Letalität. Die höchste Infektionsdosis von 10^4 p.f.u. war zwar für beide Mausgruppen zu 100 % letal, jedoch führte sie zu einem früheren Tod der Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mäuse an Tag 6 statt wie im Wildtyp an Tag 8 p.i. (Abb. 32F).

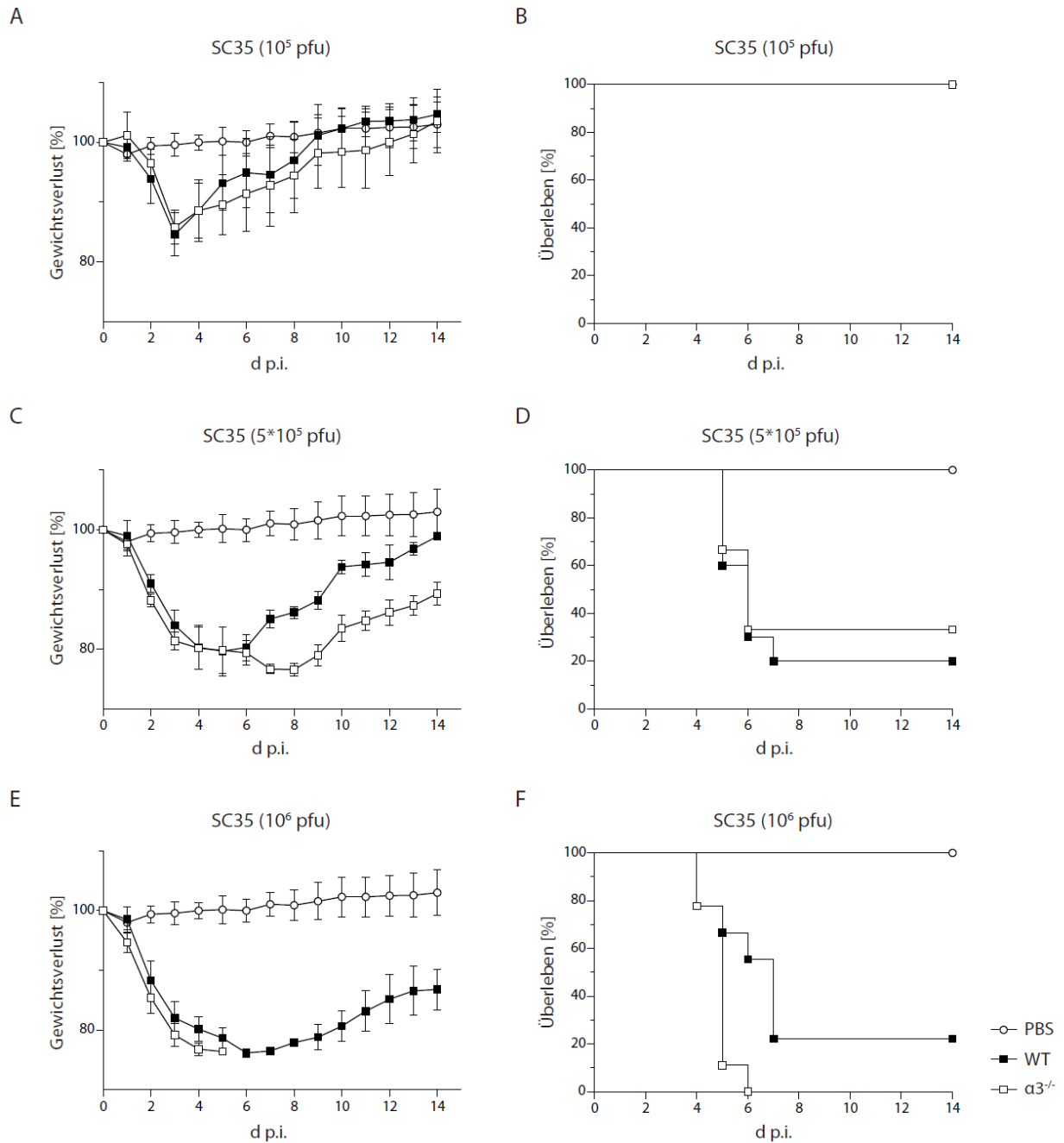


Abb. 31: Pathogenität des aviären HPAIV SC35 (H7N7) in Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mäusen. Wildtyp (WT) und Importin- $\alpha 3^{-/-}$ ($\alpha 3^{-/-}$) C57BL/6-Mäuse wurden intranasal mit 10^5 p.f.u. ($n = 6$), $5 \cdot 10^5$ p.f.u. ($n = 9$) oder 10^6 p.f.u. ($n = 9$) des HPAIV SC35 infiziert. Gewichtsverläufe (A, C, E) und Überlebensraten (B, D, F) wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen nach der Infektion verfolgt. PBS-behandelte Mäuse wurden als Kontrollgruppe verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte der Gruppen, sowie die Gewichtsverläufe mit Standardabweichungen.

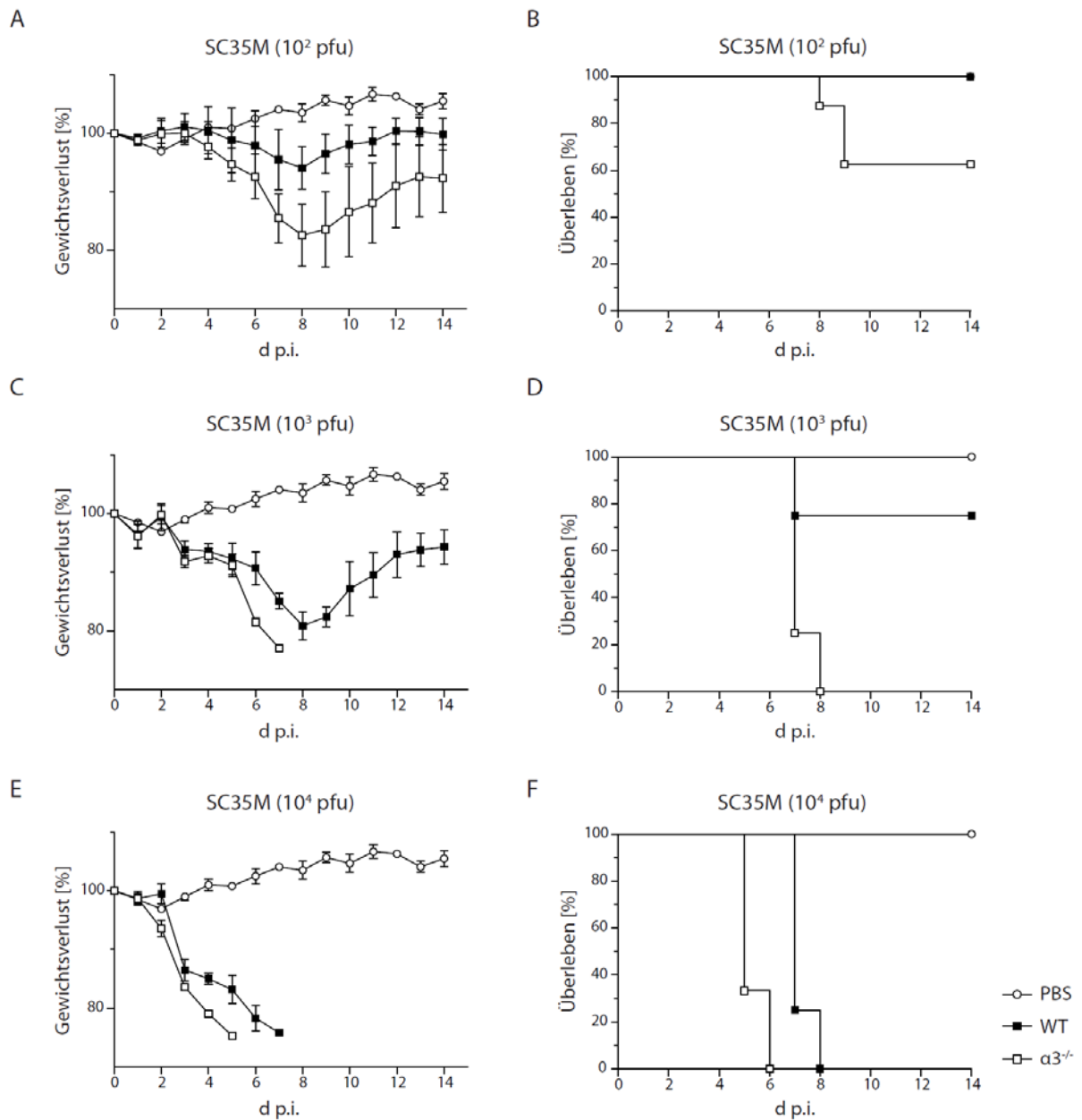


Abb. 32: Pathogenität des säugeradaptierten SC35M-Virus (H7N7) in Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mäusen. Wildtyp (WT) und Importin- $\alpha 3^{-/-}$ ($\alpha 3^{-/-}$) C57BL/6-Mäuse wurden intranasal mit 10^2 p.f.u. ($n = 7$), 10^3 p.f.u. ($n = 4$), und 10^4 p.f.u. ($n = 4$) des mausadaptierten SC35M-Virus infiziert. Gewichtsverläufe (A, C, E) und Überlebensraten (B, D, F) wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen nach der Infektion verfolgt. PBS-behandelte Mäuse wurden als Kontrollgruppe verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte der Gruppen, sowie die Gewichtsverläufe mit Standardabweichungen.

Aus den berechneten MLD_{50} -Werten wird deutlich, dass SC35M gegenüber SC35 im WT eine um etwa 300-fach erhöhte Virulenz besitzt (Tab. 7). Die in BALB/c-Mäusen nachgewiesene, höhere Virulenz von SC35M gegenüber SC35 (Gabriel *et al.*, 2005) konnte damit auch für den C57BL/6-Hintergrund bestätigt werden. Obwohl die SC35-infizierten Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mäuse einen höheren Gewichtsverlust als die WT-Mäuse aufwiesen, besaß SC35 in beiden Gruppen einen identischen MLD_{50} -Wert von $10^{5,8}$ p.f.u., so dass für SC35 kein Unterschied in der Virulenz festgestellt werden konnte (Tab. 7). Im Gegensatz dazu war

die Virulenz von SC35M in den Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mäusen signifikant um eine Logstufe auf eine MLD_{50} von $10^{2,2}$ p.f.u. gegenüber der MLD_{50} der WT-Mäuse von $10^{3,3}$ p.f.u. erhöht (Tab. 7).

Tab. 7: Virulenz des aviären H7N7-Virus und des säugeradaptierten H7N7-Virus in Wildtyp und Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mäusen

Virus	Infektions-Dosis [p.f.u.]	Überleben [%]		Statistischer Unterschied in den Überlebensraten	MLD_{50} [p.f.u.]	
		WT	$\alpha 3^{-/-}$	WT vs. $\alpha 3^{-/-}$	WT	$\alpha 3^{-/-}$
SC35	10^6	22,2	0	$p = 0,0220$ *		
	5×10^5	20	33,3	$p = 0,5850$	$10^{5,8}$	$10^{5,8}$
	10^5	100	100	$p = 1$		
SC35M	10^4	0	0	$p = 0,0100$ **		
	10^3	75	0	$p = 0,0446$ *	$10^{3,3}$	$10^{2,2}$
	10^2	100	62,5	$p = 0,0818$		

Zur Bestimmung der Maus-letalen Dosis 50 (MLD_{50}) wurden Wildtyp (WT) oder Importin- $\alpha 3^{-/-}$ ($\alpha 3^{-/-}$) C57BL/6-Mäuse ($n \geq 4$) mit den angegebenen Infektionsdosen infiziert und die Überlebensraten der Tiere über einen Zeitraum von 14 Tagen verfolgt. PBS-behandelte Mäuse dienten als Kontrollgruppe. Die Berechnung der MLD_{50} erfolgte nach Reed und Münch (Reed und Muench, 1938). Statistisch signifikante Unterschiede in den Überlebensraten von WT und Importin- $\alpha 3^{-/-}$ C57BL/6-Mäusen wurden mittels des *Log-Rank* (Mantel-Cox)-Tests und den Daten der Kaplan-Meier-Überlebenskurven berechnet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Damit erhöht das Fehlen der Importin- $\alpha 3$ Isoform die Virulenz des säugeradaptierten SC35M Virus um das etwa 13-fache. Auf die Virulenz des aviären SC35 Virus hat die Deletion des Importin- $\alpha 3$ Gens keinen Effekt. Jedoch zeigen SC35-infizierte Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mäuse einen höheren Gewichtsverlust und eine erhöhte Virusreplikation im Vergleich zu den WT Mäusen.

5 Diskussion

5.1 Importin- α 3: ein negativer Regulator der Polymeraseaktivität und des Wachstumsverhaltens von H7N7 Viren *in vitro*

In vitro wurde bereits beschrieben, dass unterschiedliche Importin- α Isoformen des klassischen Importin- α/β Kerntransportweges einen differenziell regulatorischen Effekt auf die Polymeraseaktivität aviärer und humaner Polymerasen von Influenzaviren haben (Hudjetz und Gabriel, 2012). Dies konnte jedoch bisher nur im Kontext der wirtsadaptiven Signatur PB2 E627K gezeigt werden. Die humanen Importin- α 1 und - α 7 Isoformen werden für eine effiziente Polymeraseaktivität des humanen PB2 627K-Ribonukleoproteinkomplexes, jedoch nicht für die des vRNPs mit der aviären PB2 627E-Signatur benötigt. Die Importin- α 3 Isoform hat hingegen unabhängig von der Wirtsspezifität auf beide vRNPs eine negativ regulatorische Wirkung. Diese inhibitorische Aktivität von Importin- α 3 wird allerdings von humanen bzw. säugeradaptierten Influenzaviren, im Gegensatz zum vRNP-Kontext, im Virushintergrund wieder aufgehoben (Hudjetz und Gabriel, 2012). In dieser Arbeit wurde das SC35/SC35M-Adaptationsmodell eines HPAIV an den Säuger verwendet (Scheiblaue *et al.*, 1995). Diese beiden H7N7 Influenzaviren besitzen jedoch nicht die wirtsadaptive PB2 E627K-Signatur, sondern die PB2 D701N- und NP N319K-Signaturen (Gabriel *et al.*, 2005). Für natürliche, humane HPAIV H5N1-Isolate wurde beschrieben, dass sie entweder die PB2 E627K- oder die PB2 D701N-Signatur besitzen, die jedoch nie in Kombination auftreten und sich höchstwahrscheinlich in ihren funktionellen Rollen im Wirt ersetzen (Thanh *et al.*, 2008). Dieser wechselseitig kompensatorische Effekt wurde für die erhöhte Polymeraseaktivität und Replikation in Säugerzellen (Foeglein *et al.*, 2011; Gabriel *et al.*, 2005; Shinya *et al.*, 2009; Subbarao *et al.*, 1998), für die erhöhte Pathogenität in der Maus (Gabriel *et al.*, 2005; Hatta *et al.*, 2001) und für die erhöhte Transmissibilität im Meerschweinchen beschrieben (de Jong *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2009; Shinya *et al.*, 2009; Steel *et al.*, 2009). Die Relevanz der Importin- α 3 Isoform für Viren verschiedener Wirtsspezifitäten und ihr negativ regulatorischer Effekt auf die Polymeraseaktivität wurden in dieser Arbeit im Kontext der wirtsadaptiven Signaturen PB2 D701N und NP N319K untersucht. Dazu wurden Polymeraseaktivitäten in Importin- α 3 herabregulierten humanen Zellen *in vitro* bestimmt (siehe 4.1). Es wurde festgestellt, dass die herabregulierte Importin- α 3 Expression auch im Kontext der PB2 D701N- und NP N319K-Signaturen und unabhängig von der Wirtsspezifität zu einem signifikanten Anstieg der Polymeraseaktivität führt. Die negativ regulatorische Funktion der Importin- α 3 Isoform auf die Polymeraseaktivität in humanen Zellen ist somit nicht nur auf vRNP-Komplexe mit der wirtsadaptiven Signatur PB2 E627K beschränkt. Bei der Importin- α 3 Isoform scheint es sich vielmehr um einen universellen, negativ regulatorischen Effektor der Polymeraseaktivität von Influenzaviren in

humanen Zellen zu handeln. Im Einklang mit den Befunden zur PB2 627K-Signatur wurde in dieser Arbeit ebenfalls gezeigt, dass die inhibitorische Aktivität von Importin- α 3 im Viruskontext überwunden wird und somit keinen Einfluss mehr auf die Replikation von Influenzaviren mit den säugeradaptiven Signaturen PB2 701N und NP 319K hat. Die Vermutung, dass ein inhibitorischer Faktor in Säugerzellen exprimiert wird, der die Replikation von aviären IAVs hemmt, jedoch von humanen und säugeradaptierten IAVs im Laufe des Replikationszyklus überwunden wird, wurde bereits von Mehle und Doudna aufgestellt (Mehle und Doudna, 2008). Allerdings blieb die Identifizierung dieses Faktors und auch der Mechanismus, der zur Aufhebung der Restriktion durch diesen Faktor führt, bislang unklar. Aus diesen und vorangegangenen Arbeiten kann nun vermutet werden, dass es sich bei diesem negativ regulatorischen Faktor um die Importin- α 3 Isoform des Säugers handeln könnte (4.1; Hudjetz und Gabriel, 2012). Weiterhin stellten Moncorgé *et al.* die Hypothese auf, dass humane und säugeradaptierte IAVs in der Säugerzelle bestimmte positive, zelluläre Faktoren nutzen, um ihre Replikationseigenschaften in Säugerzellen zu steigern (Moncorgé *et al.*, 2010). Die hier durchgeführten sowie vorangegangene Studien lassen wiederum vermuten, dass es sich bei diesen positiv regulatorischen Faktoren um die Importin- α 1 und - α 7 Isoformen handeln könnte (4.1; Hudjetz und Gabriel, 2012).

Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten für das Wachstum von H7N7 Viren verschiedener Wirtsspezifitäten im Kontext der wirtsadaptiven Signaturen PB2 D701N und NP N319K in murinen WT und Importin- α *knockout* Zellen stützen diese beiden Hypothesen. Das aviäre SC35 Virus zeigte in diesen WT-Säugerzellen ein vermindertes Wachstumsvermögen (4.2; Gabriel *et al.*, 2007; 2005; 2011). Die Importin- α 3 Isoform hatte im Viruskontext nur noch auf das Wachstum des aviären Virus einen inhibitorischen Effekt, während das säugeradaptierte Virus die Restriktion durch sie erfolgreich überwunden hat. Der proliferative Effekt der positiv regulatorischen Importin- α 7 Isoform auf das Wachstum des säugeradaptierten SC35M-Virus war auch im Viruskontext deutlich sichtbar. Diese Wachstumskinetiken wurden nur in MEF-Zellen durchgeführt, in denen entweder das Importin- α 3 oder das - α 7 Gen deletiert war, da neben Importin- α 1 bisher nur diese Isoformen eine Relevanz für das Viruswachstum oder die Polymeraseaktivität hatten, während Importin- α 4 und α 5 keinen Effekt zeigten (Gabriel *et al.*, 2011; Hudjetz und Gabriel, 2012). Es wäre interessant gewesen, das Viruswachstum auch in Importin- α 1^{-/-} MEF-Zellen zu studieren, da alle bisher untersuchten Viren in humanen Zellen, zusätzlich zu der α 3- und/oder α 7-Abhängigkeit, auch von dieser Isoform abhängig waren (Gabriel *et al.*, 2011). Dies konnte jedoch nicht durchgeführt werden, da zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch keine Importin- α 1^{-/-} MEFs verfügbar waren.

Es konnte damit festgestellt werden, dass die Ergebnisse hinsichtlich der Importin- α 7 Isoform in Einklang mit den hierfür publizierten Daten in humanen, Importin- α 7 herabregulierten

Zellen stehen (Gabriel *et al.*, 2011). Für den Mechanismus dieser proliferativen Funktion der Importin- $\alpha 7$ Isoform sind mehrere Erklärungen möglich. So wurde für die wirtsadaptiven Signaturen PB2 701N und NP 319K eine erhöhte Bindung an die Importin- $\alpha 1$ und - $\alpha 7$ Isoformen nachgewiesen, die zu einem erhöhten Kernimport der beiden Untereinheiten und gesteigerter vRNP-Bildung führt und folglich in einer erhöhten Polymeraseaktivität resultiert (Gabriel *et al.*, 2008; 2011). Im Kontext der wirtsadaptiven Signatur PB2 E627K korreliert die erhöhte humane Polymeraseaktivität ebenfalls mit einer erhöhten Importin- $\alpha 1$ und - $\alpha 7$ Bindung an vRNPs, die über das virale NP vermittelt wird, sich jedoch nicht in einem erhöhten Kernimport äußert (Hudjetz und Gabriel, 2012). Daher wären zusätzliche, transportunabhängige Funktionen dieser beiden Isoformen denkbar, die die Polymeraseaktivität und auch das Viruswachstum begünstigen könnten. So wurde u.a. eine Rolle der Importine- α beim vRNP-Zusammenbau beschrieben. Hier hat die Komplexbildung von Importin- α mit PB2 eine Reorganisierung des viralen Polymerasekomplexes zur Folge und trägt aktiv zum korrekten Zusammenbau funktionaler vRNPs bei (Boivin und Hart, 2011; Tarendeau *et al.*, 2007). Weiterhin wurde postuliert, dass die Importin- α Isoformen unabhängig von ihrer Kernimportfunktion für die Funktionalität des vRNP-Komplexes von Influenzaviren essentiell sind und eine Rolle bei der viralen Transkription und/oder Replikation spielen (Resa-Infante *et al.*, 2008). Zusätzlich wäre es denkbar, dass spezifische Importin- α -vRNP Interaktionen indirekt andere zelluläre Faktoren rekrutieren, die eine zusätzliche regulatorische Wirkung auf die virale Polymerase ausüben. Hinsichtlich einer derartigen transportunabhängigen Funktion der Importin- α Isoformen wurde bereits beschrieben, dass sie zusammen mit Importin- β die Bindung und Freisetzung von Cap-Struktur-aufweisenden mRNAs und U snRNAs an den CAP-Bindekomplex (CBC) im Nukleus bzw. Zytoplasma regulieren (Dias *et al.*, 2010). Sie besitzen demnach bei der Qualitätskontrolle dieser RNA-Spezies eine regulatorische Rolle (Dias *et al.*, 2010). Ähnlich den Importin- β Isoformen, für die eine chaperonähnliche Funktion auf ihre Cargoproteine nachgewiesen wurde (Jäkel *et al.*, 2002), wäre eine derart proteinstabilisierende Funktion aufgrund der Strukturähnlichkeit auch für die Importin- α Isoformen denkbar.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit geklärt werden, dass Influenzaviren über die Fähigkeit verfügen, die Menge des endogen in der Zelle vorliegenden, negativ regulatorischen Importin- $\alpha 3$ Proteins differenziell zu regulieren. Die Infektion von MEF-Zellen mit dem aviären SC35 Virus führte zu einer signifikanten Erhöhung der Menge von Importin- $\alpha 3$ Protein, die sich inhibitorisch auf die Polymeraseaktivität und das Viruswachstum *in vitro* auswirkte. Hingegen hatte die Infektion mit dem säugeradaptierten SC35M Virus den gegenteiligen Effekt und resultierte in einer spezifischen Herabregulierung der Importin- $\alpha 3$ Isoform, die sich in einer erhöhten Polymeraseaktivität und einem erhöhtem Replikationsvermögen von SC35M äußerte. Damit scheint die durch säugeradaptierte Viren

verursachte Herabregulierung von Importin- $\alpha 3$ zur Überwindung dieses inhibitorischen Faktors nötig zu sein und ist damit ein wichtiger Schritt auf dem Weg der Adaptation an den Säuger. Durch diesen Befund lassen sich auch die, auf den ersten Blick widersprüchlichen, Ergebnisse hinsichtlich des Viruswachstums aviärer Viren in den murinen Importin- $\alpha 3^{-/-}$ MEFs und den Importin- $\alpha 3$ herabregulierten humanen Lungenzellen erklären (4.2 bzw. Gabriel *et al.*, 2011). Durch das Fehlen von Importin- $\alpha 3$ in den murinen *knockout*-Zellen fällt auch der inhibitorische Effekt auf das Wachstum des aviären Virus weg, was in einem stark gesteigerten Wachstum resultiert. In den gesilenceten humanen Zellen sind hingegen das Importin- $\alpha 3$ Gen und funktionale Restproteinmengen dieser Isoform noch vorhanden. Zudem kommt es höchstwahrscheinlich durch die SC35 Infektion, wie in den MEF-Zellen, zu einer Hochregulierung der Importin- $\alpha 3$ Level nach der Infektion. Dies wirkt sich anschließend wiederum negativ auf die Replikation aus und resultiert in dem beobachteten, verringerten Wachstum von SC35 (Gabriel *et al.*, 2011). Ein weiterer Grund für die abweichenden Daten diesbezüglich könnte darin begründet sein, dass die Ergebnisse in verschiedenen Wirtshintergründen (murin bzw. human) erhalten wurden. In beiden Systemen decken sich jedoch die Beobachtungen für die proliferative Importin- $\alpha 7$ Isoform dahingehend, dass sie für eine effiziente Replikation und das Wachstum des säugeradaptierten Virus essentiell ist.

Der genaue molekulare Mechanismus, wie die Importin- $\alpha 3$ Genexpression durch die Virusinfektion reguliert wird, ist bislang unbekannt. Dies hängt u.a. damit zusammen, dass generell über die Interaktionen bestimmter Importin- α Isoformen mit zellulären oder viralen Faktoren nur wenige Studien existieren (vgl. Tab. 6 in 1.2.2). Eine durch die Influenzavirus Infektion verursachte, vermehrte Ausschüttung oder Repression eines Transkriptionsfaktors, der die Genexpression der Importin- $\alpha 3$ Isoform spezifisch und selektiv steuert, wäre denkbar. Auch bei anderen Krankheitsbildern wurde eine dysregulierte Importin- $\alpha 3$ Expression beobachtet (Agrawal *et al.*, 2012; Theiss *et al.*, 2009). Für Morbus Crohn, eine Form der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (IBD, *inflammatory bowel disease*), wurde eine direkte Korrelation zwischen der Importin- $\alpha 3$ Expression und der Schwere der Entzündung beschrieben (Theiss *et al.*, 2009). Prohibitin 1 steuert dabei in einem neu entdeckten Mechanismus den NF- κ B Import über die Regulierung der Importin- $\alpha 3$ Expression. Eine Aktivierung von TNF- α führt zu einer Verringerung von Prohibitin 1, die mit einer Erhöhung der Importin- $\alpha 3$ Expression, vermehrtem NF- κ B Kernimport und einer Verschlimmerung der Entzündung einhergeht (Theiss *et al.*, 2009). Ebenso wurde eine Funktion von Importin- $\alpha 3$ bei allergischem Asthma festgestellt, die ebenfalls von der Stärke der Importin- $\alpha 3$ Expression abhängt (Agrawal *et al.*, 2012). Agrawal *et al.* beschreiben darin, dass eine durch TNF- α und IL-1 β erhöhte Importin- $\alpha 3$ Expression in einem erhöhten Kernimport von NF- κ B und in verstärkten chronisch allergischen Atemwegsentzündungen resultieren. Calcitriol führte jedoch durch eine Herabregulierung der Importin- $\alpha 3$ Expression zu einem verminderten NF-

κB Import und könnte daher zu einer Linderung der Asthmasymptome beitragen (Agrawal *et al.*, 2012). Weiterhin wäre es denkbar, dass die Importin-α3 Isoform über einen noch unbekanntem Mechanismus ihre Genexpression in gewissem Maße selbst steuert. Für die Importin-α1 Isoform wurde eine derartige genregulatorische Funktion auf die Serin/Threoninkinase 35 (STK35) schon beschrieben (Yasuda *et al.*, 2012). Dabei bindet im Kern zurückgehaltenes Importin-α1 an Dnase I-sensitive, nukleäre Komponenten und führt zu einer selektiven Hochregulierung der mRNA-Expression von STK35, deren konstitutive Überexpression unter oxidativem Stress mit vermehrtem, caspaseunabhängigen Zelltod korreliert (Yasuda *et al.*, 2012). Zukünftige Studien sind wichtig, um die zelluläre Regulierung des Importin-α3 Gens zu klären sowie die mechanistische Funktion des Importin-α3 Proteins in der Regulierung der viralen Transkription und Replikation zu charakterisieren.

Im Anschluss an die Untersuchung der differentiellen Importin-α Funktionen auf die Polymeraseaktivität und die Replikationseigenschaften von Influenzaviren *in vitro*, wurden ihr Vorkommen im Säuger und ihre Rolle bei der Influenzavirus Infektion des Säugers *in vivo* analysiert.

5.2 Die Importin-α Isoformen besitzen differenzielle Expressionsmuster in Säugorzellen und -organen

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der mRNA-Expressionslevel der Importin-α Isoformen in diversen Zelltypen des Säugers. Es war bereits bekannt, dass die verschiedenen Isoformen ubiquitär vorkommen⁵ und zell-, gewebe- sowie organspezifische Expressionsmuster in einigen Zelllinien und Organen auf mRNA- und Proteinebene aufweisen (Itman *et al.*, 2009; Jans *et al.*, 2000; Kamei *et al.*, 1999; Köhler *et al.*, 1997; 2002; Yasuhara *et al.*, 2009). Desweiteren wurde eine differenzielle Expression der Importin-α Isoformen für einige Zelllinien während der Proliferation und Differenzierung gezeigt, sowie für einige murine Organe (Kamei *et al.*, 1999; Köhler *et al.*, 1997; 2002; 1999; Suzuki *et al.*, 2008). In dieser Arbeit wurden die mRNA-Expressionslevel der Importin-α Isoformen α1, α3, α4, α5 und α7 in einer Vielzahl von Zelllinien und Organen des Säugers mittels RT-qPCR unter Nutzung der relativen Quantifizierung bestimmt und untereinander verglichen.

Für die untersuchten immortalisierten, humanen Krebszelllinien HEK 293T, A549 und HeLa und die murine WT MEF-Zelllinie wurde eine um 2- bis 8-fach erhöhte Importin-α1 Expression im Vergleich zu den restlichen Isoformen festgestellt. Die als Kontrolle verwendeten primären humanen MDM (*monocyte-derived macrophages*) wiesen hingegen keine Importin-α1 Überexpression auf. Diese Ergebnisse bestätigen somit sehr gut den

⁵ Eine Ausnahme stellt die testisspezifische Importin-α6 Isoform dar (Köhler *et al.*, 1997).

derzeitigen Wissensstand, dass eine stark erhöhte Importin- α 1 Expression ein charakteristisches Merkmal für entartete Krebszellen ist (Christiansen und Dyrskjøt, 2012). So korreliert eine Importin- α 1 Überexpression in Dickdarm-, Brust- und Lungenkrebspatienten mit einer schlechten Prognose und einer geringen Überlebenschance (Dahl *et al.*, 2006; Dankof *et al.*, 2007; Kau *et al.*, 2004; Winnepenninckx *et al.*, 2006). Weiterhin wird deutlich, welchen Einfluss die Dysregulierung bestimmter Isoformen, in diesem Falle der Importin- α 1 Isoform, auf die Prozesse in der Zelle haben kann. Es erscheint plausibel, dass eine anomale Dysregulierung der Importin- α Isoformen weitreichende Folgen für die Fertilität und Embryogenese hat (Hu *et al.*, 2010; Rother *et al.*, 2011; Terry *et al.*, 2007). Insbesondere, da kürzlich neben der Hauptfunktion als Kernimportfaktor für die Importin- α 1 Isoform zudem eine genregulatorische Funktion nachgewiesen wurde. Bei stressverursachter Akkumulation im Zellkern übt diese Isoform durch Bindung an DNase I-sensitive, nukleäre Komponenten eine selektive, genregulatorische Funktion auf die Serin/Threoninkinase 35 (STK35) aus und trägt damit direkt zum Zellschicksal, einschließlich nicht-apoptotischem Zelltod, bei (Yasuda *et al.*, 2012). Eine derartige Funktion als Transkriptionsfaktor wurde bisher noch nicht für die restlichen Importin- α Isoformen beschrieben. Aufgrund der Strukturähnlichkeit wäre dies aber durchaus denkbar.

Die erhaltenen Daten der Importin- α mRNA Expressionslevel in den untersuchten murinen Organen bestätigen die Literatur darin, dass die Importin- α Isoformen in der Maus differenziell und organspezifisch exprimiert werden (Kamei *et al.*, 1999; Köhler *et al.*, 1997; Schmidt *et al.*, 2007; Tsuji *et al.*, 1997; Yasuhara *et al.*, 2007). Diese differenzielle Expression wird höchstwahrscheinlich auch durch die unterschiedlichen Funktionen der Organe bzw. die Differenzierungszustände der Zellen bedingt, während derer der Kerntransport bestimmter regulatorischer Transkriptionsfaktoren durch bestimmte Isoformen benötigt wird. So ist während der Zelldifferenzierung die kontrollierte, zeitweise Expression und Repression bestimmter Importin- α Isoformen für den phasenspezifischen Import spezieller, mit Entwicklungsprozessen assoziierter Transkriptionsfaktoren essentiell (vgl. auch Tab. 6, Okada *et al.*, 2008). Insbesondere Importin- α 3 scheint bei der Differenzierung von Zellen eine wichtige Rolle zu spielen (Köhler *et al.*, 2002). Für das Gehirn der Maus wurde beschrieben, dass in diesem die Isoformen Importin- α 4 und - α 5 vorherrschen (Schmidt *et al.*, 2007; Tsuji *et al.*, 1997; Yasuhara *et al.*, 2007). Übereinstimmend damit korreliert eine Herabregulierung von Importin- α 1 und eine gleichzeitig erhöhte Importin- α 5 Expression mit der neuronalen Differenzierung von embryonalen Stammzellen (Yasuhara *et al.*, 2007). Die stark erhöhte Importin- α 5 Expression (neben Importin- α 3 und - α 4) wurde hier für das murine Gehirn bestätigt. Die anderen untersuchten Organe wiesen ebenfalls eine differenzielle Expression der Importin- α Isoformen auf. Dabei war bemerkenswerterweise die murine Lunge das einzige Organ, in dem ausschließlich die Importin- α 3 mRNA-Expressionslevel im

Vergleich zu den restlichen Isoformen deutlich erhöht waren. Somit war in der murinen Lunge wider Erwarten der negative Regulator der viralen Polymeraseaktivität die am höchsten exprimierte Isoform und nicht die proliferative Importin- $\alpha 7$ Isoform (Hudjetz und Gabriel, 2012). Die hohe Importin- $\alpha 3$ Expression deutet auf eine wichtige, funktionelle Rolle der Importin- $\alpha 3$ Isoform in der Lunge hin. Außerdem wiesen die einzelnen Messwerte für die Importin- $\alpha 3$ Isoform in einigen Organen, wie z.B. der Lunge und dem Gehirn, eine größere Streuung als in anderen Organen auf (Milz oder Leber). Dies könnte auf eine größere Varianz bei der Expression der Importin- $\alpha 3$ Isoform in der Lunge und im Gehirn in verschiedenen Individuen hindeuten, da jeder Datenpunkt eine individuelle Maus repräsentiert. Es wäre denkbar, dass eine differenzielle Regulierung der Expression dieser Isoform in verschiedenen Individuen Auswirkungen auf zelluläre Prozesse oder auch bestimmte Krankheitsbilder hat. So wurde, wie schon erwähnt, für Morbus Crohn eine direkte Korrelation zwischen der Importin- $\alpha 3$ Expression und der Schwere der Entzündung beschrieben (Theiss *et al.*, 2009). Ebenso wurde die, oben beschriebene, Funktion der Importin- $\alpha 3$ Expression bei allergischem Asthma festgestellt, die ebenfalls von der Stärke der Expression dieser Isoform abhängt (Agrawal *et al.*, 2012). Hierauf basierend könnte spekuliert werden, dass die Importin- $\alpha 3$ Expression nicht nur eine wichtige Rolle bei der Replikation von Influenzaviren spielt, sondern zusätzlich die durch die Infektion hervorgerufene Entzündungsantwort moduliert oder reguliert und somit die Schwere der Lungeninfektion entscheidend beeinflussen könnte. Die gewonnenen Daten zeigen damit eindrucksvoll, dass die Importin- α Isoformen in den verschiedenen Zelllinien und Mausorganen eine differenzielle Expression auf mRNA-Ebene aufweisen.

5.3 Importin- $\alpha 3$ ist die dominierende Isoform im Respirationstrakt des Säugers

Weiterhin wurde die Importin- α Expression in den verschiedenen Bereichen des oberen (ORT) und unteren Respirationstraktes (URT), dem Hauptort der Influenzavirus Replikation im Säuger, genauer studiert. Hierzu wurde das Importin- α Vorkommen im Respirationstrakt zum Einen immunhistochemisch auf Proteinebene untersucht, zum Anderen mittels des etablierten Importin- α Isoformdetektionssystems auf Transkriptionsebene. Insbesondere sollte analysiert werden, inwieweit ein potenziell unterschiedliches Importin- α Vorkommen in den verschiedenen Bereichen des Respirationstraktes den Selektionsdruck bei der Anpassung an die Kernimportmaschinerie des Säugers darstellen könnte. Eine räumlich differenzielle Expression der Importin- α Isoformen in verschiedenen Regionen des ORT und URT analog zur differenziellen Expression des aviären und des humanen HA-Rezeptors ($\alpha 2,3$ - bzw. $\alpha 2,6$ -verknüpfte Sialinsäuren) im Respirationstrakt, die einen Selektionsdruck bei der Adaptation darstellen (Shinya *et al.*, 2006; van Riel *et al.*, 2010; 2006, 2007), wäre

denkbar. Hierin könnte eine Erklärung für den *Switch* in der Importin- α Nutzung von Importin- $\alpha 3$ zur Importin- $\alpha 7$ Abhängigkeit bei der Wirtsadaptation von HPAIV an den Säuger liegen (Gabriel *et al.*, 2011).

In dieser Arbeit konnte sowohl im humanen als auch im murinen Respirationstrakt immunhistochemisch eine ausgedehnte Expression der Importin- α Isoformen gezeigt werden. Die Zellkerne und auch das Zytoplasma verschiedener Zelltypen des Respirationstraktes waren dabei für die getesteten Importin- α Isoformen ($\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5/\alpha 7$) antigenpositiv. Eine quantitative Aussage hinsichtlich der Importin- α Expressionslevel im Respirationstrakt des Säugers war mit dieser Methode nicht möglich, da verschiedene Antikörperaffinitäten eine direkte Quantifizierung ausschließen. Diese Daten bestätigten jedoch, dass die Importin- α Isoformen in den für die Influenzavirus Infektion primär relevanten Geweben und Organen des Säugers in hohem Maße präsent sind. Dadurch können sie durchaus einen wichtigen Einfluss auf die Replikationseigenschaften von Influenzaviren im Respirationstrakt des Säugers ausüben und eine Relevanz für die Adaptation an den neuen Wirt haben.

Zum detaillierteren Studium eines differenziellen Importin- α Vorkommens wurden die Importin- α mRNA-Expressionslevel in verschiedenen Regionen des Respirationstraktes bestimmt. In allen untersuchten Bereichen des humanen und murinen Respirationstraktes wies die negativ regulatorische Importin- $\alpha 3$ Isoform die höchste Expression im Vergleich zu den restlichen Isoformen auf. Im ORT beider Spezies waren jedoch auch die Expressionslevel der proliferativen Importin- $\alpha 7$ Isoform signifikant erhöht. Dies traf ebenfalls auf das Alveolargewebe der Maus zu und trat in abgeschwächter Form auch im URT des Menschen zutage. Die anderen Isoformen zeigten im Vergleich zu Importin- $\alpha 1$ keine auffälligen Unterschiede in ihren Expressionsleveln. Beim Vergleich der Expression jeder einzelnen Isoform in den verschiedenen ORT und URT Geweben der Maus wurde zudem noch eine weitere Beobachtung gemacht: Unabhängig von der Isoform, wiesen alle fünf Importin- α Isoformen vom ORT bis hin zum Alveolargewebe des URTs einen Anstieg ihrer Expressionslevel um etwa das 5- bis 6-fache auf. Für den humanen Respirationstrakt lieferte diese alternative Auswertung, u.a. aufgrund der unterschiedlichen Ausgangsmaterialien für die Gesamt-RNA Isolierung (FFPE-Gewebeschnitte für den ORT bzw. *RNAlater* fixierte Lungenbiopsien für den URT) und stark voneinander abweichenden *ct*-Werten des Referenztranskriptes GAPDH im ORT und URT, bislang keine zuverlässigen Daten.

Diese Ergebnisse zeigen zum Einen, dass aufgrund der hohen Ähnlichkeit des humanen und murinen Respirationstraktes hinsichtlich der Importin- α mRNA-Expressionslevel die Maus ein adäquates Modell darstellt, um deren Einfluss auf die Replikation von Influenzaviren in der Lunge weiter zu studieren. Zum Anderen wird deutlich, dass die verschiedenen Isoformen

nicht nur ein differenzielles Expressionsmuster in einem bestimmten Gewebe aufweisen, sondern, dass auch jede einzelne Isoform differenziell innerhalb der verschiedenen Bereiche des murinen Respirationstraktes exprimiert wird. Interessant ist dabei, dass sie alle die niedrigste Expression im ORT und die stärkste Expression im Alveolargewebe aufweisen. Dies deutet daraufhin, dass die hohe Expression der negativ regulatorischen Importin- α 3 Isoform und der proliferativen Importin- α 7 Isoform insbesondere im URT einen selektiven Druck bei der Wirtsadaptation darstellen könnte. Durch das hauptsächliche Vorkommen des aviären HA-Rezeptors (α 2,3-verknüpfte Sialinsäuren) im URT sind noch nicht adaptierte HPAIV gezwungen dominanterweise diese Region des humanen Respirationstraktes zu infizieren (Shinya *et al.*, 2006; van Riel *et al.*, 2010; 2006, 2007). Dabei werden sie zwangsläufig den hohen Importin- α Expressionsleveln der negativ regulatorischen Importin- α 3 Isoform und der proliferativen α 7-Isoform ausgesetzt. HPAIV zeigen primär eine Abhängigkeit von Importin- α 3, die jedoch auf ihr Replikationsvermögen inhibitorisch wirkt (4.1, 4.2; Gabriel *et al.*, 2011; Hudjetz und Gabriel, 2012). Aufgrund der Tatsache, dass Importin- α 7 im Alveolargewebe des URT nach Importin- α 3 die am zweithöchsten exprimierte Isoform ist und eine proliferative Funktion auf das Replikationsvermögen hat, liegt es nahe, dass eine Anpassung des HPAIV an diese Isoform geschieht. Daher wird während der Adaptation an den Säuger der *Switch* in der Importin- α Nutzung von Importin- α 3 zu Importin- α 7 Abhängigkeit beobachtet (Gabriel *et al.*, 2011). Erlangt das Virus nun während der Säugeradaptation zusätzlich noch die Spezifität für den humanen Rezeptor, der vermehrt im ORT exprimiert wird (Shinya *et al.*, 2006; van Riel *et al.*, 2010; 2006, 2007), könnte dies in einer besonders starken Replikation im ORT resultieren. Die Nutzung der proliferativen Importin- α 7 Isoform und Vermeidung bzw. Überwindung der hohen Importin- α 3 Expressionslevel im URT könnte damit zu einer effizienten Replikation im ORT des Säugers führen und somit in einer hohen Transmissibilität resultieren. Der Erwerb dieser Eigenschaften wäre besonders besorgniserregend, da hier starke Virusreplikation mit potenziell erhöhter Transmission einherginge und so die Voraussetzung für das Entstehen pandemischer Viren mit aggressivem Viruswachstum geschaffen werden könnte.

5.4 Die Herabregulierung der Importin- α 3 Expression in der Lunge durch säugeradaptierte Influenza A Viren korreliert mit systemischer Virusausbreitung in der Maus

In vitro resultiert die Influenzavirus Infektion, je nach Adaptationsgrad des Virus, in einer differenziellen Regulierung der Importin- α 3 Proteinexpression (siehe 4.1). Daher wurde neben der Importin- α Expression im uninfizierten Respirationstrakt des Säugers auch analysiert, ob die Importin- α Isoformen *in vivo* bei einer Infektion mit Influenzaviren ebenfalls

in ihrem natürlichen Expressionsmuster im Respirationstrakt der Maus dysreguliert werden. Insbesondere sollte dabei untersucht werden, ob das noch nicht adaptierte HPAIV SC35 und das säugeradaptierte SC35M Virus unterschiedliche Effekte auf die Expression der Importin- α Isoformen ausüben und inwieweit hierin eine Korrelation mit dem Organtropismus der beiden Viren zu finden ist.

In den PBS-behandelten Lungen der Kontrollmäuse wurde festgestellt, dass allein die Verabreichung der intraperitonealen Narkose und der PBS-Inokulierung transiente Auswirkungen auf die Expression der Importin- α Isoformen haben. Insbesondere betraf dies die Importin- α 3 Isoform, deren Expression einen Tag nach Behandlung auf das Level der Importin- α 1 Isoform herabreguliert war. Dies könnte durch den durch die Narkose und die PBS-Behandlung verursachten Stress ausgelöst worden sein. So wurde bei verschiedenen Formen von zellulärem Stress eine Akkumulation der Importin- α 1 Isoform im Zellkern beschrieben, die mit einer spezifischen Regulierung der Genexpression einzelner Gene und caspaseunabhängigen Zelltod korreliert (Yasuda *et al.*, 2012). Eine derartige genregulatorische Aktivität wäre für die Importin- α 3 Isoform aufgrund ihrer Struktur- und Funktionsähnlichkeit ebenfalls denkbar, wurde allerdings bislang nicht beschrieben. Weiterhin besteht auch die Möglichkeit, dass die Narkose und PBS-Behandlung der Lunge in der Aktivierung oder Repression bestimmter Transkriptionsfaktoren resultiert, die anschließend indirekt eine genregulatorische Funktion auf die Importin- α 3 Expression ausüben. So wurde u.a. eine durch die Narkosebehandlung hervorgerufene, signifikante Erhöhung von Interferon- γ und des löslichen Interleukin-2 Rezeptors beschrieben (Brand *et al.*, 2001). Eine Dysregulierung der Importin- α 3 Expression wurde zudem, wie schon erwähnt, auch bei diversen anderen Krankheitsbildern beobachtet (Agrawal *et al.*, 2012; Theiss *et al.*, 2009). Drei Tage nach der Behandlung normalisierten sich die Importin- α Expressionswerte jedoch wieder auf die Ausgangswerte und Importin- α 3 war wieder die am höchsten exprimierte Isoform in der Lunge. Daher wurden die 3 d.p.i. erhaltenen Werte in den infizierten Lungen als aussagekräftiger als die an Tag 1 d.p.i. angesehen, da zu diesem Zeitpunkt die Narkose und die Flüssigkeitsinokulierung keinen Einfluss mehr auf die Expressionslevel der Importin- α Isoformen hatten. Somit sind an Tag 3 p.i. lediglich die Effekte der Virusinfektion auf die Importin- α Expression sichtbar. Dennoch war feststellbar, dass auch schon einen Tag nach Infektion die Importin- α Expressionslevel in den SC35- bzw. SC35M-infizierten Lungen von denen der PBS-behandelten Kontrolllungen abwichen. In beiden Fällen war die Importin- α 3 Expression um etwa das 3- bis 4-fache und damit auf vergleichbare Werte der unbehandelten Lungen erhöht. Dieser Befund änderte sich jedoch dramatisch drei Tage nach der Infektion: Die Infektion mit dem HPAIV SC35 führte in der murinen Lunge zu einer starken Hochregulierung der negativ regulatorischen Importin- α 3 Isoform. Dies korrelierte mit einer Restriktion der SC35 Infektion

auf den Respirationstrakt der Maus. Im Gegensatz dazu resultierte die Infektion mit SC35M drei Tage nach der Infektion in stark, bis auf das Niveau der Importin- α 1 Isoform, herabregulierten Importin- α 3 mRNA Expressionsleveln in der Lunge und korrelierte mit systemischer Ausbreitung und erhöhter Pathogenität des säugeradaptierten SC35M Virus in der Maus. Damit ließ sich die *in vitro* beobachtete und durch die Influenzavirus Infektion hervorgerufene, differenzielle Regulierung der Importin- α 3 Expression auf Proteinebene (4.1) auch *in vivo* im Mausmodell auf Transkriptionsebene bestätigen. Weiterhin wurden PB2 701N und NP 319K als die wirtsadaptiven Mutationen bestimmt, die in Kombination für diese herabregulierende Funktion des säugeradaptierten Virus und auch für die systemische Ausbreitung verantwortlich sind. Diese beiden Mutationen werden ebenfalls für die erhöhte Polymeraseaktivität und die erhöhte Virulenz und Pathogenität von SC35M im Mausmodell verantwortlich gemacht (Gabriel *et al.*, 2005). Sie vermitteln zudem bei der Adaptation den *Switch* in der Importin- α Nutzung von Importin- α 3 zu Importin- α 7 Abhängigkeit und tragen zu einer generell erhöhten Bindung an die humanen Importin- α Isoformen *in vitro* bei (Gabriel *et al.*, 2008; 2011). Die hier beobachtete Dysregulierung der negativ regulatorischen Importin- α 3 Expression bietet nun eine Erklärung für die beobachtete, höhere Pathogenität und systemische Ausbreitung von SC35M: Das säugeradaptierte Virus überwindet die inhibitorische Importin- α 3 Aktivität durch eine Herabregulierung dieser Isoform, während das aviäre SC35 Virus hierzu nicht fähig ist, sondern sogar zu einer weiteren Erhöhung dieses zellulären, inhibitorischen Faktors führt.

Der in 5.3 aufgestellten Hypothese, dass die hohe Expression der negativ regulatorischen Importin- α 3 Isoform und der proliferativen Importin- α 7 Isoform im Respirationstrakt den selektiven Druck bei der Wirtsadaptation darstellt und die Adaptation an die Importin- α 7 Isoform der Kernimportmaschinerie bedingt, kann nun Folgendes hinzugefügt werden: Die Infektion mit einem noch nicht adaptierten HPAIV resultiert in einer noch weiter gesteigerten Expression des Importin- α 3 Gens, wodurch noch mehr negativ regulatorisches Importin- α 3 Protein in den Zellen des Respirationstraktes gebildet wird. Um dem restringierenden Importin- α 3 Effekt zu entkommen, entwickeln HPAIV bei der Adaptation an den Säuger zwei Mechanismen, die ihnen eine effiziente Replikation im Respirationstrakt ermöglichen. Zum Einen reguliert das säugeradaptierte Virus über einen neuen, bislang unbekanntem Mechanismus selektiv und aktiv die Expression die negativ regulatorischen Importin- α 3 Isoform herab und überwindet so die Restriktion durch sie. Dies korreliert mit einer systemischen Infektion. Zum Anderen findet der beschriebene *Switch* in der Nutzung der Importin- α Isoformen von Importin- α 3 zu Importin- α 7 statt, der eine effiziente Replikation durch die Nutzung der proliferativen Importin- α 7 Isoform gewährleistet (Gabriel *et al.*, 2011). Die Herabregulierung der hohen, inhibitorischen Importin- α 3 Expressionslevel und die Nutzung der proliferativen Importin- α 7 Isoform ermöglichen dem Virus damit eine effiziente

Replikation, die Adaptation an den Säuger und eine erhöhte Pathogenität in diesem. Der genaue molekulare Mechanismus, der zu dieser selektiven Regulierung des Importin- $\alpha 3$ Gens führt, bedarf noch einer genaueren Charakterisierung. Aus diesen Studien wird jedoch deutlich, dass die wirtsadaptiven Signaturen PB2 D701N und NP N319K zusätzlich zu ihren anderen Funktionen entscheidend für die Herabregulierung von Importin- $\alpha 3$ sind, die mit einer systemischen und zumeist hochpathogenen Influenzavirus Infektion in der Maus korreliert. Dies lässt den Rückschluss zu, dass die Fähigkeit zur Herabregulierung der Importin- $\alpha 3$ Isoform und damit die Überwindung dieses negativ regulatorischen Faktors ein entscheidender Schritt bei der Adaptation an den Säuger ist. Hierdurch gelingt es dem Virus der Restriktion durch die Importin- $\alpha 3$ Isoform in der Lunge zu entkommen, sich folglich systemisch auszubreiten und dadurch die Pathogenität im Säuger drastisch zu erhöhen.

5.5 Das Fehlen des Importin- $\alpha 3$ Gens erhöht die Pathogenität von H7N7 Viren im Mausmodell

Das Fehlen des Importin- $\alpha 3$ Gens erhöht *in vitro* die Virusreplikation des HPAIV SC35 im murinen System (4.2). Ebenso erhöht die Herabregulierung dieser Isoform *in vitro* die Polymeraseaktivität aviärer und säugeradaptierter vRNPs in humanen Zellen, resultiert jedoch nur in inhibiertem Viruswachstum von aviären Viren und nicht von säugeradaptierten Viren (4.1, 4.2; Gabriel *et al.*, 2011; Hudjetz und Gabriel, 2012). Die Auswirkungen der Deletion des Importin- $\alpha 3$ Gens auf das Wachstum aviärer und säugeradaptierter Viren des Subtyps H7N7 sollten in dieser Arbeit abschließend *in vivo* in einem Importin- $\alpha 3$ *knockout* Mausmodell charakterisiert werden. Insbesondere sollten die Pathogenität und der Zelltropismus beider Viren in Wildtyp (WT) und Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mäusen analysiert und verglichen werden. Bisher lagen noch keinerlei Daten für das Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mausmodell bezüglich der Infektion mit Influenzaviren vor. Für das Importin- $\alpha 7^{-/-}$ Mausmodell wurde hingegen schon gezeigt, dass mit dem Grad der Säugeradaptation die Importin- $\alpha 7$ Isoform zunehmend große Bedeutung für eine effiziente Replikation und Pathogenese erlangt (Gabriel *et al.*, 2011). H5N1 und H7N7 Influenzaviren besitzen in Importin- $\alpha 7^{-/-}$ Mäusen eine geringere Pathogenität als in WT-Mäusen. Zudem verleiht das Fehlen der Importin- $\alpha 7$ Isoform den Mäusen eine Resistenz gegen das pandemische 2009 pH1N1-Virus. Die Importin- $\alpha 7$ Isoform ist somit auch *in vivo* ein positiver Regulator des Viruswachstums säugeradaptierter Influenzaviren.

Aufgrund der *in vitro*-Daten wurde für das Importin- $\alpha 3$ *knockout* Mausmodell die Hypothese aufgestellt, dass eine Influenzavirus Infektion in Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mäusen schwerer verlaufen sollte, als in WT-Mäusen. Da die Fähigkeit zur transienten Herabregulierung der Importin- $\alpha 3$ Level mit einer systemischen Infektion der Maus korreliert (4.4.3), wurde

angenommen, dass das komplette Fehlen ebenfalls gravierende Auswirkungen haben könnte. Unabhängig vom Virustyp waren immunhistochemisch tendenziell mehr virusantigenpositive Bereiche im Respirationstrakt der Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mäuse zu detektieren. Jedoch waren sowohl bei der Infektion mit SC35 als auch mit SC35M zwischen WT und Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mäusen keine Unterschiede im Zell- und Gewebetropismus im Respirationstrakt zu detektieren. Allerdings wurden hinsichtlich des Organotropismus Unterschiede zwischen den beiden Mausgruppen festgestellt: Die normalerweise auf den Respirationstrakt beschränkte Infektion mit SC35 führte in einigen Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mäusen zu extrapulmonären Virustitern und damit zu einer systemischen Virusausbreitung. Die Infektion mit dem säugeradaptierten SC35M Virus resultierte, wie erwartet, in beiden Mausgruppen in einer systemischen Ausbreitung. Jedoch waren nach SC35M Infektion, widersprüchlich zur initialen Arbeitshypothese, in einigen Organen der Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mäuse die Titer signifikant erhöht. Damit verstärkt die Deletion des Importin- $\alpha 3$ Gens auch *in vivo* vor allem die Virusreplikation und fördert die systemische Ausbreitung. Beim Vergleich der Gewichtsverluste und Überlebensraten der WT und Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mäuse wurde zusätzlich deutlich, dass die Deletion des Importin- $\alpha 3$ Gens eine erhöhte Pathogenität beider Viren zur Folge hatte. In den SC35-infizierten Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mäusen wurde ein höherer Gewichtsverlust als in den WT-Mäusen beobachtet, der jedoch nicht mit einer erhöhten Virulenz einherging, so dass kein Unterschied in der MLD_{50} zwischen beiden Gruppen festgestellt wurde. In den SC35M-infizierten Mäusen machte sich das Fehlen der negativ regulatorischen Importin- $\alpha 3$ Isoform nicht nur in einem erhöhten Gewichtsverlust, sondern auch in einer deutlich erhöhten Letalität bemerkbar, so dass die Virulenz von SC35M in den Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mäusen um etwa das 13-fache erhöht war.

Entgegen der *in vitro* Beobachtungen zeigte sich im *in vivo* Mausmodell, dass die Deletion des Importin- $\alpha 3$ Gens vor allem einen gravierenden Effekt auf die Pathogenität des säugeradaptierten SC35M Virus hatte. In den Wachstumskinetiken der Importin- α *knockout* MEFs war jedoch für SC35M kein gesteigertes Wachstum durch das Fehlen der negativ regulatorischen Importin- $\alpha 3$ Isoform beobachtet worden, sondern nur das Wachstum von SC35 war in diesen Zellen stark erhöht. Hierfür sind mehrere Erklärungen denkbar. Es könnte sein, dass die Importin- $\alpha 3$ Isoform in der Säugerlunge andere Funktionen ausübt, als in Zelllinien, wodurch unterschiedliche Effekte der Gendeletion auf die H7N7 Viren beobachtet werden. Zudem wurden in immortalisierten Zelllinien, wie den verwendeten MEF-Zellen, im Gegensatz zu Primärzellen oder Organen, deutlich erhöhte Importin- $\alpha 1$ Expressionslevel detektiert. Es wäre daher denkbar, dass in diesen Zelllinien und in diesem Spezialfall besonders das säugeradaptierte Virus, welches eine erhöhte Importin- $\alpha 1$ Bindung zeigt, der inhibitorischen Aktivität von Importin- $\alpha 3$ durch das Ausweichen auf Importin- $\alpha 1$ entgeht. Da in der Säugerlunge die inhibitorische Importin- $\alpha 3$ Isoform gegenüber den

anderen Isoformen deutlich dominiert, wäre es auch vorstellbar, dass Importin- $\alpha 3$ bei hoher Expression durchaus auch auf SC35M inhibitorisch wirkt, was sich jedoch erst *in vivo* bei den im Respirationstrakt nachgewiesenen stark erhöhten Expressionsleveln (v.a. im URT) dieser Isoform zeigt. Diesen restringierenden Effekt überwindet das säugeradaptierte Virus durch aktive Herabregulierung von Importin- $\alpha 3$. Somit fungiert Importin- $\alpha 3$ im Respirationstrakt des Säugers als ein natürlicher Restriktionsfaktor für die Replikation von Influenzaviren. Eine weitere Erklärung, weshalb die erhöhte Replikation in Importin- $\alpha 3^{-/-}$ MEFs im Vergleich zu WT-MEFs nach SC35M Infektion nicht sichtbar ist, könnte darin liegen, dass in diesen Zelllinien bereits die maximale Virusreplikation und die maximalen Virustiter erreicht wurden. Die MEF-Zellen sind bereits zerstört und das Virus kann sich darüber hinaus nicht weiter vermehren. Der inhibitorische Effekt von Importin- $\alpha 3$ wird v.a. *in vivo* sichtbar, wo sich das Virus im Laufe seiner Replikation von der Lunge auf andere Organe ausweiten kann und somit zu einer systemischen Ausbreitung führt.

Desweiteren wird aus den *in vivo* Daten ebenfalls deutlich, dass der Grad der Replikationsrate eines Influenzavirus mit dem Ausmaß der inhibitorischen Aktivität von Importin- $\alpha 3$ korreliert. Hierbei wäre es denkbar, dass Importin- $\alpha 3$ als ein negativ, regulatorischer Kofaktor bei der Transkription und/oder Replikation des Virus fungiert. *In vivo* würde sich daher die Restriktion durch Importin- $\alpha 3$, die hier bei SC35M Infektion beobachtet wurde, nur bei einem säugeradaptierten Virus mit einer bereits hohen Replikationsrate bemerkbar machen. Ein aviäres Virus mit nur geringer Replikationsrate in Säugerzellen müsste zur effizienten Replikation bei der Adaptation hingegen zuerst die Fähigkeit zur Nutzung der proliferativen Importin- $\alpha 7$ Isoform erwerben.

In der Literatur wurden diverse wirtsadaptive Mutationen beschrieben, die ein HPAIV bei der Adaptation an den Säuger erwerben muss, um in einer fulminanten Infektion des neuen Wirtes zu resultieren (siehe auch 1.1.8). Hierzu zählen u.a. die Anpassung des viralen HAs an den humanen Rezeptortyp ($\alpha 2,6$ -verknüpfte Sialinsäuren; Shinya *et al.*, 2006; van Riel *et al.*, 2010; 2006, 2007), die Anpassung an wirtsspezifische Kernimportfaktoren (Boivin *et al.*, 2010; Boivin und Hart, 2011; Gabriel *et al.*, 2011; Resa-Infante und Gabriel, 2013) aber auch das Erlangen der Fähigkeit die Immunantwort des Säugers als neuen Wirt zu modulieren (Reperant *et al.*, 2012). Dies kann durch verschiedene virale Mechanismen geschehen, wobei insbesondere die Umgehung der humoralen Immunantwort durch den *antigenic shift* des HAs (Knipe und Howley, 2006) und der Erhalt bestimmter wirtsadaptiver Mutationen im NS1, das v.a. als Interferonantagonist fungiert, zu nennen sind (NS1 D92E; NS1 P42S; NS1 L103F; I106M. Golebiewski *et al.*, 2011; Jackson *et al.*, 2008; Jiao *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2010; Seo *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2011; Twu *et al.*, 2007). Hinsichtlich immunregulatorischer Signalwege wurde zudem für die Importin- $\alpha 3$ Isoform eine Interaktion

mit dem NF- κ B p50-Homodimer und dem p50/p65-Heterodimer beschrieben (Fagerlund *et al.*, 2005). Importin- α 3 ist zusammen mit der Importin- α 4 Isoform essentiell für den Kernimport dieses Transkriptionsfaktors, der eine zentrale Rolle bei der Kontrolle der zellulären Immunreaktionen, der Zelldifferenzierung und der Apoptose der Wirtszelle ausübt. U.a. reguliert NF- κ B die Expression inflammatorischer Cytokine, Chemokine und Immunrezeptoren (Ehrhardt *et al.*, 2013). Aufgrund der beschriebenen Interaktion von NF- κ B mit Importin- α 3 wäre auch eine Involvierung dieses antiviralen Faktors bei den beobachteten Auswirkungen der Importin- α 3 Deletion auf die Influenzavirus Infektion denkbar. Es könnte spekuliert werden, dass durch das Fehlen der Importin- α 3 Isoform der Kernimport von NF- κ B stark beeinträchtigt ist und somit wichtige Immun- und Entzündungsantworten bei der Influenzavirusinfektion nicht mehr aktiviert werden können. Dadurch wird eventuell die erhöhte Pathogenität von SC35 und SC35M im Importin- α 3^{-/-} Mausmodell mit bedingt. Es wäre auch denkbar, dass die beobachtete Herabregulierung der Importin- α 3 Genexpression in SC35M-infizierten Lungen von WT-Mäusen eine Beeinträchtigung des NF- κ B-Signalweges zur Folge hat. Die Auswirkungen werden dann in der erhöhten Pathogenität des adaptierten Virus und der damit verbundenen systemischen Ausbreitung sichtbar. Eventuell könnte dies auch über einen ähnlichen Mechanismus vermittelt werden, wie er für das Nukleocapsidprotein der Hantaviren beschrieben wurde: Dieses Virusprotein hält die Importin- α Isoformen α 1, α 4 und α 5 im Zytoplasma der Wirtszelle zurück und verhindert dadurch die nukleäre Translokation von NF- κ B (Taylor *et al.*, 2009). In zukünftigen Studien wäre es u.a. von Interesse nachzuweisen, ob in den Importin- α 3^{-/-} Mäusen eine verringerte Aktivierung des NF- κ B-Signalweges oder anderer immunmodulatorischer Signalwege feststellbar wäre. Dies könnte zum Einen durch die Untersuchung der NF- κ B-Mengen auf Transkriptionsebene und auf Proteinebene geschehen. Weiterhin könnte die Aktivierung NF- κ B-aktivierter Gene auch *in vitro* in Influenzavirus-infizierten Zellen mittels eines Luciferasereporterversuchs unter Verwendung eines NF- κ B Reporterkonstrukts überprüft werden. Ebenso wäre es von großem Interesse die Ursachen der differenziellen Regulierung der Importin- α 3 Expression aufzuklären, z.B. ebenfalls in einem Reporterversuch mit einem Importin- α 3 Promotorreporterkonstrukt (Agrawal *et al.*, 2012). Weiterhin ist es essentiell die hier im Säugeradaptationsmodell mit den SC35 und SC35M Viren gemachten Beobachtungen hinsichtlich der Importin- α 3 Funktionen auch für Influenzaviren weiterer Subtypen zu validieren. Interessant wäre es für diese zukünftigen Studien Isolate auszuwählen, die verschiedene wirtsadaptive Signaturen aufweisen. Die im Modellsystem durchgeführten Studien könnten so für natürliche H5N1-, H7N7- und H7N9-Isolate in Hinblick auf die wirtsadaptiven Signaturen PB2 E627K bzw. PB2 D701N untersucht werden. Weitere Studien sind zur Aufklärung des zugrunde liegenden molekularen Mechanismus der Funktion

der negativ regulatorischen Importin- α 3 Isoform auf das Replikationsverhalten von Influenzaviren *in vitro* und *in vivo* nötig.

Aus den hier gewonnenen Daten lässt sich schlussfolgern, dass die Fähigkeit eines säugeradaptierten Virus die Importin- α 3 Expression herabzusenken, und so die inhibitorische Aktivität dieser Isoform zu überwinden, einen wichtigen Schritt bei der Adaptation von Influenzaviren an den Säuger darstellt. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Importin- α 3 Isoform einen restringierenden Effekt auf die Replikation von Influenzaviren im Respirationstrakt ausübt. Die Importin- α 3 Isoform ist somit ein im Respirationstrakt des Säugers vorkommender und hoch exprimierter, endogener Restriktionsfaktor, welcher bei der Anpassung von Influenzaviren an den Säuger überwunden werden muss.

5.6 Modell: Die differenzielle Expression der Importin- α Isoformen in der Lunge stellt einen Selektionsdruck bei der Säugeradaptation von Influenza A Viren dar

Das Vorkommen der Importin- α Isoformen im Respirationstrakt des Säugers und deren Einfluss auf die Säugeradaptation eines HPAIV konnten in dieser Arbeit zum ersten Mal beschrieben werden. Ein abschließendes Modell wird hier wie folgt zusammengefasst (Abb. 33).

In allen Bereichen des Respirationstraktes des Säugers ist Importin- α 3 die am höchsten exprimierte Isoform, gefolgt von Importin- α 7. Weiterhin nimmt die Expression aller Importin- α Isoformen vom ORT zum URT hin zu (Abb. 33A). Durch das hauptsächliche Vorkommen des aviären HA-Rezeptors (α 2,3-verknüpfte Sialinsäuren) im Alveolargewebe des URT sind noch nicht adaptierte HPAIV gezwungen diese Region des humanen Respirationstraktes zu infizieren (Shinya *et al.*, 2006; van Riel *et al.*, 2010; 2006, 2007). Dabei werden sie zwangsläufig den hohen Importin- α Expressionsleveln der negativ regulatorischen Importin- α 3 Isoform und der proliferativen Importin- α 7 Isoform im Alveolargewebe ausgesetzt (Abb. 33B). Gleichzeitig erfolgt durch die Infektion mit HPAIV eine Hochregulierung der Importin- α 3 Isoform. HPAIV weisen zwar noch eine Abhängigkeit von dieser Isoform auf, jedoch wirkt sie auf ihr Replikationsvermögen ebenfalls inhibitorisch (4.1, 4.2; Gabriel *et al.*, 2011; Hudjetz und Gabriel, 2012). Daher nutzt das Virus während der Adaptation an den Säuger zwei differenzielle Mechanismen um ihrem negativen Einfluss zu entgehen: Zum Einen erlangt das HPAIV bei der Adaptation die Fähigkeit zur selektiven Herabregulierung der hohen Expression von Importin- α 3 und wirkt ihrer inhibitorischen Aktivität damit aktiv entgegen (Abb. 33C). Dies wird durch die wirtsadaptiven Mutationen PB2 701N und NP 319K in Kombination vermittelt. Zum Anderen fördern die hohen

Importin- α Expressionslevel im URT die Adaptation an die proliferative Importin- $\alpha 7$ Isoform. Dies resultiert in einer effizienten Virusreplikation im Säuger.

Bedingt durch die Herabregulierung von Importin- $\alpha 3$ wird während der Adaptation an den Säuger der *Switch* in der Importin- α Nutzung von Importin- $\alpha 3$ zu Importin- $\alpha 7$ Abhängigkeit bedingt. Sollte ein Influenzavirus nun auch noch mittels seines HAs die Rezeptorspezifität für den humanen Rezeptor erwerben, der vermehrt im ORT exprimiert wird, so würde dies in einer starken Replikation im ORT mit potenziell hohen Transmissionsraten resultieren und somit eine hohe pandemische Ausbreitung ermöglichen. Damit konnten in dieser Arbeit die Importin- α Isoformen im Respirationstrakt als ein wichtiger Selektionsdruck identifiziert und charakterisiert werden, die bei der Adaptation von HPAIV an den Säuger eine bedeutende Rolle spielen.

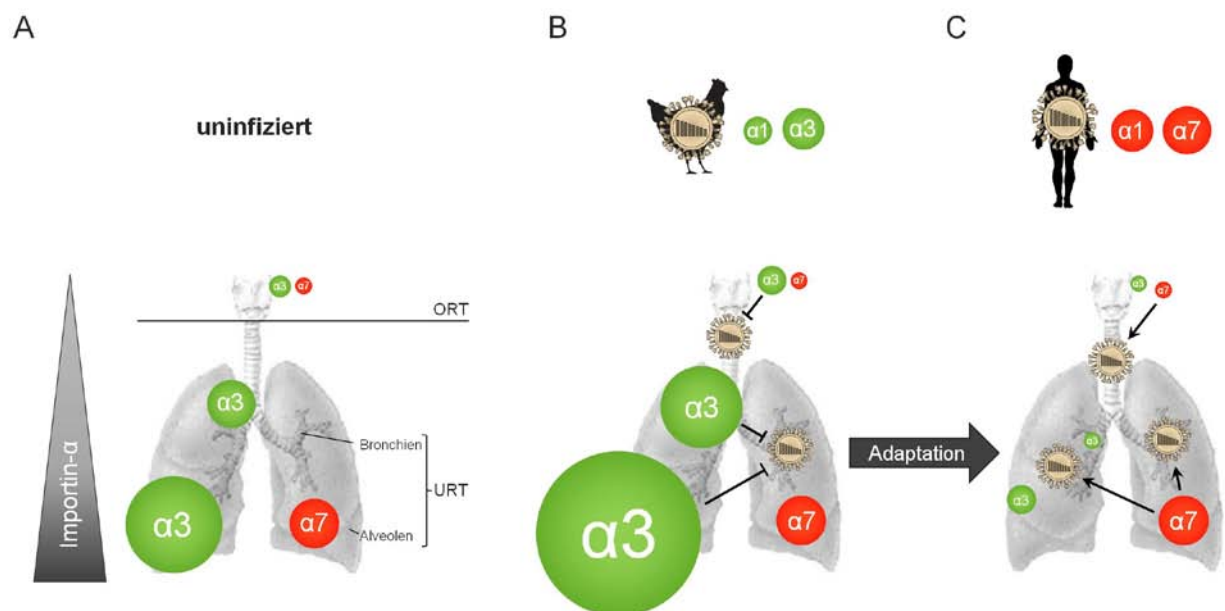


Abb. 33: Modell: Die differenzielle Expression der Importin- α Isoformen in der Lunge stellt einen Selektionsdruck bei der Säugeradaptation von Influenza A Viren dar. (A) Im uninfizierten Respirationstrakt des Säugers weist Importin- $\alpha 3$ (grün) die höchsten Expressionslevel auf, gefolgt von Importin- $\alpha 7$ (rot) im ORT und Alveolargewebe des URT. Die Importin- α Expression aller Isoformen steigt vom ORT zum Alveolargewebe des URT hin an. (B) Die Infektion mit dem HPAIV SC35 (H7N7) resultiert in einer Hochregulierung der negativ regulatorischen Importin- $\alpha 3$ Isoform, die mit einer auf die Lunge beschränkten Infektion korreliert. (C) Bei der Adaptation an den Säuger erlangt das SC35M Virus zwei Mechanismen zur Sicherung einer effizienten Replikation im Säuger, die mit einer systemischen Infektion korrelieren: Zum Einen reguliert es die negativ regulatorische Importin- $\alpha 3$ Isoform herab und überwindet so die Restriktion durch sie. Zum Anderen findet ein *Switch* in der Nutzung der Importin- α Isoformen von Importin- $\alpha 3$ zur proliferativen Importin- $\alpha 7$ Isoform statt. (Abbildungen des Respirationstraktes und des Virus modifiziert nach http://cdn.comlucv.com/wp-content/uploads/2011/11/healthy_lung.jpg bzw. Neumann *et al.*, 2009).

6 Zusammenfassung

Aviäre Influenzaviren besitzen ein hohes zoonotisches Potenzial. Hierbei können besonders hochpathogene aviäre Influenza A Viren (HPAIV) der H5N1 und H7N7 Subtypen Interspeziesbarrieren durchbrechen und direkt vom Tier auf den Menschen übergehen. Dort lösen HPAIV Infektionen eine hohe Pathogenität und Letalität aus. Da die menschliche Bevölkerung keine Immunität gegenüber diesen HPAIV besitzt, besteht v.a. bei einer weiteren Anpassung dieser Viren an den Menschen die Gefahr der Entstehung eines neuen pandemischen Influenzavirus mit potenziell verheerenden Auswirkungen.

Deshalb ist es besonders wichtig zu verstehen, wie aviäre Influenzaviren Wirtsbarrieren überwinden und somit vom Tier auf den Menschen übergehen.

Als erste Barriere bei der Adaptation an den Menschen müssen aviäre Influenzaviren die Zellmembran der neuen Wirtszelle überwinden. Dies wird durch Adaptation des viralen Hämagglutinins an die auf der Zellmembran präsentierten humanen Rezeptoren ermöglicht. Eine weitere wichtige Barriere, welche das Virus überwinden muss, ist die Kernmembran der humanen Zelle. Da Influenzaviren ihr Genom im Zellkern transkribieren und replizieren, müssen ihre viralen Ribonukleoproteinkomplexe durch die zelluläre Kernimportmaschinerie, insbesondere durch die humanen Importin- α Adaptorproteine, erkannt und in den Zellkern transportiert werden. Bei der Adaptation von HPAIV an den Säuger findet daher ein Wechsel (*Switch*) in der Importin- α Nutzung statt. Die Replikation von HPAIV ist von der humanen Importin- $\alpha 3$ Isoform abhängig, die zugleich als Inhibitor der aviären Polymeraseaktivität fungiert. Im Gegensatz dazu ist die Replikation von humanen Influenzaviren von der Importin- $\alpha 7$ Isoform abhängig, die zudem als Aktivator der humanen Polymeraseaktivität dient. Somit scheint im Laufe der Adaptation an den Säuger die Nutzung bestimmter Importin- α Isoformen erlangt worden zu sein, wodurch Influenzaviren eine hohe Replikationseffizienz im Säuger gewährleistet wird.

Das Hauptziel dieser Arbeit bestand darin zu klären, wodurch es in der Säugerlunge zu diesem *Switch* kommt. Für die hierzu nötigen Studien wurde das H7N7 SC35/SC35M-Adaptationsmodell verwendet. Hier konnte gezeigt werden, dass die Importin- α Isoformen in der Säugerlunge eine differenzielle Expression aufweisen. In der murinen sowie in der humanen Lunge ist Importin- $\alpha 3$ die am höchsten exprimierte Isoform, gefolgt von Importin- $\alpha 7$. Die Infektion mit den H7N7 Viren verschiedener Wirtsspezifitäten hat eine differenzielle Genregulierung der Importin- $\alpha 3$ Isoform zur Folge: Die Infektion mit dem HPAIV SC35 führt zu einer Importin- $\alpha 3$ Hochregulierung, die mit einer auf die Lunge beschränkten Infektion korreliert. Im Gegensatz dazu resultiert die Infektion mit SC35M in einer selektiven

Herabregulierung der Importin- α 3 Isoform, die mit einer systemischen Virusausbreitung und einer hohen Pathogenität korreliert. Im Importin- α 3^{-/-} Mausmodell verursacht die Deletion des Importin- α 3 Gens eine erhöhte Virusreplikation und Pathogenität und geht v.a. nach Infektion mit dem säugeradaptierten Influenzavirus zusätzlich mit einer erhöhten Virulenz einher.

HPAIVs haben bei der Säugeradaptation demnach zwei Mechanismen entwickelt, um dem durch die Importin- α Isoformen hervorgerufenen Selektionsdruck in der Lunge zu begegnen:

- (1) Durch die aktive Herabregulierung der Importin- α 3 Isoform wird dessen inhibitorische Aktivität auf die Virusreplikation umgangen.
- (2) Die Adaptation an die proliferative Aktivität der Importin- α 7 Isoform gewährleistet eine effiziente und hohe Virusreplikation.

Somit scheinen aviäre Influenzaviren bei der Adaptation an den Säuger spezifische Mechanismen erworben zu haben, um eine effiziente Virusreplikation im Respirationstrakt zu etablieren. Hierbei wird dem Restriktionsfaktor der Lunge (Importin- α 3) durch dessen aktive Herabregulierung entgangen und es folgt die optimale Anpassung an den Proliferationsfaktor der Lunge (Importin- α 7). Unsere Daten lassen nun vermuten, dass die differenzielle Expression der Importin- α Isoformen im Respirationstrakt des Säugers einen weiteren Selektionsdruck darstellt, der die Evolution der Influenzaviren antreibt.

7 Summary

Avian influenza viruses are known for their high zoonotic potential. Especially highly pathogenic avian influenza A viruses (HPAIV) of the H5N1 and H7N7 subtypes are able to cross interspecies barriers and thus directly transmit from animal to man. HPAIV infections cause high pathogenicity and lethality in humans. If these viruses further adapt to the human host, such an event could lead to a pandemic among the immunologically naive human population.

Therefore, it is essential to understand how avian influenza viruses cross species barriers and transmit from animals to the human host.

The first species barrier influenza viruses have to overcome upon adaptation to humans is the cellular membrane of the new host cell. This is achieved by adaptation of the viral hemagglutinin to the human receptors presented on the cellular membrane. Another important barrier the virus has to overcome is the nuclear membrane of the human cell. As influenza viruses transcribe and replicate their genome in the nucleus, their viral ribonucleoprotein complexes need to be recognized and imported into the nucleus by the cellular nuclear import machinery, particularly the human importin- α adaptor proteins. Hence, during the adaptation of a HPAIV to the mammalian host a switch in importin- α dependency occurs. The replication of HPAIV is dependent on the human importin- $\alpha 3$ isoform which functions as an inhibitor of the avian polymerase activity. On the contrary, the replication of human influenza viruses is dependent on the importin- $\alpha 7$ isoform that serves as an activator of human polymerase activity. Conclusively, influenza viruses have acquired distinct features during adaptation to the mammalian host, such as the dependency on specific importin- α isoforms by which they ensure a high replication efficiency in mammals.

The principal aim of this study was to clarify the underlying mechanism which leads to this switch in importin- α dependency in the mammalian lung. For this purpose the H7N7 SC35/SC35M adaptation model was used. Here, it could be shown that the importin- α isoforms exhibit a differential expression in the mammalian lung. Importin- $\alpha 3$ was in both, the murine and the human lung, the most abundant isoform, followed by importin- $\alpha 7$. The infection with the H7N7 viruses of different host specificities led to a differential gene regulation of the importin- $\alpha 3$ isoform: HPAIV SC35 infection resulted in an upregulation of importin- $\alpha 3$ which correlated with a restricted infection of the lung. In contrast, infection with SC35M led to a selective downregulation of importin- $\alpha 3$ which correlated with a systemic virus spread and high pathogenicity. In the importin- $\alpha 3^{-/-}$ mouse model the deletion of the importin- $\alpha 3$ gene results in an increased virus replication and pathogenicity and is

accompanied, especially in the case of the mammalian adapted influenza virus, with an increase in virulence.

Consequently, HPAIVs have developed two distinct mechanisms to encounter the selective pressure posed by the importin- α isoforms in the lung:

(1) The inhibitory activity of importin- α 3 on virus replication is circumvented by active downregulation of this isoform.

(2) The adaptation to the proliferative activity of the importin- α 7 isoform ensures efficient and high virus replication.

Thus, avian influenza viruses have acquired specific mechanisms during mammalian adaptation to establish efficient virus replication in the respiratory tract. Here, the restriction factor of the lung (importin- α 3) is overcome by its active downregulation followed by the optimal adaptation to the proliferative factor of the lung (importin- α 7). Our data suggest that the differential expression of the importin- α isoforms in the mammalian respiratory tract constitutes a selective pressure that drives the evolution of influenza viruses.

8 Literaturverzeichnis

- Agrawal, T., G.K. Gupta und D.K. Agrawal (2012). "Calcitriol decreases expression of importin- α 3 and attenuates RelA translocation in human bronchial smooth muscle cells." *J Clin Immunol* **32**(5): 1093-103.
- Almond, J.W. (1977). "A single gene determines the host range of influenza virus." *Nature* **270**(5638): 617-8.
- Andrade, M.A., C. Petosa, S.I. O'Donoghue, C.W. Muller und P. Bork (2001). "Comparison of ARM and HEAT protein repeats." *J Mol Biol* **309**(1): 1-18.
- Aratani, S., T. Oishi, H. Fujita, M. Nakazawa, R. Fujii, N. Imamoto, Y. Yoneda, A. Fukamizu und T. Nakajima (2006). "The nuclear import of RNA helicase A is mediated by importin- α 3." *Biochem Biophys Res Commun* **340**(1): 125-33.
- Area, E., J. Martín-Benito, P. Gastaminza, E. Torreira, J.M. Valpuesta, J.L. Carrascosa und J. Ortín (2004). "3D structure of the influenza virus polymerase complex: localization of subunit domains." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(1): 308-13.
- Arranz, R., R. Coloma, F.J. Chichón, J.J. Conesa, J.L. Carrascosa, J.M. Valpuesta, J. Ortín und J. Martín-Benito (2012). "The structure of native influenza virion ribonucleoproteins." *Science* **338**(6114): 1634-7.
- Bancroft, C.T. und T.G. Parslow (2002). "Evidence for segment-nonspecific packaging of the influenza A virus genome." *J Virol* **76**(14): 7133-9.
- Bannister, A.J., E.A. Miska, D. Görlich und T. Kouzarides (2000). "Acetylation of importin- α nuclear import factors by CBP/p300." *Curr Biol* **10**(8): 467-70.
- Baudin, F., C. Bach, S. Cusack und R.W. Ruigrok (1994). "Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent." *EMBO J* **13**(13): 3158-65.
- Bialas, K.M., E.A. Desmet und T. Takimoto (2012). "Specific residues in the 2009 H1N1 swine-origin influenza matrix protein influence virion morphology and efficiency of viral spread in vitro." *PLoS One* **7**(11): e50595.
- Bian, X.L., G. Rosas-Acosta, Y.C. Wu und V.G. Wilson (2007). "Nuclear import of bovine papillomavirus type 1 E1 protein is mediated by multiple α importins and is negatively regulated by phosphorylation near a nuclear localization signal." *J Virol* **81**(6): 2899-908.
- Biswas, S.K. und D.P. Nayak (1994). "Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1." *J Virol* **68**(3): 1819-26.
- Boivin, S., S. Cusack, R.W. Ruigrok und D.J. Hart (2010). "Influenza A virus polymerase: structural insights into replication and host adaptation mechanisms." *J Biol Chem* **285**(37): 28411-7.
- Boivin, S. und D.J. Hart (2011). "Interaction of the influenza A virus polymerase PB2 C-terminal region with importin- α isoforms provides insights into host adaptation and polymerase assembly." *J Biol Chem* **286**(12): 10439-48.
- Boulo, S., H. Akarsu, V. Lotteau, C.W. Muller, R.W. Ruigrok und F. Baudin (2011). "Human importin- α and RNA do not compete for binding to influenza A virus nucleoprotein." *Virology* **409**(1): 84-90.
- Bouvier, N.M. und P. Palese (2008). "The biology of influenza viruses." *Vaccine* **26** Suppl 4: D49-53.
- Brand, J.M., P. Schmucker, T. Breidhardt und H. Kirchner (2001). "Upregulation of IFN- γ and soluble interleukin-2 receptor release and altered serum cortisol and prolactin concentration during general anesthesia." *J Interferon Cytokine Res* **21**(10): 793-6.
- Bright, R.A., D.K. Shay, B. Shu, N.J. Cox und A.I. Klimov (2006). "Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States." *JAMA* **295**(8): 891-4.
- Brown, E.G. und J.E. Bailly (1999). "Genetic analysis of mouse-adapted influenza A virus identifies roles for the NA, PB1, and PB2 genes in virulence." *Virus Res* **61**(1): 63-76.
- Brown, E.G., H. Liu, L.C. Kit, S. Baird und M. Nesrallah (2001). "Pattern of mutation in the genome of influenza A virus on adaptation to increased virulence in the mouse lung: identification of functional themes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(12): 6883-8.
- Bui, M., J.E. Myers und G.R. Whittaker (2002). "Nucleo-cytoplasmic localization of influenza virus nucleoprotein depends on cell density and phosphorylation." *Virus Res* **84**(1-2): 37-44.
- Busch, U., Ed. (2010). *Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik: Grundlegende Methoden und Anwendungen*, Springer.
- Bussey, K.A., T.L. Bousse, E.A. Desmet, B. Kim und T. Takimoto (2010). "PB2 residue 271 plays a key role in enhanced polymerase activity of influenza A viruses in mammalian host cells." *J Virol* **84**(9): 4395-406.
- Butenko, A.M., E.V. Leshchinskaia, I.V. Semashko, M.A. Donets und L.I. Mart'ianova (1987). "Dhori virus - a causative agent of human disease. 5 cases of laboratory infection." *Vopr Virusol* **32**(6): 724-9.
- Chahine, M.N. und G.N. Pierce (2009). "Therapeutic targeting of nuclear protein import in pathological cell conditions." *Pharmacol Rev* **61**(3): 358-72.
- Chen, G.W., S.C. Chang, C.K. Mok, Y.L. Lo, Y.N. Kung, J.H. Huang, Y.H. Shih, J.Y. Wang, C. Chiang, C.J. Chen und S.R. Shih (2006a). "Genomic signatures of human versus avian influenza A viruses." *Emerg Infect Dis* **12**(9): 1353-60.
- Chen, H., Y. Li, Z. Li, J. Shi, K. Shinya, G. Deng, Q. Qi, G. Tian, S. Fan, H. Zhao, Y. Sun und Y. Kawaoka (2006b). "Properties and dissemination of H5N1 viruses isolated during an influenza outbreak in migratory waterfowl in western China." *J Virol* **80**(12): 5976-83.
- Chen, H., G.J. Smith, K.S. Li, J. Wang, X.H. Fan, J.M. Rayner, D. Vijaykrishna, J.X. Zhang, L.J. Zhang, C.T. Guo, C.L. Cheung, K.M. Xu, L. Duan, K. Huang, K. Qin, Y.H. Leung, W.L. Wu, H.R. Lu, Y. Chen, N.S. Xia,

- T.S. Naipospos, K.Y. Yuen, S.S. Hassan, S. Bahri, T.D. Nguyen, R.G. Webster, J.S. Peiris und Y. Guan (2006c). "Establishment of multiple sublineages of H5N1 influenza virus in Asia: implications for pandemic control." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(8): 2845-50.
- Chen, H., G.J. Smith, S.Y. Zhang, K. Qin, J. Wang, K.S. Li, R.G. Webster, J.S. Peiris und Y. Guan (2005). "Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl." *Nature* **436**(7048): 191-2.
- Chen, W., P.A. Calvo, D. Malide, J. Gibbs, U. Schubert, I. Bacik, S. Basta, R. O'Neill, J. Schickli, P. Palese, P. Henklein, J.R. Bennink und J.W. Yewdell (2001). "A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death." *Nat Med* **7**(12): 1306-12.
- Chenavas, S., L.F. Estrozi, A. Slama-Schwok, B. Delmas, C. Di Primo, F. Baudin, X. Li, T. Crepin und R.W. Ruigrok (2013). "Monomeric nucleoprotein of influenza A virus." *PLoS Pathog* **9**(3): e1003275.
- Chertow, D.S. und M.J. Memoli (2013). "Bacterial coinfection in influenza: a grand rounds review." *JAMA* **309**(3): 275-82.
- Christiansen, A. und L. Dyrskjöt (2012). "The functional role of the novel biomarker karyopherin α 2 (KPNA2) in cancer." *Cancer Lett* **331**(1): 18-23.
- Cingolani, G., H.A. Lashuel, L. Gerace und C.W. Muller (2000). "Nuclear import factors importin- α and importin- β undergo mutually induced conformational changes upon association." *FEBS Lett* **484**(3): 291-8.
- Cingolani, G., C. Petosa, K. Weis und C.W. Muller (1999). "Structure of importin- β bound to the IBB domain of importin- α ." *Nature* **399**(6733): 221-9.
- Claas, E.C., J.C. de Jong, R. van Beek, G.F. Rimmelzwaan und A.D. Osterhaus (1998a). "Human influenza virus A/HongKong/156/97 (H5N1) infection." *Vaccine* **16**(9-10): 977-8.
- Claas, E.C., A.D. Osterhaus, R. van Beek, J.C. De Jong, G.F. Rimmelzwaan, D.A. Senne, S. Krauss, K.F. Shortridge und R.G. Webster (1998b). "Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus." *Lancet* **351**(9101): 472-7.
- Clements, M.L., E.K. Subbarao, L.F. Fries, R.A. Karron, W.T. London und B.R. Murphy (1992). "Use of single-gene reassortant viruses to study the role of avian influenza A virus genes in attenuation of wild-type human influenza A virus for squirrel monkeys and adult human volunteers." *J Clin Microbiol* **30**(3): 655-62.
- Clifford, C.M., L.A. Thomas, L.E. Hughes, G.M. Kohls und C.B. Philip (1968). "Identification and comparison of two viruses isolated from ticks of the genus *Ornithodoros*." *Am J Trop Med Hyg* **17**(6): 881-5.
- Colman, P.M., J.N. Varghese und W.G. Laver (1983). "Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase." *Nature* **303**(5912): 41-4.
- Coloma, R., J.M. Valpuesta, R. Arranz, J.L. Carrascosa, J. Ortín und J. Martín-Benito (2009). "The structure of a biologically active influenza virus ribonucleoprotein complex." *PLoS Pathog* **5**(6): e1000491.
- Compans, R.W., J. Content und P.H. Duesberg (1972). "Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus." *J Virol* **10**(4): 795-800.
- Conti, E. und J. Kuriyan (2000). "Crystallographic analysis of the specific yet versatile recognition of distinct nuclear localization signals by karyopherin α ." *Structure* **8**(3): 329-38.
- Conti, E., M. Uy, L. Leighton, G. Blobel und J. Kuriyan (1998). "Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin α ." *Cell* **94**(2): 193-204.
- Cook, A., F. Bono, M. Jinek und E. Conti (2007). "Structural biology of nucleocytoplasmic transport." *Annu Rev Biochem* **76**: 647-71.
- Couceiro, J.N., J.C. Paulson und L.G. Baum (1993). "Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity." *Virus Res* **29**(2): 155-65.
- Cros, J.F., A. García-Sastre und P. Palese (2005). "An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein." *Traffic* **6**(3): 205-13.
- Cros, J.F. und P. Palese (2003). "Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses." *Virus Res* **95**(1-2): 3-12.
- Dahl, E., G. Kristiansen, K. Gottlob, I. Klamann, E. Ebner, B. Hinzmänn, K. Hermann, C. Pilarsky, M. Dürst, M. Klinkhammer-Schalke, H. Blaszyk, R. Knuechel, A. Hartmann, A. Rosenthal und P.J. Wild (2006). "Molecular profiling of laser-microdissected matched tumor and normal breast tissue identifies karyopherin- α 2 as a potential novel prognostic marker in breast cancer." *Clin Cancer Res* **12**(13): 3950-60.
- Dankof, A., F.R. Fritzsche, E. Dahl, S. Pahl, P. Wild, M. Dietel, A. Hartmann und G. Kristiansen (2007). "KPNA2 protein expression in invasive breast carcinoma and matched peritumoral ductal carcinoma in situ." *Virchows Arch* **451**(5): 877-81.
- Davies, W.L., R.R. Grunert, R.F. Haff, J.W. McGahen, E.M. Neumayer, M. Paulshock, J.C. Watts, T.R. Wood, E.C. Hermann und C.E. Hoffmann (1964). "Antiviral Activity of 1-Adamantanamine (Amantadine)." *Science* **144**(3620): 862-3.
- Dawood, F.S., A.D. Iuliano, C. Reed, M.I. Meltzer, D.K. Shay, P.Y. Cheng, D. Bandaranayake, R.F. Breiman, W.A. Brooks, P. Buchy, D.R. Feikin, K.B. Fowler, A. Gordon, N.T. Hien, P. Horby, Q.S. Huang, M.A. Katz, A. Krishnan, R. Lal, J.M. Montgomery, K. Molbak, R. Pebody, A.M. Presanis, H. Razuri, A. Steens, Y.O. Tinoco, J. Wallinga, H. Yu, S. Vong, J. Bresee und M.A. Widdowson (2012). "Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study." *Lancet Infect Dis* **12**(9): 687-95.
- Dawood, F.S., S. Jain, L. Finelli, M.W. Shaw, S. Lindstrom, R.J. Garten, L.V. Gubareva, X. Xu, C.B. Bridges und T.M. Uyeki (2009). "Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans." *N Engl J Med* **360**(25): 2605-15.

- de Jong, M.D., C.P. Simmons, T.T. Thanh, V.M. Hien, G.J. Smith, T.N. Chau, D.M. Hoang, N.V. Chau, T.H. Khanh, V.C. Dong, P.T. Qui, B.V. Cam, Q. Ha do, Y. Guan, J.S. Peiris, N.T. Chinh, T.T. Hien und J. Farrar (2006). "Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia." *Nat Med* **12**(10): 1203-7.
- Deng, T., O.G. Engelhardt, B. Thomas, A.V. Akoulitchev, G.G. Brownlee und E. Fodor (2006). "Role of ran binding protein 5 in nuclear import and assembly of the influenza virus RNA polymerase complex." *J Virol* **80**(24): 11911-9.
- Dias, A., D. Bouvier, T. Crépin, A.A. McCarthy, D.J. Hart, F. Baudin, S. Cusack und R.W. Ruigrok (2009). "The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit." *Nature* **458**(7240): 914-8.
- Dias, S.M., R.A. Cerione und K.F. Wilson (2010). "Unloading RNAs in the cytoplasm: an "importin" task." *Nucleus* **1**(2): 139-43.
- Dworetzky, S.I. und C.M. Feldherr (1988). "Translocation of RNA-coated gold particles through the nuclear pores of oocytes." *J Cell Biol* **106**(3): 575-84.
- Echevarría-Zuno, S., J.M. Mejía-Arangur, A.J. Mar-Obeso, C. Grajales-Muñiz, E. Robles-Pérez, M. González-León, M.C. Ortega-Alvarez, C. Gonzalez-Bonilla, R.A. Rascón-Pacheco und V.H. Borja-Aburto (2009). "Infection and death from influenza A H1N1 virus in Mexico: a retrospective analysis." *Lancet* **374**(9707): 2072-9.
- Ehrhardt, C., A. Ruckle, E.R. Hrinčius, E. Haasbach, D. Anhlan, K. Ahmann, C. Banning, S.J. Reiling, J. Kuhn, S. Strobl, D. Vitt, J. Leban, O. Planz und S. Ludwig (2013). "The NF- κ B inhibitor SC75741 efficiently blocks influenza virus propagation and confers a high barrier for development of viral resistance." *Cell Microbiol* **15**(7): 1198-211.
- Els, M.C., W.G. Laver und G.M. Air (1989). "Sialic acid is cleaved from glycoconjugates at the cell surface when influenza virus neuraminidases are expressed from recombinant vaccinia viruses." *Virology* **170**(1): 346-51.
- Elton, D., P. Digard, L. Tiley und J. Ortín (2005). Structure and function of the influenza virus RNP. Norfolk, Horizon Scientific Press.
- Fagerlund, R., L. Kinnunen, M. Köhler, I. Julkunen und K. Melén (2005). "NF- κ B is transported into the nucleus by importin- α 3 and importin- α 4." *J Biol Chem* **280**(16): 15942-51.
- Fagotto, F., U. Gluck und B.M. Gumbiner (1998). "Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of beta-catenin." *Curr Biol* **8**(4): 181-90.
- Flick, R. und G. Hobom (1999). "Interaction of influenza virus polymerase with viral RNA in the 'corkscrew' conformation." *J Gen Virol* **80** (Pt 10): 2565-72.
- Fodor, E., B.L. Seong und G.G. Brownlee (1993). "Photochemical cross-linking of influenza A polymerase to its virion RNA promoter defines a polymerase binding site at residues 9 to 12 of the promoter." *J Gen Virol* **74** (Pt 7): 1327-33.
- Foeglein, A., E.M. Loucaides, M. Mura, H.M. Wise, W.S. Barclay und P. Digard (2011). "Influence of PB2 host-range determinants on the intranuclear mobility of the influenza A virus polymerase." *J Gen Virol* **92**(Pt 7): 1650-61.
- Fouchier, R.A., P.M. Schneeberger, F.W. Rozendaal, J.M. Broekman, S.A. Kemink, V. Munster, T. Kuiken, G.F. Rimmelzwaan, M. Schutten, G.J. Van Doornum, G. Koch, A. Bosman, M. Koopmans und A.D. Osterhaus (2004). "Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(5): 1356-61.
- Fraser, C., C.A. Donnelly, S. Cauchemez, W.P. Hanage, M.D. Van Kerkhove, T.D. Hollingsworth, J. Griffin, R.F. Baggaley, H.E. Jenkins, E.J. Lyons, T. Jombart, W.R. Hinsley, N.C. Grassly, F. Balloux, A.C. Ghani, N.M. Ferguson, A. Rambaut, O.G. Pybus, H. Lopez-Gatell, C.M. Alpujch-Aranda, I.B. Chapela, E.P. Zavala, D.M. Guevara, F. Checchi, E. Garcia, S. Hugonnet und C. Roth (2009). "Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early findings." *Science* **324**(5934): 1557-61.
- Fried, H. und U. Kutay (2003). "Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory." *Cell Mol Life Sci* **60**(8): 1659-88.
- Friedrich, B., C. Quensel, T. Sommer, E. Hartmann und M. Köhler (2006). "Nuclear localization signal and protein context both mediate importin- α specificity of nuclear import substrates." *Mol Cell Biol* **26**(23): 8697-709.
- Frieman, M., B. Yount, M. Heise, S.A. Kopecky-Bromberg, P. Palese und R.S. Baric (2007). "Severe acute respiratory syndrome coronavirus ORF6 antagonizes STAT1 function by sequestering nuclear import factors on the rough endoplasmic reticulum/Golgi membrane." *J Virol* **81**(18): 9812-24.
- Fujii, Y., H. Goto, T. Watanabe, T. Yoshida und Y. Kawaoka (2003). "Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(4): 2002-7.
- Gabriel, G. (2006). Dissertation: Untersuchungen zur Adaptation eines hochpathogenen aviären Influenza-A-Virus des H7N7 Subtyps an die Maus. Marburg, Philipps-Universität Marburg.
- Gabriel, G., M. Abram, B. Keiner, R. Wagner, H.D. Klenk und J. Stech (2007). "Differential polymerase activity in avian and mammalian cells determines host range of influenza virus." *J Virol* **81**(17): 9601-4.
- Gabriel, G., V. Czudai-Matwich und H.D. Klenk (2013). "Adaptive mutations in the H5N1 polymerase complex." *Virus Res*.
- Gabriel, G., B. Dauber, T. Wolff, O. Planz, H.D. Klenk und J. Stech (2005). "The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(51): 18590-5.
- Gabriel, G., A. Herwig und H.D. Klenk (2008). "Interaction of polymerase subunit PB2 and NP with importin- α 1 is a determinant of host range of influenza A virus." *PLoS Pathog* **4**(2): e11.

- Gabriel, G., K. Klingel, A. Otte, S. Thiele, B. Hudjetz, G. Arman-Kalceck, M. Sauter, T. Shmidt, F. Rother, S. Baumgarte, B. Keiner, E. Hartmann, M. Bader, G.G. Brownlee, E. Fodor und H.D. Klenk (2011). "Differential use of importin- α isoforms governs cell tropism and host adaptation of influenza virus." *Nat Commun* **2**: 156.
- Gabriel, G., K. Klingel, O. Planz, K. Bier, A. Herwig, M. Sauter und H.D. Klenk (2009). "Spread of infection and lymphocyte depletion in mice depends on polymerase of influenza virus." *Am J Pathol* **175**(3): 1178-86.
- Gack, M.U., R.A. Albrecht, T. Urano, K.S. Inn, I.C. Huang, E. Carnero, M. Farzan, S. Inoue, J.U. Jung und A. Garcia-Sastre (2009). "Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I." *Cell Host Microbe* **5**(5): 439-49.
- Gambotto, A., S.M. Barratt-Boyes, M.D. de Jong, G. Neumann und Y. Kawaoka (2008). "Human infection with highly pathogenic H5N1 influenza virus." *Lancet* **371**(9622): 1464-75.
- Gao, R., B. Cao, Y. Hu, Z. Feng, D. Wang, W. Hu, J. Chen, Z. Jie, H. Qiu, K. Xu, X. Xu, H. Lu, W. Zhu, Z. Gao, N. Xiang, Y. Shen, Z. He, Y. Gu, Z. Zhang, Y. Yang, X. Zhao, L. Zhou, X. Li, S. Zou, Y. Zhang, L. Yang, J. Guo, J. Dong, Q. Li, L. Dong, Y. Zhu, T. Bai, S. Wang, P. Hao, W. Yang, J. Han, H. Yu, D. Li, G.F. Gao, G. Wu, Y. Wang, Z. Yuan und Y. Shu (2013). "Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus." *N Engl J Med* **368**(20): 1888-97.
- Gao, Y., Y. Zhang, K. Shinya, G. Deng, Y. Jiang, Z. Li, Y. Guan, G. Tian, Y. Li, J. Shi, L. Liu, X. Zeng, Z. Bu, X. Xia, Y. Kawaoka und H. Chen (2009). "Identification of amino acids in HA and PB2 critical for the transmission of H5N1 avian influenza viruses in a mammalian host." *PLoS Pathog* **5**(12): e1000709.
- Garten, R.J., C.T. Davis, C.A. Russell, B. Shu, S. Lindstrom, A. Balish, W.M. Sessions, X. Xu, E. Skepner, V. Deyde, M. Okomo-Adhiambo, L. Gubareva, J. Barnes, C.B. Smith, S.L. Emery, M.J. Hillman, P. Rivaller, J. Smagala, M. de Graaf, D.F. Burke, R.A. Fouchier, C. Pappas, C.M. Alpuche-Aranda, H. Lopez-Gatell, H. Olivera, I. Lopez, C.A. Myers, D. Faix, P.J. Blair, C. Yu, K.M. Keene, P.D. Dotson, Jr., D. Boxrud, A.R. Sambol, S.H. Abid, K. St George, T. Bannerman, A.L. Moore, D.J. Stringer, P. Blevins, G.J. Demmler-Harrison, M. Ginsberg, P. Kriner, S. Waterman, S. Smole, H.F. Guevara, E.A. Belongia, P.A. Clark, S.T. Beatrice, R. Donis, J. Katz, L. Finelli, C.B. Bridges, M. Shaw, D.B. Jernigan, T.M. Uyeki, D.J. Smith, A.I. Klimov und N.J. Cox (2009). "Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans." *Science* **325**(5937): 197-201.
- Garten, W. und H.D. Klenk (1999). "Understanding influenza virus pathogenicity." *Trends Microbiol* **7**(3): 99-100.
- Gasiorowski, J.Z. und D.A. Dean (2003). "Mechanisms of nuclear transport and interventions." *Adv Drug Deliv Rev* **55**(6): 703-16.
- Geiss, G.K., M. Salvatore, T.M. Tumpey, V.S. Carter, X. Wang, C.F. Basler, J.K. Taubenberger, R.E. Bumgarner, P. Palese, M.G. Katze und A. Garcia-Sastre (2002). "Cellular transcriptional profiling in influenza A virus-infected lung epithelial cells: the role of the nonstructural NS1 protein in the evasion of the host innate defense and its potential contribution to pandemic influenza." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(16): 10736-41.
- Goldfarb, D.S., A.H. Corbett, D.A. Mason, M.T. Harreman und S.A. Adam (2004). "Importin- α : a multipurpose nuclear-transport receptor." *Trends Cell Biol* **14**(9): 505-14.
- Golebiewski, L., H. Liu, R.T. Javier und A.P. Rice (2011). "The avian influenza virus NS1 ESEV PDZ binding motif associates with Dlg1 and Scribble to disrupt cellular tight junctions." *J Virol* **85**(20): 10639-48.
- Goto, H., K. Wells, A. Takada und Y. Kawaoka (2001). "Plasminogen-binding activity of neuraminidase determines the pathogenicity of influenza A virus." *J Virol* **75**(19): 9297-301.
- Guan, Y., J.S. Peiris, A.S. Lipatov, T.M. Ellis, K.C. Dyrting, S. Krauss, L.J. Zhang, R.G. Webster und K.F. Shortridge (2002). "Emergence of multiple genotypes of H5N1 avian influenza viruses in Hong Kong SAR." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(13): 8950-5.
- Guilligay, D., F. Tarendeau, P. Resa-Infante, R. Coloma, T. Crepin, P. Sehr, J. Lewis, R.W. Ruigrok, J. Ortin, D.J. Hart und S. Cusack (2008). "The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2." *Nat Struct Mol Biol* **15**(5): 500-6.
- Gustin, K.E. (2003). "Inhibition of nucleo-cytoplasmic trafficking by RNA viruses: targeting the nuclear pore complex." *Virus Res* **95**(1-2): 35-44.
- Guu, T.S., L. Dong, P. Wittung-Stafshede und Y.J. Tao (2008). "Mapping the domain structure of the influenza A virus polymerase acidic protein (PA) and its interaction with the basic protein 1 (PB1) subunit." *Virology* **379**(1): 135-42.
- Haenni, S.S., M. Altmeyer, P.O. Hassa, T. Valovka, M. Fey und M.O. Hottiger (2008). "Importin- α binding and nuclear localization of PARP-2 is dependent on lysine 36, which is located within a predicted classical NLS." *BMC Cell Biol* **9**: 39.
- Hammer, Ø., D.A.T. Harper und P.D. Ryan (2001). "PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis." *Palaeontologia Electronica* **4**(1): 9.
- Hara, K., F.I. Schmidt, M. Crow und G.G. Brownlee (2006). "Amino acid residues in the N-terminal region of the PA subunit of influenza A virus RNA polymerase play a critical role in protein stability, endonuclease activity, cap binding, and virion RNA promoter binding." *J Virol* **80**(16): 7789-98.
- Hatta, M., P. Gao, P. Halfmann und Y. Kawaoka (2001). "Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses." *Science* **293**(5536): 1840-2.
- Hatta, M., Y. Hatta, J.H. Kim, S. Watanabe, K. Shinya, T. Nguyen, P.S. Lien, Q.M. Le und Y. Kawaoka (2007). "Growth of H5N1 influenza A viruses in the upper respiratory tracts of mice." *PLoS Pathog* **3**(10): 1374-9.
- Hay, A.J., B. Lomniczi, A.R. Bellamy und J.J. Skehel (1977). "Transcription of the influenza virus genome." *Virology* **83**(2): 337-55.

- He, X., J. Zhou, M. Bartlam, R. Zhang, J. Ma, Z. Lou, X. Li, J. Li, A. Joachimiak, Z. Zeng, R. Ge, Z. Rao und Y. Liu (2008). "Crystal structure of the polymerase PA(C)-PB1(N) complex from an avian influenza H5N1 virus." *Nature* **454**(7208): 1123-6.
- Hemerka, J.N., D. Wang, Y. Weng, W. Lu, R.S. Kaushik, J. Jin, A.F. Harmon und F. Li (2009). "Detection and characterization of influenza A virus PA-PB2 interaction through a bimolecular fluorescence complementation assay." *J Virol* **83**(8): 3944-55.
- Herfst, S., E.J. Schrauwen, M. Linster, S. Chutinimitkul, E. de Wit, V.J. Munster, E.M. Sorrell, T.M. Bestebroer, D.F. Burke, D.J. Smith, G.F. Rimmelzwaan, A.D. Osterhaus und R.A. Fouchier (2012). "Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets." *Science* **336**(6088): 1534-41.
- Hoffmann, E., G. Neumann, Y. Kawaoka, G. Hobom und R.G. Webster (2000). "A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(11): 6108-13.
- Holt, J.E., J.D. Ly-Huynh, A. Efthymiadis, G.R. Hime, K.L. Loveland und D.A. Jans (2007). "Regulation of Nuclear Import During Differentiation; The IMP- α Gene Family and Spermatogenesis." *Curr Genomics* **8**(5): 323-34.
- Horimoto, T. und Y. Kawaoka (1994). "Reverse genetics provides direct evidence for a correlation of hemagglutinin cleavability and virulence of an avian influenza A virus." *J Virol* **68**(5): 3120-8.
- Horimoto, T. und Y. Kawaoka (2005). "Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents." *Nat Rev Microbiol* **3**(8): 591-600.
- Hsu, M.T., J.D. Parvin, S. Gupta, M. Krystal und P. Palese (1987). "Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal panhandle." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(22): 8140-4.
- Hu, J., F. Wang, Y. Yuan, X. Zhu, Y. Wang, Y. Zhang, Z. Kou, S. Wang und S. Gao (2010). "Novel importin-alpha family member Kpna7 is required for normal fertility and fecundity in the mouse." *J Biol Chem* **285**(43): 33113-22.
- Hudjetz, B. und G. Gabriel (2012). "Human-like PB2 627K influenza virus polymerase activity is regulated by importin- α 1 and - α 7." *PLoS Pathog* **8**(1): e1002488.
- Huenniger, K., A. Krämer, M. Soom, I. Chang, M. Köhler, R. Depping, R.H. Kehlenbach und C. Kaether (2010). "Notch1 signaling is mediated by importins- α 3, 4, and 7." *Cell Mol Life Sci* **67**(18): 3187-96.
- Huet, S., S.V. Avilov, L. Ferbitz, N. Daigle, S. Cusack und J. Ellenberg (2010). "Nuclear import and assembly of influenza A virus RNA polymerase studied in live cells by fluorescence cross-correlation spectroscopy." *J Virol* **84**(3): 1254-64.
- Hulse, D.J., R.G. Webster, R.J. Russell und D.R. Perez (2004). "Molecular determinants within the surface proteins involved in the pathogenicity of H5N1 influenza viruses in chickens." *J Virol* **78**(18): 9954-64.
- Hutchinson, E.C. und E. Fodor (2012). "Nuclear import of the influenza A virus transcriptional machinery." *Vaccine* **30**(51): 7353-8.
- Imai, M., T. Watanabe, M. Hatta, S.C. Das, M. Ozawa, K. Shinya, G. Zhong, A. Hanson, H. Katsura, S. Watanabe, C. Li, E. Kawakami, S. Yamada, M. Kiso, Y. Suzuki, E.A. Maher, G. Neumann und Y. Kawaoka (2012). "Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets." *Nature* **486**(7403): 420-8.
- Itman, C., Y. Miyamoto, J. Young, D.A. Jans und K.L. Loveland (2009). "Nucleocytoplasmic transport as a driver of mammalian gametogenesis." *Semin Cell Dev Biol* **20**(5): 607-19.
- Jackson, D., M.J. Hossain, D. Hickman, D.R. Perez und R.A. Lamb (2008). "A new influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(11): 4381-6.
- Jagger, B.W., H.M. Wise, J.C. Kash, K.A. Walters, N.M. Wills, Y.L. Xiao, R.L. Dunfee, L.M. Schwartzman, A. Ozinsky, G.L. Bell, R.M. Dalton, A. Lo, S. Efstathiou, J.F. Atkins, A.E. Firth, J.K. Taubenberger und P. Digard (2012). "An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response." *Science* **337**(6091): 199-204.
- Jain, S., L. Kamimoto, A.M. Bramley, A.M. Schmitz, S.R. Benoit, J. Louie, D.E. Sugerman, J.K. Druckenmiller, K.A. Ritger, R. Chugh, S. Jasuja, M. Deutscher, S. Chen, J.D. Walker, J.S. Duchin, S. Lett, S. Soliva, E.V. Wells, D. Swerdlow, T.M. Uyeki, A.E. Fiore, S.J. Olsen, A.M. Fry, C.B. Bridges und L. Finelli (2009). "Hospitalized patients with 2009 H1N1 influenza in the United States, April-June 2009." *N Engl J Med* **361**(20): 1935-44.
- Jäkel, S., J.M. Mingot, P. Schwarzmaier, E. Hartmann und D. Görlich (2002). "Importins fulfil a dual function as nuclear import receptors and cytoplasmic chaperones for exposed basic domains." *EMBO J* **21**(3): 377-86.
- Jans, D.A., C.Y. Xiao und M.H. Lam (2000). "Nuclear targeting signal recognition: a key control point in nuclear transport?" *Bioessays* **22**(6): 532-44.
- Jansohn, M., Ed. (2007). *Gentechnische Methoden - Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*, Spektrum Akademischer Verlag.
- Jeong, O.M., M.C. Kim, M.J. Kim, H.M. Kang, H.R. Kim, Y.J. Kim, S.J. Joh, J.H. Kwon und Y.J. Lee (2009). "Experimental infection of chickens, ducks and quails with the highly pathogenic H5N1 avian influenza virus." *J Vet Sci* **10**(1): 53-60.
- Jiao, P., G. Tian, Y. Li, G. Deng, Y. Jiang, C. Liu, W. Liu, Z. Bu, Y. Kawaoka und H. Chen (2008). "A single-amino-acid substitution in the NS1 protein changes the pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in mice." *J Virol* **82**(3): 1146-54.

- Kamei, Y., S. Yuba, T. Nakayama und Y. Yoneda (1999). "Three distinct classes of the α -subunit of the nuclear pore-targeting complex (importin- α) are differentially expressed in adult mouse tissues." *J Histochem Cytochem* **47**(3): 363-72.
- Kau, T.R., J.C. Way und P.A. Silver (2004). "Nuclear transport and cancer: from mechanism to intervention." *Nat Rev Cancer* **4**(2): 106-17.
- Kelley, J.B., A.M. Talley, A. Spencer, D. Gioeli und B.M. Paschal (2010). "Karyopherin $\alpha 7$ (KPNA7), a divergent member of the importin alpha family of nuclear import receptors." *BMC Cell Biol* **11**: 63.
- Kilbourne, E.D. (2006). "Influenza pandemics of the 20th century." *Emerg Infect Dis* **12**(1): 9-14.
- King, M.C., C.P. Lusk und G. Blobel (2006). "Karyopherin-mediated import of integral inner nuclear membrane proteins." *Nature* **442**(7106): 1003-7.
- Klenk, H.D., K. Kuroda, E. Kretzschmar, R. Geyer, A. Groner und W. Doerfler (1991). "Processing of influenza virus hemagglutinin in insect cells." *Behring Inst Mitt*(89): 27-34.
- Klenk, H.D., M.N. Matrosovich und J. Stech, Eds. (2008). *Avian Influenza*, S. Karger AG.
- Klumpp, K., R.W. Ruigrok und F. Baudin (1997). "Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure." *EMBO J* **16**(6): 1248-57.
- Knipe, D.M. und P.M. Howley, Eds. (2006). *Fields Virology*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- Kobasa, D., S.M. Jones, K. Shinya, J.C. Kash, J. Copps, H. Ebihara, Y. Hatta, J.H. Kim, P. Halfmann, M. Hatta, F. Feldmann, J.B. Alimonti, L. Fernando, Y. Li, M.G. Katze, H. Feldmann und Y. Kawaoka (2007). "Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus." *Nature* **445**(7125): 319-23.
- Kobasa, D., A. Takada, K. Shinya, M. Hatta, P. Halfmann, S. Theriault, H. Suzuki, H. Nishimura, K. Mitamura, N. Sugaya, T. Usui, T. Murata, Y. Maeda, S. Watanabe, M. Suresh, T. Suzuki, Y. Suzuki, H. Feldmann und Y. Kawaoka (2004). "Enhanced virulence of influenza A viruses with the haemagglutinin of the 1918 pandemic virus." *Nature* **431**(7009): 703-7.
- Kobayashi, M., T. Toyoda und A. Ishihama (1996). "Influenza virus PB1 protein is the minimal and essential subunit of RNA polymerase." *Arch Virol* **141**(3-4): 525-39.
- Kobe, B. (1999). "Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha." *Nat Struct Biol* **6**(4): 388-97.
- Köhler, M., S. Ansieau, S. Prehn, A. Leutz, H. Haller und E. Hartmann (1997). "Cloning of two novel human importin- α subunits and analysis of the expression pattern of the importin- α protein family." *FEBS Lett* **417**(1): 104-8.
- Köhler, M., A. Fiebler, M. Hartwig, S. Thiel, S. Prehn, R. Ketritz, F.C. Luft und E. Hartmann (2002). "Differential expression of classical nuclear transport factors during cellular proliferation and differentiation." *Cell Physiol Biochem* **12**(5-6): 335-44.
- Köhler, M., D. Görlich, E. Hartmann und J. Franke (2001). "Adenoviral E1A protein nuclear import is preferentially mediated by importin- $\alpha 3$ in vitro." *Virology* **289**(2): 186-91.
- Köhler, M., C. Speck, M. Christiansen, F.R. Bischoff, S. Prehn, H. Haller, D. Görlich und E. Hartmann (1999). "Evidence for distinct substrate specificities of importin- α family members in nuclear protein import." *Mol Cell Biol* **19**(11): 7782-91.
- Koopmans, M., B. Wilbrink, M. Conyn, G. Natrop, H. van der Nat, H. Vennema, A. Meijer, J. van Steenberg, R. Fouchier, A. Osterhaus und A. Bosman (2004). "Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands." *Lancet* **363**(9409): 587-93.
- Krug, R.M. (1981). "Priming of influenza viral RNA transcription by capped heterologous RNAs." *Curr Top Microbiol Immunol* **93**: 125-49.
- Krug, R.M., B.A. Broni und M. Bouloy (1979). "Are the 5' ends of influenza viral mRNAs synthesized in vivo donated by host mRNAs?" *Cell* **18**(2): 329-34.
- Kurtz, J., R.J. Manvell und J. Banks (1996). "Avian influenza virus isolated from a woman with conjunctivitis." *Lancet* **348**(9031): 901-2.
- Labadie, K., E. Dos Santos Afonso, M.A. Rameix-Welti, S. van der Werf und N. Naffakh (2007). "Host-range determinants on the PB2 protein of influenza A viruses control the interaction between the viral polymerase and nucleoprotein in human cells." *Virology* **362**(2): 271-82.
- Lamb, R.A. und P.W. Choppin (1983). "The gene structure and replication of influenza virus." *Annu Rev Biochem* **52**: 467-506.
- Lange, A., R.E. Mills, C.J. Lange, M. Stewart, S.E. Devine und A.H. Corbett (2007). "Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin- α ." *J Biol Chem* **282**(8): 5101-5.
- Li, J., M. Ishaq, M. Prudence, X. Xi, T. Hu, Q. Liu und D. Guo (2009). "Single mutation at the amino acid position 627 of PB2 that leads to increased virulence of an H5N1 avian influenza virus during adaptation in mice can be compensated by multiple mutations at other sites of PB2." *Virus Res* **144**(1-2): 123-9.
- Li, K.S., Y. Guan, J. Wang, G.J. Smith, K.M. Xu, L. Duan, A.P. Rahardjo, P. Puthavathana, C. Buranathai, T.D. Nguyen, A.T. Estoepangestie, A. Chaisingh, P. Auewarakul, H.T. Long, N.T. Hanh, R.J. Webby, L.L. Poon, H. Chen, K.F. Shortridge, K.Y. Yuen, R.G. Webster und J.S. Peiris (2004). "Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia." *Nature* **430**(6996): 209-13.
- Li, S., J. Schulman, S. Itamura und P. Palese (1993). "Glycosylation of neuraminidase determines the neurovirulence of influenza A/WSN/33 virus." *J Virol* **67**(11): 6667-73.
- Li, S.Q., M. Orlich und R. Rott (1990). "Generation of seal influenza virus variants pathogenic for chickens, because of hemagglutinin cleavage site changes." *J Virol* **64**(7): 3297-303.

- Li, X. und P. Palese (1994). "Characterization of the polyadenylation signal of influenza virus RNA." *J Virol* **68**(2): 1245-9.
- Li, Z., H. Chen, P. Jiao, G. Deng, G. Tian, Y. Li, E. Hoffmann, R.G. Webster, Y. Matsuoka und K. Yu (2005). "Molecular basis of replication of duck H5N1 influenza viruses in a mammalian mouse model." *J Virol* **79**(18): 12058-64.
- Likos, A.M., D.J. Kelvin, C.M. Cameron, T. Rowe, M.J. Kuehnert und P.J. Norris (2007). "Influenza viremia and the potential for blood-borne transmission." *Transfusion* **47**(6): 1080-8.
- Liu, D., W. Shi, Y. Shi, D. Wang, H. Xiao, W. Li, Y. Bi, Y. Wu, X. Li, J. Yan, W. Liu, G. Zhao, W. Yang, Y. Wang, J. Ma, Y. Shu, F. Lei und G.F. Gao (2013). "Origin and diversity of novel avian influenza A H7N9 viruses causing human infection: phylogenetic, structural, and coalescent analyses." *Lancet* **381**(9881): 1926-32.
- Liu, H., L. Golebiewski, E.C. Dow, R.M. Krug, R.T. Javier und A.P. Rice (2010). "The ESEV PDZ-binding motif of the avian influenza A virus NS1 protein protects infected cells from apoptosis by directly targeting Scribble." *J Virol* **84**(21): 11164-74.
- Lottspeich, F. und H. Zorbas, Eds. (1998). *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag.
- Louie, J.K., M. Acosta, K. Winter, C. Jean, S. Gavali, R. Schechter, D. Vugia, K. Harriman, B. Matyas, C.A. Glaser, M.C. Samuel, J. Rosenberg, J. Talarico und D. Hatch (2009). "Factors associated with death or hospitalization due to pandemic 2009 influenza A(H1N1) infection in California." *JAMA* **302**(17): 1896-902.
- Luo, G.X., W. Luytjes, M. Enami und P. Palese (1991). "The polyadenylation signal of influenza virus RNA involves a stretch of uridines followed by the RNA duplex of the panhandle structure." *J Virol* **65**(6): 2861-7.
- Ma, J. und X. Cao (2006). "Regulation of Stat3 nuclear import by importin- α 5 and importin- α 7 via two different functional sequence elements." *Cell Signal* **18**(8): 1117-26.
- Ma, W., R.E. Kahn und J.A. Richt (2008). "The pig as a mixing vessel for influenza viruses: Human and veterinary implications." *J Mol Genet Med* **3**(1): 158-66.
- Martín-Benito, J., E. Area, J. Ortega, O. Llorca, J.M. Valpuesta, J.L. Carrascosa und J. Ortín (2001). "Three-dimensional reconstruction of a recombinant influenza virus ribonucleoprotein particle." *EMBO Rep* **2**(4): 313-7.
- Martin, K. und A. Helenius (1991). "Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus." *J Virol* **65**(1): 232-44.
- Massin, P., S. van der Werf und N. Naffakh (2001). "Residue 627 of PB2 is a determinant of cold sensitivity in RNA replication of avian influenza viruses." *J Virol* **75**(11): 5398-404.
- Matrosovich, M., T. Matrosovich, W. Garten und H.D. Klenk (2006). "New low-viscosity overlay medium for viral plaque assays." *Virology* **3**: 63.
- Matrosovich, M., N. Zhou, Y. Kawaoka und R. Webster (1999). "The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties." *J Virol* **73**(2): 1146-55.
- Matrosovich, M.N., T.Y. Matrosovich, T. Gray, N.A. Roberts und H.D. Klenk (2004a). "Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(13): 4620-4.
- Matrosovich, M.N., T.Y. Matrosovich, T. Gray, N.A. Roberts und H.D. Klenk (2004b). "Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium." *J Virol* **78**(22): 12665-7.
- Mayer, D., K. Molawi, L. Martinez-Sobrido, A. Ghanem, S. Thomas, S. Baginsky, J. Grossmann, A. García-Sastre und M. Schwemmler (2007). "Identification of cellular interaction partners of the influenza virus ribonucleoprotein complex and polymerase complex using proteomic-based approaches." *J Proteome Res* **6**(2): 672-82.
- McAuley, J.L., F. Hornung, K.L. Boyd, A.M. Smith, R. McKeon, J. Bennink, J.W. Yewdell und J.A. McCullers (2007). "Expression of the 1918 influenza A virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia." *Cell Host Microbe* **2**(4): 240-9.
- Medcalf, L., E. Poole, D. Elton und P. Digard (1999). "Temperature-sensitive lesions in two influenza A viruses defective for replicative transcription disrupt RNA binding by the nucleoprotein." *J Virol* **73**(9): 7349-56.
- Mehle, A. und J.A. Doudna (2008). "An inhibitory activity in human cells restricts the function of an avian-like influenza virus polymerase." *Cell Host Microbe* **4**(2): 111-22.
- Melén, K., R. Fagerlund, J. Franke, M. Köhler, L. Kinnunen und I. Julkunen (2003). "Importin- α nuclear localization signal binding sites for STAT1, STAT2, and influenza A virus nucleoprotein." *J Biol Chem* **278**(30): 28193-200.
- Miller, R.R., 3rd, B.A. Markewitz, R.T. Rolfs, S.M. Brown, K.K. Dascomb, C.K. Grissom, M.D. Friedrichs, J. Mayer, E.L. Hirshberg, J. Conklin, R. Paine, 3rd und N.C. Dean (2009). "Clinical findings and demographic factors associated with ICU admission in Utah due to novel 2009 influenza A(H1N1) infection." *Chest* **137**(4): 752-8.
- Miyamoto, Y., M. Hieda, M.T. Harreman, M. Fukumoto, T. Saiwaki, A.E. Hodel, A.H. Corbett und Y. Yoneda (2002). "Importin- α can migrate into the nucleus in an importin- β - and Ran-independent manner." *EMBO J* **21**(21): 5833-42.
- Miyamoto, Y., T. Saiwaki, J. Yamashita, Y. Yasuda, I. Kotera, S. Shibata, M. Shigeta, Y. Hiraoka, T. Haraguchi und Y. Yoneda (2004). "Cellular stresses induce the nuclear accumulation of importin- α and cause a conventional nuclear import block." *J Cell Biol* **165**(5): 617-23.

- Miyaura, C., E. Abe, T. Suda und T. Kuroki (1985). "Alternative differentiation of human promyelocytic leukemia cells (HL-60) induced selectively by retinoic acid and 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃." *Cancer Res* **45**(9): 4244-8.
- Modrow, S., D. Falke und U. Truyen, Eds. (2003). *Molekulare Virologie*, Spektrum Akademischer Verlag.
- Moeller, A., R.N. Kirchdoerfer, C.S. Potter, B. Carragher und I.A. Wilson (2012). "Organization of the influenza virus replication machinery." *Science* **338**(6114): 1631-4.
- Momose, F., C.F. Basler, R.E. O'Neill, A. Iwamatsu, P. Palese und K. Nagata (2001). "Cellular splicing factor RAF-2p48/NPI-5/BAT1/UAP56 interacts with the influenza virus nucleoprotein and enhances viral RNA synthesis." *J Virol* **75**(4): 1899-908.
- Moncorgé, O., M. Mura und W.S. Barclay (2010). "Evidence for avian and human host cell factors that affect the activity of influenza virus polymerase." *J Virol* **84**(19): 9978-86.
- Morens, D.M., J.K. Taubenberger und A.S. Fauci (2008). "Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness." *J Infect Dis* **198**(7): 962-70.
- Mukaigawa, J. und D.P. Nayak (1991). "Two signals mediate nuclear localization of influenza virus (A/WSN/33) polymerase basic protein 2." *J Virol* **65**(1): 245-53.
- Murao, S., M.A. Gemmell, M.F. Callahan, N.L. Anderson und E. Huberman (1983). "Control of macrophage cell differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and phorbol-12-myristate-13-acetate." *Cancer Res* **43**(10): 4989-96.
- Murti, K.G., R.G. Webster und I.M. Jones (1988). "Localization of RNA polymerases on influenza viral ribonucleoproteins by immunogold labeling." *Virology* **164**(2): 562-6.
- Naffakh, N., A. Tomoiu, M.A. Rameix-Welti und S. van der Werf (2008). "Host restriction of avian influenza viruses at the level of the ribonucleoproteins." *Annu Rev Microbiol* **62**: 403-24.
- Naito, T., F. Momose, A. Kawaguchi und K. Nagata (2007). "Involvement of Hsp90 in assembly and nuclear import of influenza virus RNA polymerase subunits." *J Virol* **81**(3): 1339-49.
- Nakajima, K., U. Desselberger und P. Palese (1978). "Recent human influenza A (H1N1) viruses are closely related genetically to strains isolated in 1950." *Nature* **274**(5669): 334-9.
- Nardozi, J.D., K. Lott und G. Cingolani (2010). "Phosphorylation meets nuclear import: a review." *Cell Commun Signal* **8**: 32.
- Nath, S.T. und D.P. Nayak (1990). "Function of two discrete regions is required for nuclear localization of polymerase basic protein 1 of A/WSN/33 influenza virus (H1 N1)." *Mol Cell Biol* **10**(8): 4139-45.
- Neumann, G., G.G. Brownlee, E. Fodor und Y. Kawaoka (2004). "Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation." *Curr Top Microbiol Immunol* **283**: 121-43.
- Neumann, G., T. Noda und Y. Kawaoka (2009). "Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus." *Nature* **459**(7249): 931-9.
- Neumann, G., T. Watanabe, H. Ito, S. Watanabe, H. Goto, P. Gao, M. Hughes, D.R. Perez, R. Donis, E. Hoffmann, G. Hobom und Y. Kawaoka (1999). "Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(16): 9345-50.
- Ng, A.K., M.K. Lam, H. Zhang, J. Liu, S.W. Au, P.K. Chan, J. Wang und P.C. Shaw (2012). "Structural basis for RNA binding and homo-oligomer formation by influenza B virus nucleoprotein." *J Virol* **86**(12): 6758-67.
- Ng, A.K., H. Zhang, K. Tan, Z. Li, J.H. Liu, P.K. Chan, S.M. Li, W.Y. Chan, S.W. Au, A. Joachimiak, T. Walz, J.H. Wang und P.C. Shaw (2008). "Structure of the influenza virus A H5N1 nucleoprotein: implications for RNA binding, oligomerization, and vaccine design." *FASEB J* **22**(10): 3638-47.
- Nieto, A., S. de la Luna, J. Bárcena, A. Portela und J. Ortín (1994). "Complex structure of the nuclear translocation signal of influenza virus polymerase PA subunit." *J Gen Virol* **75** (Pt 1): 29-36.
- Nitahara-Kasahara, Y., M. Kamata, T. Yamamoto, X. Zhang, Y. Miyamoto, K. Muneta, S. Iijima, Y. Yoneda, Y. Tsunetsugu-Yokota und Y. Aida (2007). "Novel nuclear import of Vpr promoted by importin- α is crucial for human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages." *J Virol* **81**(10): 5284-93.
- Noda, T. (2012). "Native morphology of influenza virions." *Front Microbiol* **2**: 269.
- Noda, T. und Y. Kawaoka (2010). "Structure of influenza virus ribonucleoprotein complexes and their packaging into virions." *Rev Med Virol* **20**(6): 380-91.
- Noda, T., H. Sagara, A. Yen, A. Takada, H. Kida, R.H. Cheng und Y. Kawaoka (2006). "Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles." *Nature* **439**(7075): 490-2.
- Noda, T., Y. Sugita, K. Aoyama, A. Hirase, E. Kawakami, A. Miyazawa, H. Sagara und Y. Kawaoka (2012). "Three-dimensional analysis of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus." *Nat Commun* **3**: 639.
- Obayashi, E., H. Yoshida, F. Kawai, N. Shibayama, A. Kawaguchi, K. Nagata, J.R. Tame und S.Y. Park (2008). "The structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase." *Nature* **454**(7208): 1127-31.
- Ogawa, T. und M. Ueda (1981). "Genes involved in the virulence of an avian influenza virus." *Virology* **113**(1): 304-13.
- Okada, N., Y. Ishigami, T. Suzuki, A. Kaneko, K. Yasui, R. Fukutomi und M. Isemura (2008). "Importins and exportins in cellular differentiation." *J Cell Mol Med* **12**(5B): 1863-71.
- Pal, S., A. Santos, J.M. Rosas, J. Ortiz-Guzman und G. Rosas-Acosta (2011). "Influenza A virus interacts extensively with the cellular SUMOylation system during infection." *Virus Res* **158**(1-2): 12-27.
- Palese, P. und R.W. Compans (1976). "Inhibition of influenza virus replication in tissue culture by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA): mechanism of action." *J Gen Virol* **33**(1): 159-63.
- Palese, P., K. Tobita, M. Ueda und R.W. Compans (1974). "Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase." *Virology* **61**(2): 397-410.

- Patel, S.S., B.J. Belmont, J.M. Sante und M.F. Rexach (2007). "Natively unfolded nucleoporins gate protein diffusion across the nuclear pore complex." *Cell* **129**(1): 83-96.
- Peifer, M., S. Berg und A.B. Reynolds (1994). "A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles." *Cell* **76**(5): 789-91.
- Pemberton, L.F. und B.M. Paschal (2005). "Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export." *Traffic* **6**(3): 187-98.
- Peng, X., Y. Zhang, H. Zhang, S. Graner, J.F. Williams, M.L. Levitt und A. Lokshin (1999). "Interaction of tissue transglutaminase with nuclear transport protein importin- α ." *FEBS Lett* **446**(1): 35-9.
- Perez-Terzic, C., R.S. Faustino, B.J. Boorsma, D.K. Arrell, N.J. Niederlander, A. Behfar und A. Terzic (2007). "Stem cells transform into a cardiac phenotype with remodeling of the nuclear transport machinery." *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* **4 Suppl 1**: S68-76.
- Pickard, B.W., A.B. Hodsmann, L.J. Fraher und P.H. Watson (2006). "Type 1 parathyroid hormone receptor (PTH1R) nuclear trafficking: association of PTH1R with importin- α 1 and β ." *Endocrinology* **147**(7): 3326-32.
- Poch, O., I. Sauvaget, M. Delarue und N. Tordo (1989). "Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements." *EMBO J* **8**(12): 3867-74.
- Poland, G.A., R.M. Jacobson und I.G. Ovsyannikova (2009). "Influenza virus resistance to antiviral agents: a plea for rational use." *Clin Infect Dis* **48**(9): 1254-6.
- Poon, I.K. und D.A. Jans (2005). "Regulation of nuclear transport: central role in development and transformation?" *Traffic* **6**(3): 173-86.
- Portela, A. und P. Digard (2002). "The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication." *J Gen Virol* **83**(Pt 4): 723-34.
- Potter, C.W. (2001). "A history of influenza." *J Appl Microbiol* **91**(4): 572-9.
- Puthavathana, P., P. Auewarakul, P.C. Charoenying, K. Sangsiriwut, P. Pooruk, K. Boonnak, R. Khanyok, P. Thawachsupa, R. Kijphati und P. Sawanpanyalert (2005). "Molecular characterization of the complete genome of human influenza H5N1 virus isolates from Thailand." *J Gen Virol* **86**(Pt 2): 423-33.
- Quensel, C., B. Friedrich, T. Sommer, E. Hartmann und M. Köhler (2004). "In vivo analysis of importin- α proteins reveals cellular proliferation inhibition and substrate specificity." *Mol Cell Biol* **24**(23): 10246-55.
- Ramakers, C., J.M. Ruijter, R.H. Deprez und A.F. Moorman (2003). "Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data." *Neurosci Lett* **339**(1): 62-6.
- Ratan, R., D.A. Mason, B. Sinnot, D.S. Goldfarb und R.J. Fleming (2008). "Drosophila importin- α 1 performs paralog-specific functions essential for gametogenesis." *Genetics* **178**(2): 839-50.
- Reed, L.J. und H. Muench (1938). "A simple method of estimating fifty percent endpoints." *The American Journal of Hygiene* **27**: 493-497.
- Reichelt, R., A. Holzenburg, E.L. Buhle, Jr., M. Jarnik, A. Engel und U. Aebi (1990). "Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components." *J Cell Biol* **110**(4): 883-94.
- Reid, A.H., T.G. Fanning, J.V. Hultin und J.K. Taubenberger (1999). "Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus hemagglutinin gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(4): 1651-6.
- Reid, S.P., L.W. Leung, A.L. Hartman, O. Martinez, M.L. Shaw, C. Carbonnelle, V.E. Volchkov, S.T. Nichol und C.F. Basler (2006). "Ebola virus VP24 binds karyopherin- α 1 and blocks STAT1 nuclear accumulation." *J Virol* **80**(11): 5156-67.
- Reperant, L.A., T. Kuiken und A.D. Osterhaus (2012). "Adaptive pathways of zoonotic influenza viruses: from exposure to establishment in humans." *Vaccine* **30**(30): 4419-34.
- Resa-Infante, P. und G. Gabriel (2013). "The nuclear import machinery is a determinant of influenza virus host adaptation." *Bioessays* **35**(1): 23-7.
- Resa-Infante, P., N. Jorba, R. Coloma und J. Ortín (2011). "The influenza virus RNA synthesis machine: advances in its structure and function." *RNA Biol* **8**(2): 207-15.
- Resa-Infante, P., N. Jorba, N. Zamarreno, Y. Fernandez, S. Juarez und J. Ortín (2008). "The host-dependent interaction of alpha-importins with influenza PB2 polymerase subunit is required for virus RNA replication." *PLoS One* **3**(12): e3904.
- Riquelme, A., M. Alvarez-Lobos, C. Pavez, P. Hasbun, J. Dabanch, C. Cofre, J. Jimenez und M. Calvo (2009). "Gastrointestinal manifestations among Chilean patients infected with novel influenza A (H1N1) 2009 virus." *Gut* **58**(11): 1567-8.
- Ririe, K.M., R.P. Rasmussen und C.T. Wittwer (1997). "Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction." *Anal Biochem* **245**(2): 154-60.
- Robertson, J.S., M. Schubert und R.A. Lazzarini (1981). "Polyadenylation sites for influenza virus mRNA." *J Virol* **38**(1): 157-63.
- Rother, F., T. Schmidt, E. Popova, A. Krivokharchenko, S. Hügel, L. Vilianovich, M. Ridders, K. Tenner, N. Alenina, M. Köhler, E. Hartmann und M. Bader (2011). "Importin- α 7 is essential for zygotic genome activation and early mouse development." *PLoS One* **6**(3): e18310.
- Rott, R., M. Orlich und C. Scholtissek (1976). "Attenuation of pathogenicity of fowl plague virus by recombination with other influenza A viruses nonpathogenic for fowl: nonexclusive dependence of pathogenicity on hemagglutinin and neuraminidase of the virus." *J Virol* **19**(1): 54-60.
- Rout, M.P. und J.D. Aitchison (2000). "Pore relations: nuclear pore complexes and nucleocytoplasmic exchange." *Essays Biochem* **36**: 75-88.
- Rout, M.P. und S.R. Wente (1994). "Pores for thought: nuclear pore complex proteins." *Trends Cell Biol* **4**(10): 357-65.

- Ruigrok, R.W., T. Crepin, D.J. Hart und S. Cusack (2010). "Towards an atomic resolution understanding of the influenza virus replication machinery." *Curr Opin Struct Biol* **20**(1): 104-13.
- Ruijter, J.M., C. Ramakers, W.M. Hoogaars, Y. Karlen, O. Bakker, M.J. van den Hoff und A.F. Moorman (2009). "Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data." *Nucleic Acids Res* **37**(6): e45.
- Ruijter, J.M., S. van der Velden und A. IJgun (2010). *LinRegPCR (11.0) - Analysis of quantitative RT-PCR data (Manual)*, Heart Failure Research Center, Academic Medical Center, Amsterdam, the Netherlands.
- Russell, C.A., J.M. Fonville, A.E. Brown, D.F. Burke, D.L. Smith, S.L. James, S. Herfst, S. van Boheemen, M. Linster, E.J. Schrauwen, L. Katzelnick, A. Mosterin, T. Kuiken, E. Maher, G. Neumann, A.D. Osterhaus, Y. Kawaoka, R.A. Fouchier und D.J. Smith (2012). "The potential for respiratory droplet-transmissible A/H5N1 influenza virus to evolve in a mammalian host." *Science* **336**(6088): 1541-7.
- Sakakida, Y., Y. Miyamoto, E. Nagoshi, M. Akashi, T.J. Nakamura, T. Mamime, M. Kasahara, Y. Minami, Y. Yoneda und T. Takumi (2005). "Importin- α/β mediates nuclear transport of a mammalian circadian clock component, mCRY2, together with mPER2, through a bipartite nuclear localization signal." *J Biol Chem* **280**(14): 13272-8.
- Salomon, R., J. Franks, E.A. Govorkova, N.A. Ilyushina, H.L. Yen, D.J. Hulse-Post, J. Humberd, M. Trichet, J.E. Rehg, R.J. Webby, R.G. Webster und E. Hoffmann (2006). "The polymerase complex genes contribute to the high virulence of the human H5N1 influenza virus isolate A/Vietnam/1203/04." *J Exp Med* **203**(3): 689-97.
- Sambrook, J. und D. Russell, Eds. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Satterly, N., P.L. Tsai, J. van Deursen, D.R. Nussenzveig, Y. Wang, P.A. Faria, A. Levay, D.E. Levy und B.M. Fontoura (2007). "Influenza virus targets the mRNA export machinery and the nuclear pore complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(6): 1853-8.
- Schäfer, W. (1955). "Sero-immunologic studies on incomplete forms of the virus of classical fowl plague. (In German)." *Arch. Exp. Vet. Med.* **9**: 218-230.
- Scheiblaue, H., A.P. Kendal und R. Rott (1995). "Pathogenicity of influenza A/Seal/Mass/1/80 virus mutants for mammalian species." *Arch Virol* **140**(2): 341-8.
- Scholtissek, C., A. Vallbracht, B. Flehmig und R. Rott (1979). "Correlation of pathogenicity and gene constellation of influenza A viruses. II. Highly neurovirulent recombinants derived from non-neurovirulent or weakly neurovirulent parent virus strains." *Virology* **95**(2): 492-500.
- Seo, S.H., E. Hoffmann und R.G. Webster (2002). "Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses." *Nat Med* **8**(9): 950-4.
- Shieh, W.J., D.M. Blau, A.M. Denison, M. DeLeon-Carnes, P. Adem, J. Bhatnagar, J. Sumner, L. Liu, M. Patel, B. Batten, P. Greer, T. Jones, C. Smith, J. Bartlett, J. Montague, E. White, D. Rollin, R. Gao, C. Seales, H. Jost, M. Metcalfe, C.S. Goldsmith, C. Humphrey, A. Schmitz, C. Drew, C. Paddock, T.M. Uyeki und S.R. Zaki (2010). "2009 pandemic influenza A (H1N1): pathology and pathogenesis of 100 fatal cases in the United States." *Am J Pathol* **177**(1): 166-75.
- Shinya, K., M. Ebina, S. Yamada, M. Ono, N. Kasai und Y. Kawaoka (2006). "Avian flu: influenza virus receptors in the human airway." *Nature* **440**(7083): 435-6.
- Shinya, K., A. Makino, M. Ozawa, J.H. Kim, Y. Sakai-Tagawa, M. Ito, Q.M. Le und Y. Kawaoka (2009). "Ostrich involvement in the selection of H5N1 influenza virus possessing mammalian-type amino acids in the PB2 protein." *J Virol* **83**(24): 13015-8.
- Shinya, K., S. Watanabe, T. Ito, N. Kasai und Y. Kawaoka (2007). "Adaptation of an H7N7 equine influenza A virus in mice." *J Gen Virol* **88**(Pt 2): 547-53.
- Shmidt, T., F. Hampich, M. Ridder, S. Schultrich, V.H. Hans, K. Tenner, L. Vilianovich, F. Qadri, N. Alenina, E. Hartmann, M. Köhler und M. Bader (2007). "Normal brain development in importin- $\alpha 5$ deficient-mice." *Nat Cell Biol* **9**(12): 1337-8; author reply 1339.
- Shope, R.E. (1931). "Swine Influenza. III. Filtration Experiments and Etiology." *Journal of Experimental Medicine* **54**: 373-385.
- Sieczkarski, S.B. und G.R. Whittaker (2005). "Viral entry." *Curr Top Microbiol Immunol* **285**: 1-23.
- Smith, G.J., X.H. Fan, J. Wang, K.S. Li, K. Qin, J.X. Zhang, D. Vijaykrishna, C.L. Cheung, K. Huang, J.M. Rayner, J.S. Peiris, H. Chen, R.G. Webster und Y. Guan (2006). "Emergence and predominance of an H5N1 influenza variant in China." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(45): 16936-41.
- Smith, W., C.H. Andrewes und P.P. Laidlaw (1933). "A Virus Obtained From Influenza Patients." *The Lancet* **222**: 66-68.
- Sorokin, A.V., E.R. Kim und L.P. Ovchinnikov (2007). "Nucleocytoplasmic transport of proteins." *Biochemistry (Mosc)* **72**(13): 1439-57.
- Steel, J., A.C. Lowen, S. Mubareka und P. Palese (2009). "Transmission of influenza virus in a mammalian host is increased by PB2 amino acids 627K or 627E/701N." *PLoS Pathog* **5**(1): e1000252.
- Stegmann, T. (2000). "Membrane fusion mechanisms: the influenza hemagglutinin paradigm and its implications for intracellular fusion." *Traffic* **1**(8): 598-604.
- Steinhauer, D.A. (1999). "Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus." *Virology* **258**(1): 1-20.
- Stewart, M. (2007). "Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(3): 195-208.
- Stoffler, D., B. Fahrenkrog und U. Aebi (1999). "The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics." *Curr Opin Cell Biol* **11**(3): 391-401.

- Subbarao, E.K., W. London und B.R. Murphy (1993). "A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range." *J Virol* **67**(4): 1761-4.
- Subbarao, K. und J. Katz (2000). "Avian influenza viruses infecting humans." *Cell Mol Life Sci* **57**(12): 1770-84.
- Subbarao, K., A. Klimov, J. Katz, H. Regnery, W. Lim, H. Hall, M. Perdue, D. Swayne, C. Bender, J. Huang, M. Hemphill, T. Rowe, M. Shaw, X. Xu, K. Fukuda und N. Cox (1998). "Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness." *Science* **279**(5349): 393-6.
- Sugiyama, K., E. Obayashi, A. Kawaguchi, Y. Suzuki, J.R. Tame, K. Nagata und S.Y. Park (2009). "Structural insight into the essential PB1-PB2 subunit contact of the influenza virus RNA polymerase." *EMBO J* **28**(12): 1803-11.
- Suntharalingam, M. und S.R. Wente (2003). "Peering through the pore: nuclear pore complex structure, assembly, and function." *Dev Cell* **4**(6): 775-89.
- Suzuki, T., Y. Ishigami, N. Okada, A. Kaneko, R. Fukutomi und M. Isemura (2008). "Differentiation-associated alteration in gene expression of importins and exportins in human leukemia HL-60 cells." *Biomed Res* **29**(3): 141-5.
- Suzuki, T., H. Tazoe, K. Taguchi, Y. Koyama, H. Ichikawa, S. Hayakawa, H. Munakata und M. Isemura (2006). "DNA microarray analysis of changes in gene expression induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human promyelocytic leukemia HL-60 cells." *Biomed Res* **27**(3): 99-109.
- Tao, Y.J. und W. Zheng (2012). "Biochemistry. Visualizing the influenza genome." *Science* **338**(6114): 1545-6.
- Tarendeau, F., J. Boudet, D. Guilligay, P.J. Mas, C.M. Bougault, S. Boulo, F. Baudin, R.W. Ruigrok, N. Daigle, J. Ellenberg, S. Cusack, J.P. Simorre und D.J. Hart (2007). "Structure and nuclear import function of the C-terminal domain of influenza virus polymerase PB2 subunit." *Nat Struct Mol Biol* **14**(3): 229-33.
- Tarendeau, F., T. Crepin, D. Guilligay, R.W. Ruigrok, S. Cusack und D.J. Hart (2008). "Host determinant residue lysine 627 lies on the surface of a discrete, folded domain of influenza virus polymerase PB2 subunit." *PLoS Pathog* **4**(8): e1000136.
- Taubenberger, J.K., A.H. Reid, A.E. Krafft, K.E. Bijwaard und T.G. Fanning (1997). "Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus." *Science* **275**(5307): 1793-6.
- Taylor, S.L., N. Frias-Staheli, A. Garcia-Sastre und C.S. Schmaljohn (2009). "Hantaan virus nucleocapsid protein binds to importin- α proteins and inhibits tumor necrosis factor α -induced activation of nuclear factor κ B." *J Virol* **83**(3): 1271-9.
- Terry, L.J., E.B. Shows und S.R. Wente (2007). "Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport." *Science* **318**(5855): 1412-6.
- Thanh, T.T., H.R. van Doorn und M.D. de Jong (2008). "Human H5N1 influenza: current insight into pathogenesis." *Int J Biochem Cell Biol* **40**(12): 2671-4.
- Theiss, A.L., A.K. Jenkins, N.I. Okoro, J.M. Klapproth, D. Merlin und S.V. Sitaraman (2009). "Prohibitin inhibits tumor necrosis factor α -induced nuclear factor- κ B nuclear translocation via the novel mechanism of decreasing importin- α 3 expression." *Mol Biol Cell* **20**(20): 4412-23.
- Thomas, M., C. Kranjec, K. Nagasaka, G. Matlashewski und L. Banks (2011). "Analysis of the PDZ binding specificities of Influenza A virus NS1 proteins." *Virol J* **8**: 25.
- Tsuji, L., T. Takumi, N. Imamoto und Y. Yoneda (1997). "Identification of novel homologues of mouse importin- α , the α subunit of the nuclear pore-targeting complex, and their tissue-specific expression." *FEBS Lett* **416**(1): 30-4.
- Tumpey, T.M., C.F. Basler, P.V. Aguilar, H. Zeng, A. Solorzano, D.E. Swayne, N.J. Cox, J.M. Katz, J.K. Taubenberger, P. Palese und A. Garcia-Sastre (2005). "Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus." *Science* **310**(5745): 77-80.
- Tumpey, T.M., A. Garcia-Sastre, A. Mikulasova, J.K. Taubenberger, D.E. Swayne, P. Palese und C.F. Basler (2002). "Existing antivirals are effective against influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(21): 13849-54.
- Tumpey, T.M., A. Garcia-Sastre, J.K. Taubenberger, P. Palese, D.E. Swayne und C.F. Basler (2004). "Pathogenicity and immunogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(9): 3166-71.
- Twu, K.Y., R.L. Kuo, J. Marklund und R.M. Krug (2007). "The H5N1 influenza virus NS genes selected after 1998 enhance virus replication in mammalian cells." *J Virol* **81**(15): 8112-21.
- Umegaki, N., K. Tamai, H. Nakano, R. Moritsugu, T. Yamazaki, K. Hanada, I. Katayama und Y. Kaneda (2007). "Differential regulation of karyopherin α 2 expression by TGF- β 1 and IFN- γ in normal human epidermal keratinocytes: evident contribution of KPNA2 for nuclear translocation of IRF-1." *J Invest Dermatol* **127**(6): 1456-64.
- Ungchusak, K., P. Auewarakul, S.F. Dowell, R. Kitphati, W. Auwanit, P. Puthavathana, M. Uprasertkul, K. Boonnak, C. Pittayawonganon, N.J. Cox, S.R. Zaki, P. Thawatsupha, M. Chittaganpitch, R. Khontong, J.M. Simmerman und S. Chunsuttiwat (2005). "Probable person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1)." *N Engl J Med* **352**(4): 333-40.
- van der Giessen, K. und I.E. Gallouzi (2007). "Involvement of transportin 2-mediated HuR import in muscle cell differentiation." *Mol Biol Cell* **18**(7): 2619-29.
- van der Velden, V.H., A. Hochhaus, G. Cazzaniga, T. Szczepanski, J. Gabert und J.J. van Dongen (2003). "Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects." *Leukemia* **17**(6): 1013-34.
- Van Hoesen, N., C. Pappas, J.A. Belsler, T.R. Maines, H. Zeng, A. Garcia-Sastre, R. Sasisekharan, J.M. Katz und T.M. Tumpey (2009). "Human HA and polymerase subunit PB2 proteins confer transmission of an avian influenza virus through the air." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(9): 3366-71.

- van Riel, D., M.A. den Bakker, L.M. Leijten, S. Chutinimitkul, V.J. Munster, E. de Wit, G.F. Rimmelzwaan, R.A. Fouchier, A.D. Osterhaus und T. Kuiken (2010). "Seasonal and pandemic human influenza viruses attach better to human upper respiratory tract epithelium than avian influenza viruses." *Am J Pathol* **176**(4): 1614-8.
- van Riel, D., V.J. Munster, E. de Wit, G.F. Rimmelzwaan, R.A. Fouchier, A.D. Osterhaus und T. Kuiken (2006). "H5N1 Virus Attachment to Lower Respiratory Tract." *Science* **312**(5772): 399.
- van Riel, D., V.J. Munster, E. de Wit, G.F. Rimmelzwaan, R.A. Fouchier, A.D. Osterhaus und T. Kuiken (2007). "Human and avian influenza viruses target different cells in the lower respiratory tract of humans and other mammals." *Am J Pathol* **171**(4): 1215-23.
- Varghese, J.N., W.G. Laver und P.M. Colman (1983). "Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution." *Nature* **303**(5912): 35-40.
- Wang, H., Z. Feng, Y. Shu, H. Yu, L. Zhou, R. Zu, Y. Huai, J. Dong, C. Bao, L. Wen, P. Yang, W. Zhao, L. Dong, M. Zhou, Q. Liao, H. Yang, M. Wang, X. Lu, Z. Shi, W. Wang, L. Gu, F. Zhu, Q. Li, W. Yin, W. Yang, D. Li, T.M. Uyeki und Y. Wang (2008). "Probable limited person-to-person transmission of highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus in China." *Lancet* **371**(9622): 1427-34.
- Wang, P., P. Palese und R.E. O'Neill (1997). "The NP1-1/NP1-3 (karyopherin α) binding site on the influenza A virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear localization signal." *J Virol* **71**(3): 1850-6.
- Wang, X., K.E. Park, S. Koser, S. Liu, L. Magnani und R.A. Cabot (2012). "KPNA7, an oocyte- and embryo-specific karyopherin- α subtype, is required for porcine embryo development." *Reprod Fertil Dev* **24**(2): 382-91.
- Watanabe, T., M. Kiso, S. Fukuyama, N. Nakajima, M. Imai, S. Yamada, S. Murakami, S. Yamayoshi, K. Iwatsuki-Horimoto, Y. Sakoda, E. Takashita, R. McBride, T. Noda, M. Hatta, H. Imai, D. Zhao, N. Kishida, M. Shirakura, R.P. de Vries, S. Shichinohe, M. Okamatsu, T. Tamura, Y. Tomita, N. Fujimoto, K. Goto, H. Katsura, E. Kawakami, I. Ishikawa, S. Watanabe, M. Ito, Y. Sakai-Tagawa, Y. Sugita, R. Uraki, R. Yamaji, A.J. Einfeld, G. Zhong, S. Fan, J. Ping, E.A. Maher, A. Hanson, Y. Uchida, T. Saito, M. Ozawa, G. Neumann, H. Kida, T. Odagiri, J.C. Paulson, H. Hasegawa, M. Tashiro und Y. Kawaoka (2013). "Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans." *Nature*.
- Watanabe, T., S. Watanabe, K. Shinya, J.H. Kim, M. Hatta und Y. Kawaoka (2009). "Viral RNA polymerase complex promotes optimal growth of 1918 virus in the lower respiratory tract of ferrets." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(2): 588-92.
- Webster, R.G., W.J. Bean, O.T. Gorman, T.M. Chambers und Y. Kawaoka (1992). "Evolution and ecology of influenza A viruses." *Microbiol Rev* **56**(1): 152-79.
- Webster, R.G. und W.J. Bean, Jr. (1978). "Genetics of influenza virus." *Annu Rev Genet* **12**: 415-31.
- Webster, R.G., J. Geraci, G. Petursson und K. Skirnisson (1981a). "Conjunctivitis in human beings caused by influenza A virus of seals." *N Engl J Med* **304**(15): 911.
- Webster, R.G., V.S. Hinshaw, W.J. Bean, K.L. Van Wyke, J.R. Geraci, D.J. St Aubin und G. Petursson (1981b). "Characterization of an influenza A virus from seals." *Virology* **113**(2): 712-24.
- Webster, R.G. und R. Rott (1987). "Influenza virus A pathogenicity: the pivotal role of hemagglutinin." *Cell* **50**(5): 665-6.
- Webster, R.G., M. Yakhno, V.S. Hinshaw, W.J. Bean und K.G. Murti (1978). "Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks." *Virology* **84**(2): 268-78.
- Welch, K., J. Franke, M. Kohler und I.G. Macara (1999). "RanBP3 contains an unusual nuclear localization signal that is imported preferentially by importin- α 3." *Mol Cell Biol* **19**(12): 8400-11.
- Wilson, I.A., J.J. Skehel und D.C. Wiley (1981). "Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution." *Nature* **289**(5796): 366-73.
- Winnepenninckx, V., V. Lazar, S. Michiels, P. Dessen, M. Stas, S.R. Alonso, M.F. Avril, P.L. Ortiz Romero, T. Robert, O. Balacescu, A.M. Eggermont, G. Lenoir, A. Sarasin, T. Tursz, J.J. van den Oord und A. Spatz (2006). "Gene expression profiling of primary cutaneous melanoma and clinical outcome." *J Natl Cancer Inst* **98**(7): 472-82.
- Wise, H.M., A. Foeglein, J. Sun, R.M. Dalton, S. Patel, W. Howard, E.C. Anderson, W.S. Barclay und P. Digard (2009). "A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA." *J Virol* **83**(16): 8021-31.
- Xu, C., W.B. Hu, K. Xu, Y.X. He, T.Y. Wang, Z. Chen, T.X. Li, J.H. Liu, P. Buchy und B. Sun (2012). "Amino acids 473V and 598P of PB1 from an avian-origin influenza A virus contribute to polymerase activity, especially in mammalian cells." *J Gen Virol* **93**(Pt 3): 531-40.
- Yamada, S., M. Hatta, B.L. Staker, S. Watanabe, M. Imai, K. Shinya, Y. Sakai-Tagawa, M. Ito, M. Ozawa, T. Watanabe, S. Sakabe, C. Li, J.H. Kim, P.J. Myler, I. Phan, A. Raymond, E. Smith, R. Stacy, C.A. Nidom, S.M. Lank, R.W. Wiseman, B.N. Bimber, D.H. O'Connor, G. Neumann, L.J. Stewart und Y. Kawaoka (2010). "Biological and structural characterization of a host-adapting amino acid in influenza virus." *PLoS Pathog* **6**(8): e1001034.
- Yasuda, Y., Y. Miyamoto, T. Yamashiro, M. Asally, A. Masui, C. Wong, K.L. Loveland und Y. Yoneda (2012). "Nuclear retention of importin- α coordinates cell fate through changes in gene expression." *EMBO J* **31**(1): 83-94.
- Yasuhara, N., M. Oka und Y. Yoneda (2009). "The role of the nuclear transport system in cell differentiation." *Semin Cell Dev Biol* **20**(5): 590-9.
- Yasuhara, N., N. Shibazaki, S. Tanaka, M. Nagai, Y. Kamikawa, S. Oe, M. Asally, Y. Kamachi, H. Kondoh und Y. Yoneda (2007). "Triggering neural differentiation of ES cells by subtype switching of importin- α ." *Nat Cell Biol* **9**(1): 72-9.

- Ye, Q., R.M. Krug und Y.J. Tao (2006). "The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA." *Nature* **444**(7122): 1078-82.
- Yeung, P.L., L.Y. Chen, S.C. Tsai, A. Zhang und J.D. Chen (2008). "Daxx contains two nuclear localization signals and interacts with importin- α 3." *J Cell Biochem* **103**(2): 456-70.
- Yuan, P., M. Bartlam, Z. Lou, S. Chen, J. Zhou, X. He, Z. Lv, R. Ge, X. Li, T. Deng, E. Fodor, Z. Rao und Y. Liu (2009). "Crystal structure of an avian influenza polymerase PA(N) reveals an endonuclease active site." *Nature* **458**(7240): 909-13.
- Zebedee, S.L. und R.A. Lamb (1988). "Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions." *J Virol* **62**(8): 2762-72.
- Zheng, W. und Y.J. Tao (2013). "Structure and assembly of the influenza A virus ribonucleoprotein complex." *FEBS Lett* **587**(8): 1206-14.
- Zhou, B., Y. Li, R. Halpin, E. Hine, D.J. Spiro und D.E. Wentworth (2011). "PB2 residue 158 is a pathogenic determinant of pandemic H1N1 and H5 influenza A viruses in mice." *J Virol* **85**(1): 357-65.

9 Abbildungsverzeichnis

1. Auftreten pandemischer Influenza A Viren.....	7
2. Morphologie des Influenza A Virions	11
3. Die Struktur des Influenza A Virus RNPs.....	14
4. Struktur und funktionelle Domänen der Influenza A Virus Polymerase	16
5. Schematische Darstellung des Influenza A Virus Replikationszyklus.....	17
6. Strukturelle und mechanistische Unterschiede zwischen der Transkription und Replikation von Influenza A Viren	19
7. Funktionelle Domänen der viralen Polymerase und NP sowie ihre wirtsadaptiven Signaturen.....	23
8. Konformationsänderung von PB2.....	27
9. Die dynamische und vielfältige Regulierung der nukleozytoplasmatischen Transportprozesse.....	29
10. Schematische Darstellung des Kernporenkomplexes (NPC) und repräsentativer FG-Nups.....	30
11. Übersicht des klassischen Importin- α/β Kerntransportwegs.....	32
12. Bildung von Importin- α Cargokomplexen im Zytoplasma.....	35
13. Potenzielle Funktionen der Importproteine beiderseits der Kernmembran.....	39
14. <i>SYBR Green I</i> in der RT-qPCR	68
15. Reaktionskinetik in der quantitativen <i>Real-time</i> PCR.....	69
16. Ermittlung des CT-Wertes	74
17. Polymeraseaktivität von HPAIV H7N7 in Importin- α 3 herabregulierten humanen Zellen	90
18. Bestimmung der Importin- α 3 Proteinlevel nach Infektion mit HPAIV H7N7 Influenzaviren <i>in vitro</i>	91
19. Wachstumsverhalten des aviären HPAIV SC35 (H7N7) und des säugeradaptierten SC35M Virus (H7N7) in murinen Importin- α defizienten Zellen	93
20. Importin- α mRNA-Expressionslevel in Säugerzelllinien	95
21. Importin- α mRNA-Expressionslevel in murinen Organen.....	96
22. Importin- α Expression im humanen Respirationstrakt.....	99
23. Importin- α Expression im murinen Respirationstrakt.....	100
24. Importin- α mRNA-Expressionslevel des humanen Respirationstraktes.	102
25. Importin- α mRNA-Expressionslevel des murinen Respirationstraktes.	103

26. Vergleich der Importin- α mRNA-Expression im ORT und URT des murinen Respirationstraktes.....	104
27. Importin- α mRNA-Expressionslevel in der murinen Lunge nach Infektion mit H7N7-Viren.....	106
28. Organtropismus von H7N7-Viren in der Maus.	109
29. Zelltropismus von H7N7 Viren unterschiedlicher Importin- α Abhängigkeiten im Respirationstrakt von WT und Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mäusen	112
30. Organtropismus von H7N7 Viren unterschiedlicher Importin- α Abhängigkeiten in WT und Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mäusen	113
31. Pathogenität des aviären HPAIV SC35 (H7N7) in Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mäusen.....	115
32. Pathogenität des säugeradaptierten SC35M-Virus (H7N7) in Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mäusen	116
33. Modell: Die differenzielle Expression der Importin- α Isoformen in der Lunge stellt einen Selektionsdruck bei der Säugeradaptation von Influenza A Viren dar	134

10 Tabellenverzeichnis

1. Die Gattungen der <i>Orthomyxoviridae</i> und ihre Wirte	1
2. Die Genomsegmente von Influenza A Viren und ihre Genprodukte	13
3. Wirtsadaptive Mutationen in der Polymerase und im NP von H5N1-Viren	24
4. Vergleich der Genome von SC35 und SC35M	28
5. Identitätsmatrix der humanen Importin- α Isoformen.....	33
6. Cargoproteine der Importin- α Isoformen.....	34
7. Virulenz des aviären H7N7-Virus und des säugeradaptierten H7N7-Virus in Wildtyp und Importin- $\alpha 3^{-/-}$ Mäusen.....	117

11 Abkürzungsverzeichnis

Die Abkürzungen für SI-Einheiten, Aminosäuren und Nukleotide entsprechen i.a. den IUPAC-Regeln und international verbindlichen Normen.

Å	Ångström ($1 \text{ Å} = 0,1 \text{ nm} = 10^{-10} \text{ m}$)
aa	Aminosäure
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
BSL	Biologische Schutzstufe (<i>biosafety level</i>)
C-	Carboxyterminal/Carboxy-Terminus
°C	Grad Celsius
cDNA	<i>copy</i> DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cRNA	<i>copy</i> RNA / <i>complementary</i> RNA
cRNP	<i>complementary</i> Ribonukleoprotein
C _T -Wert	Schwellenwert-Zyklus (<i>cycle threshold</i>)
Da	Dalton
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
dd	doppelt destilliert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA/dsDNA	Desoxyribonukleinsäure/doppelsträngige DNA
DNase I	Desoxyribonuklease I
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
d p.i.	Tage nach Infektion (<i>days post infection</i>)
DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fötales Kälberserum
FFPE	formalinfixiert & paraffineingebettet
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNA	genomische DNA
x g	Erdbeschleunigung (Angabe zur Zentrifugationsstärke)
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HA	Hämagglutinin
HAU	Hamagglutinationseinheit (<i>hemagglutination unit</i>)
HA-Test	Hämagglutinationstest
HPAIV	hochpathogenes aviäres Influenza A Virus
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horse radish peroxidase</i>)
HSV	Herpes simplex-Virus
Imp-α	Importin-α
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
K	Kalium
kb	Kilobasenpaar (1000 Basenpaare)
kDA	Kilodalton
kg	Kilogramm
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat

KPNA	Karyopherin- α
Ktr	Kontrolle
L	Liter
LB	Luria-Bertani Medium
LMM	<i>Laser Microbeam</i> Mikrodissektion
LF-2000	Lipofectamine 2000
log	Logarithmus
LPAIV	niedrig pathogenes aviäres Influenza A Virus
LV	Leervektor
M	Molar
M1/2	Matrixprotein 1/2
MEF	murine embryonale Fibroblasten
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
min	Minute
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
MLD ₅₀	Maus-letale Dosis 50
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MTP	Mikrotiterplatte
mg	Milligramm
mM	Millimolar
MOI	Multiplizität der Infektion (<i>multiplicity of infection</i>)
N-	Aminoterminal/Amino-Terminus
NA	Neuraminidase
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NLS	Kernlokalisierungssignal
NP	Nukleoprotein
NS	Nichtstrukturprotein
NTC	<i>no template control</i>
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD _{λ}	optische Dichte bei einer Wellenlänge λ
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
ORT	Oberer Respirationstrakt (Nasenmuschel)
p.a.	<i>pro analysi</i>
PA	polymerase acidic protein
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PB1	polymerase basic protein 1
PB2	polymerase basic protein 2
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBS-T	PBS mit Tween-20
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pfu/ml	plaquebildende Einheiten pro ml (<i>plaque-forming units/ml</i>), negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pH	
p.i.	nach Infektion (<i>post infection</i>)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
p.t.	nach Transfektion (<i>post transfection</i>)
rER	raues Endoplasmatisches Retikulum
Rn	<i>reporter normalisation</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
ROX	5-Carboxy-X-Rhodamin-Glycinkonjugat
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur

RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
RT-qPCR	quantitative <i>Real-time</i> PCR (<i>real-time quantitative PCR</i>)
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
sER	glattes Endoplasmatisches Retikulum (<i>smooth ER</i>)
siRNA	<i>small-interfering</i> RNA
SOC	super optimal broth with catabolite repression
SPF	spezifiziert pathogenfrei (<i>specific pathogen-free</i>)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TF	Transfektion
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität
UDG	Uracil-DNA-Glycosylase
UDP	Uridindiphosphat
ÜN	über Nacht
URT	Unterer Respirationstrakt (Bronchien und Lunge)
UV	Ultraviolett
V	Volt
Verd.	Verdünnung
Vol	Volumen(einheit)
vRNA	virale RNA
vRNP	virales Ribonukleoprotein
v/v	Volumenprozent (<i>volume/volume</i>)
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtprozent (<i>weight/volume</i>)

12 Veröffentlichungen, Vorträge und Posterpräsentationen

Veröffentlichungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden zum Teil in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Thiele S., van Riel D., Bader M., Hartmann E., Osterhaus A.D.M.E., Gabriel G. (2013). "The mammalian respiratory tract harbors positive and negative factors which pose host selective pressures for the evolution of influenza A viruses."

Manuskript in Vorbereitung.

Weitere Veröffentlichungen während der Dissertation:

Gabriel G., Klingel K., Otte A., **Thiele S.**, Hudjetz B., Arman-Kalcek G., Sauter M., Shmidt T., Rother F., Baumgarte S., Keiner B., Hartmann E., Bader M., Brownlee GG., Fodor E., Klenk HD. (2011). "Differential use of importin- α isoforms governs cell tropism and host adaptation of influenza virus." *Nat Commun.* 2011 Jan 18;2:156.

Vorträge auf Fachtagungen

*Gabriel G., Klingel K., Otte A., **Thiele S.**, Arman-Kalcek G., Sauter M., Shmidt T., Rother F., Baumgarte S., Keiner B., Hartmann E., Bader M., Brownlee GG., Fodor E., Klenk HD. (2010).

Differential use of importin- α isoforms governs cell tropism and host adaptation of influenza virus.

14th International Conference on Negative Strand Viruses (2010), Brügge, Belgien

***Thiele S.**, Gabriel G. (2011).

Role of importin- α isoforms in influenza virus cell tropism.

HPI Joint Scientific Retreat, Hamburg, Deutschland.

*Gabriel G., Klingel K., Otte A., **Thiele S.**, Arman-Kalcek G., Sauter M., Shmidt T., Rother F., Baumgarte S., Keiner B., Hartmann E., Bader M., Brownlee GG., Fodor E., Klenk HD. (2011).

Interspecies Transmission and Pathogenesis of Influenza A Viruses.

LCl Symposium Co-Infection 2011, Hamburg, Deutschland.

***Thiele S.**, Gabriel G. (2012).

Selective pressure in the mammalian airway drives evolution of influenza A viruses.

HPI Joint Scientific Retreat, Hamburg, Deutschland.

*Thiele S., Gabriel G. (2013).

Down-regulation of importin- α 3 levels in the lung correlates with systemic spread and pathogenicity of influenza viruses in mice.

2nd Flupharm Annual Meeting 2013, Wien, Österreich

Posterpräsentationen auf Fachtagungen

*Thiele S., Klingel K., Klenk H.D., Gabriel G. (2011).

Influenza A virus host adaptive mutations in PB2 D701N and NP N319K mediate enhanced tissue tropism and immune cell depletion in mice.

National Symposium on Zoonoses Research, Berlin, Deutschland

*Thiele S., Gabriel G. (2012).

Human importin- α 7 nuclear import protein plays a crucial role in the stabilisation of the influenza virus polymerase subunit PB2.

3rd International Influenza Meeting, Münster, Deutschland

*Thiele S., van Riel D., Osterhaus A.D.M.E., Gabriel G. (2012).

Down-regulation of importin- α 3 levels in the lung correlates with influenza virus systemic spread and pathogenicity in mice.

Influenza2012: One Influenza, One World, Oxford, Vereinigtes Königreich

Thiele S., van Riel D., Osterhaus A.D.M.E., *Gabriel G. (2012).

Importin- α 3 restricts influenza virus replication in the mammalian airway.

15th International Negative Strand Virus Meeting, Granada, Spanien

* presenting author

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die dem Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften vorliegende Dissertationsschrift mit dem Titel:

„Untersuchungen zur Rolle der Importin- α Proteine bei der Replikation von Influenza A Viren im Respirationstrakt des Säugers.“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Hamburg, den 18.07.2013



(Swantje Thiele)

Danksagung

PD Dr. Gülşah Gabriel möchte ich herzlich für die Betreuung und Unterstützung, die Möglichkeit der Bearbeitung dieses hochinteressanten Forschungsthemas und für viele produktive wissenschaftliche Diskussionen während meiner gesamten Promotion danken.

PD Dr. Gülşah Gabriel und Prof. Dr. Thomas Dobner danke ich herzlich für die Bereitschaft zur schriftlichen Begutachtung dieser Arbeit.

PD Dr. Hartwig Lüthen, Prof. Dr. Wolfram Brune und Prof. Dr. Julia Kehr möchte ich herzlich in ihrer Funktion als Prüfungskommission der Disputation danken.

Bei unseren niederländischen Kooperationspartnern Dr. Debby van Riel, Lonneke Leijten und Prof. Dr. Albert D.M.E. Osterhaus vom Erasmus Medical Center Rotterdam bedanke ich mich für die zur Verfügungstellung humanen Biopsiematerials und für die Anfertigung von IHC-Färbungen der Importine- α .

Prof. Dr. Peter König danke ich für die Kollaboration und für die Möglichkeit die *Laser Microbeam* Mikrodissektion in seiner Arbeitsgruppe zu erlernen und durchzuführen. Insbesondere bei Kathy Budler möchte ich mich für ihre ausgezeichnete technische Hilfe hierbei bedanken.

Gökhan Arman-Kalçek, Ilara Hudjetz, Gundula Pilnitz-Stolze, Annette Preuss und Nicole Szulc möchte ich herzlich für die hervorragende experimentelle Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit danken. Mein besonderer Dank gilt zudem Dr. Iris Alpers für ihre engagierte und tatkräftige Unterstützung im Labor sowie hilfreiche Diskussionen und Tipps.

Ich danke allen jetzigen und ehemaligen Kollegen aus der Nachwuchsgruppe Influenza-Pathogenese des Heinrich-Pette-Instituts herzlich für ihre Hilfe und Unterstützung, ihre Zuverlässigkeit und für anregende wissenschaftliche sowie unterhaltsame nichtwissenschaftliche Gespräche.

Bei meinen Eltern und meinem Lebensgefährten Michael Zurawski möchte ich mich aus tiefstem Herzen für ihre endlose Unterstützung und Liebe, ihren Zuspruch und Trost, ihr Verständnis und ihre Geduld während meiner Promotion bedanken. Ebenso gilt mein großer Dank Agnes Zurawski und Dennis Schiemann für ihre großartige Freundschaft, aufbauende Gespräche und gemeinsam Erlebtes.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Swantje Thiele
 Geburtsdatum: 23.03.1984
 Geburtsort: Preetz, Deutschland

Schulbildung

08/1990 – 06/1991 Grundschule Rodomstorschule, Plön
 07/1991 – 07/1994 Schule Ernst-Henning-Straße, Hamburg-Bergedorf
 08/1994 – 06/2003 Hansa-Gymnasium Bergedorf, Hamburg
 06/2003 Abschluss: Abitur

Hochschulausbildung

10/2003 – 03/2009 Studium der Biologie, Universität Hamburg
 Hauptfach: Allgemeine Botanik
 Nebenfächer: Biochemie, Mikrobiologie und Genetik/Molekularbiologie
 03/2006 Abschluss: Vordiplom
 05/2008 Diplom-Prüfung
 06/2008 – 03/2009 Diplomarbeit in der Abteilung Physiologie
 Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg
Thema: „Affinitätschromatographische Reinigung der rekombinanten Cholesterol- α -Glucosyltransferase und der Cholesteryl- α -Glucosid-Acyltransferase von *Helicobacter pylori*.“
 05/2009 Abschluss: Diplom
 06/2009 – 09/2013 Promotion am Heinrich-Pette-Institut, Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie (HPI), Hamburg
Thema: „Untersuchungen zur Rolle der Importin- α Proteine bei der Replikation von Influenza A Viren im Respirationstrakt des Säugers“

Hamburg, den 18.07.2013

(Swantje Thiele)