

Abteilung für Klinische Virologie
Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
Hamburg

Vorsitzender
Prof. Dr. R. Horstmann

**Expression und Charakterisierung der rezeptorbindenden
Domäne des Influenza A H5N1 Virus**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Brit Häcker
Geboren am 14.07.1979 in Karl-Marx-Stadt (Chemnitz)

Hamburg 2011

Angenommen von der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am 18.04.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. B. Fleischer

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: Prof. Dr. C. Drost

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Prof. Dr. S. Günther

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	III
1 Einleitung	1
1.1 Allgemeines.....	1
1.2 Klinik	2
1.3 Das Influenzavirus	4
1.3.1 Die Oberflächenproteine Hämagglutinin und Neuraminidase	6
1.4 Prophylaxe.....	8
1.5 Nachweissysteme.....	8
1.5.1 Nachweis saisonaler Influenza	8
1.5.2 Nachweismethoden von Influenzasubtypen.....	9
1.5.3 Serologische Nachweismethoden	9
1.5.4 Der Virusneutralisationstest	10
1.6 Pandemien	10
1.6.1 Überblick.....	10
1.6.2 Die Spanische Grippe.....	11
1.6.3 Asiatische Grippe.....	12
1.6.4 Hongkong-Grippe	12
1.6.5 H1N1 Pandemie 2009/ 2010 „Schweinegrippe“	13
1.7 Aviäre Influenza	14
1.7.1 Allgemeines.....	14
1.7.2 H5N1	15
1.8 Arbeitshypothese und Fragestellung.....	17
2 Material und Methoden	18
2.1 Materialien.....	18
2.1.1 Geräte	18
2.1.2 Verbrauchsartikel.....	19
2.1.3 Reagenzien/ Chemikalien.....	19
2.1.4 Enzyme.....	21
2.2 Puffer; Lösungen und Medien	21
2.2.1 Puffer	21
2.2.2 Zellkulturmedien.....	23
2.2.3 Kits	24

2.2.4	Verwendete Vollvirusstämme	24
2.2.5	Verwendete Antikörper.....	24
2.2.6	Plasmide	24
2.2.7	Bakterienstämme	24
2.2.8	Zelllinien	25
2.2.9	Molekulargewichtsmarker.....	25
2.2.10	Primer	25
2.3	Verwendete Software.....	26
2.4	Methoden.....	26
2.4.1	Agarosegelelektrophorese	26
2.4.2	DNA-Präparation aus Agarosegel	26
2.4.3	Klonierung von PCR-Produkten.....	27
2.4.4	Klonscreening.....	31
2.4.5	Expression des PCR-Produktes	33
2.4.6	Proteinaufreinigung.....	35
2.4.7	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
2.4.8	Western Blot.....	37
2.4.9	Proteinquantifizierung nach Bradford.....	38
2.4.10	Methoden der Zellkultur und Virusanzucht	38
2.4.11	RNA-Extraktion mit Diatomeenerde	40
2.4.12	Quantitative Real-Time RT PCR.....	41
2.4.13	Plaque Assay und Virusquantifizierung.....	42
3	Ergebnisse	43
3.1	Auswahl und Analyse der rezeptorbindenden Domäne von H5	43
3.2	Molekularbiologischer Teil	44
3.2.1	Auswahl des Vektors und der PCR-Strategie.....	44
3.2.2	Klonierung von H5k in pET 102 D/TOPO und Klonanalyse	45
3.2.3	Testexpression H5k in pET102	48
3.3	Proteinbiochemischer Teil:	
	Aufreinigung des rekombinanten Proteins H5k in pET 102.....	49
3.3.1	Native Proteinaufreinigung	49
3.3.2	Denaturierende Aufreinigung.....	51
3.3.3	Western Blot zum Nachweis des exprimierten Proteins.....	52
3.3.4	Optimierung durch Umklonierung von H5 in pET 151 D-TOPO.....	54

3.3.5	Aufreinigung des Proteins H5 in pET 151	57
3.3.6	Western Blot zum Nachweis von H5 in pET 151	60
3.4	Zellkulturarbeit mit H5N1 Vollvirus	61
3.4.1	Wachstumskinetik für H5N1 mittels Plaque Assay und RT-PCR	62
3.4.2	Aufbau und Standardisierung eines Virusassays für H5N1	65
3.4.3	Virusinfektion von H5N1 nach Präinkubation mit rekombinatem H5	66
3.4.4	Virusinfektion mit H5N1 in Anwesenheit von rekombinatem H5 (15-250 µg).....	68
3.4.5	Virusinfektion mit H5N1 in Anwesenheit von rekombinanten H5 (0,5-100 µg).....	69
3.4.6	Gegentestung mit einem Nicht-Influenzaprotein/ Test der Spezifität	71
3.5	Zellkulturarbeit mit H7N7 Vollvirus	72
3.5.1	Plaqueassay von H7N7	73
3.5.2	Standardisierung des Virusassay mit H7N7	73
3.5.3	Virusinfektion von H7N7 nach Präinkubation mit rekombinatem H5	74
3.5.4	Virusinfektion von H7N7 in permanenter Anwesenheit von rekombinatem H5 ...	76
4	Diskussion.....	78
5	Zusammenfassung.....	84
6	Abkürzungsverzeichnis.....	85
7	Abbildungsverzeichnis.....	86
8	Literaturverzeichnis.....	87
9	Danksagung.....	94
10	Lebenslauf	95
11	Eidesstattliche Versicherung	96
12	Verwendete Virusgenomsequenz pRT 611 Vietnam	97

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

Als Influenza bezeichnet man eine durch Viren ausgelöste Infektionskrankheit, welche Vögel, Säugetiere und Menschen befällt und durch verschiedene Viren der Familie *Orthomyxoviridae* ausgelöst wird.

Ab 2003 kam es zu einer weltweiten Ausbreitung eines bislang nur sporadisch in Teilen Südostasiens aufgetretenen Influenzatyphs. Da das Virus vorwiegend Vögel und Vogelartige befällt, wurde es als Vogelgrippe-Virus (aviäre Influenza) bekannt. Zunächst war die Vogelgrippe eine reine Zoonose, welche seit 1997 für lokale Ausbrüche unter Geflügelbeständen vor allem in Hongkong bekannt war. Das verursachende Virus ist das hoch pathogene aviäre Influenza A Virus (HPAI, Highly Pathogenic Avian Influenza) H5N1.

In den Jahren 2003 bis 2005 kam es sowohl zu einer zunehmenden Verbreitung in Großteilen Südost- und Zentralasiens, als auch zu einer Ausbreitung in den mittleren Osten, Afrika und Europa. Große Geflügelbestände waren befallen und verendeten, da das Virus eine fast 100%ige Mortalitätsrate aufwies. Um die rasante Ausbreitung einzudämmen wurden riesige Geflügelbestände notgeschlachtet. Besonders war allerdings, dass es zu speziesübergreifenden Infektionen von Wildvögeln und diversen Säugetierarten, sowie zu menschlichen Erkrankungs- und Todesfällen durch H5N1, kam. Bei symptomatischen Patienten war die Erkrankung durch eine sehr hohe Letalität von über 60% gekennzeichnet. Die Sorge vor einer neuen Pandemie, falls das Virus die Fähigkeit einer Mensch zu Mensch Übertragung erlangen sollte, war daher groß.[1, 2]

Bis dato ist eine solche Veränderung nicht aufgetreten, nichtsdestotrotz halten die Ausbrüche unter Geflügelbeständen an. HPAI H5N1 gilt inzwischen als endemisch in großen Teilen Südostasiens. Bis zum heutigen Zeitpunkt verendeten über zehn Millionen Vögel und hunderte Millionen wurden zu Eindämmungszwecken notgeschlachtet. Ebenso treten weiterhin immer wieder sporadisch humane Erkrankungen und Todesfälle auf. Bis heute sind 508 bestätigte Fälle der World Health Organisation (WHO) gemeldet worden, wovon 302 Patienten verstarben. [3, 4]

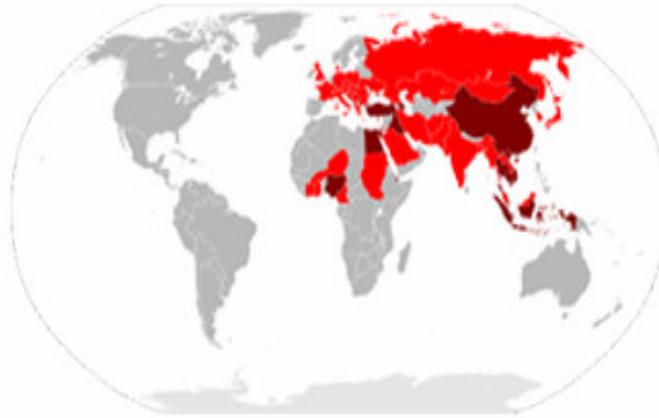


Abbildung 1: Verbreitung von H5N1 auf der Welt. In den rot markierten Ländern, sind H5N1 Infektionen unter Geflügel und Wildvögeln aufgetreten In den dunkelrot markierten Ländern wurden Erkrankungsfälle von Menschen mit letalem Ausgang nachgewiesen.

(Quelle: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Global_spread_of_H5N1_map.svg)

1.2 Klinik

Die sogenannte echte Grippe, ausgelöst durch Influenzaviren, wird von Erkältungskrankheiten durch verschiedene respiratorische Viren abgegrenzt. Sie wird hervorgerufen durch Subtypen von Influenza A und B Viren und tritt saisonal gehäuft in den Wintermonaten auf. Eine Infektion mit Influenza B verläuft, im Vergleich zu Influenza A Viruserkrankungen, meist milder. In unregelmäßigen Zeitabständen können zusätzlich schwerwiegende Influenzapandemien auftreten.

Eine Influenzainfektion ist eine akut einsetzende Erkrankung der Atemwege, die mit ausgeprägten Allgemeinsymptomen einhergeht. Sie äußert sich durch einen plötzlichen schweren Krankheitsbeginn mit hohem Fieber, Kopf- und Halsschmerzen, trockenem Husten, Schüttelfrost sowie Glieder- und Muskelschmerzen. Häufig kommt es zu einer Tracheobronchitis, erschwerend können eine Perimyokarditis und eine Viruspneumonie, zum Teil mit hämorrhagischem oder fulminantem Verlauf, auftreten. Häufig entstehen dann bakterielle Superinfektionen der Bronchien und der Lunge, die zu einer Übersterblichkeit vor allem bei älteren Menschen und chronisch Kranken, aber auch Kindern, führen kann.

Die Übertragung erfolgt in der Regel von Mensch zu Mensch durch Tröpfcheninfektion. Die Inkubationszeit beträgt im Durchschnitt drei Tage, die Krankheitsdauer in der Regel ein bis zwei Wochen, wobei eine Infektiosität bereits vor Symptombeginn besteht. [5, 6] Dadurch wird eine rasche Ausbreitung begünstigt, da noch symptomlose Patienten das Virus

weitergeben. Vergleicht man dies mit SARS-Coronavirus (SARS-CoV), wo eine Infektiosität erst nach Auftreten von klinischen Symptomen besteht, können dort die Patienten vorab isoliert werden und die weitere Verbreitung dadurch eingedämmt werden. Die Ausbreitung von Influenza lässt sich im Gegensatz dazu durch Isolation von Erkrankten nur bedingt eindämmen.[7] SARS-CoV ist wie Influenza ein hoch ansteckender, aerogen übertragener, respiratorischer Virus und war ein Forschungsschwerpunkt in unserer Arbeitsgruppe.[8]

Der Pathomechanismus humanpathogener Influenzaviren besteht in ihrer Affinität zu den Zellen des oberen Respirationstraktes. Dort führen sie bei Infektion zu schweren Epithelschädigungen mit möglichen Hämorrhagien und einem Verlust der Zilien. Dadurch kommt es zu einer vermehrten Anfälligkeit für bakterielle Superinfektionen, vor allem mit *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) und *Streptococcus pyogenes*. Des Weiteren bestehen verschiedene Co-Mechanismen, die eine Superinfektion begünstigen. Zum Beispiel wird die Phagozytosefähigkeit von Makrophagen gegenüber *S. aureus* durch Influenzaviren herabgesetzt. Bei Besiedlung des Respirationstraktes mit *S. aureus* beobachtet man besonders schwere Krankheitsverläufe, da dieser eine Protease zur Spaltung des Vorläuferhämagglutinins besitzt und das Virus dadurch pathogen wird. [9, 10]

Die Therapie richtet sich nach dem Schweregrad der Erkrankung und ist in den meisten Fällen symptomatisch. Kommt es zu bakteriellen Superinfektionen sind Antibiotika indiziert. Bei Kindern ist der Einsatz von Acetylsalicylaten zur symptomatischen Therapie kontraindiziert, da sie ein Reye-Syndrom mit Leberversagen und Enzephalopathie induzieren können. [11]

Bei vermuteter Influenzainfektion kann in den ersten 48 h eine spezifische Therapie begonnen werden. Dafür stehen Neuraminidasehemmer wie Zanamivir oder Oseltamivir (Tamiflu) zur Verfügung, welche die Neuraminidase und somit eine Freisetzung neu gebildeter Viren hemmen. Resistenzentwicklungen werden selten beobachtet, an Nebenwirkungen sind vor allem Übelkeit und Erbrechen zu nennen. Neuraminidasehemmer verringern die Schwere und Dauer einer Influenzainfektion und senken bei rechtzeitiger Einnahme das Letalitätsrisiko.[5, 12] Ein weiteres Medikament ist der Membranproteininhibitor Amantadin, welcher das M-Protein hemmt und somit das Eindringen in den Zellkern verhindert. Eine Resistenzentwicklung tritt relativ häufig auf, ebenfalls können neurologische Nebenwirkungen auftreten.

Bei Infektion mit aviärer Influenza finden sich ebenfalls die oben genannten Beschwerden mit schwerem Krankheitsgefühl, hohem Fieber, Husten, Kopf- und Gliederschmerzen. Zusätzlich treten gehäuft abdominale Symptome wie Übelkeit, Erbrechen und Bauchschmerzen auf. Fast alle Patienten mit bestätigter H5N1 Infektion waren an einer Pneumonie erkrankt, die in

vielen Fällen über ein akutes Lungenversagen (ARDS) zum Tode führte.[13, 14] Als Ausdruck einer ausgeprägten viralen Erkrankung fand sich im Blutbild eine Leukozytopenie und Thrombozytopenie mit Nasen- und Zahnfleischbluten. [1, 15, 16] Die Frage nach der Häufigkeit asymptomatischer oder milder Erkrankungsfälle ist noch nicht abschließend geklärt.[17, 18]

1.3 Das Influenzavirus

Die Influenzaviren gehören zur Familie der *Orthomyxoviridae* und werden aufgrund ihrer Nukleokapsidstruktur in die Virusstämme Influenza A, -B und C, sowie Thogotovirus aufgeteilt.

Influenzaviren werden charakterisiert durch stachelartige Oberflächenstrukturen („*spikes*“), die aus den Glykoproteinen Hämagglutinin und Neuraminidase bestehen. Für Influenza A kommen diese in mehreren, serologisch distinktiven Subtypen vor. Zurzeit sind 16 verschiedene Hämagglutinine (HA)- und 9 verschiedene Neuraminidasen (NA) für Influenza A Subtypen bekannt.[19] Des Weiteren ist die Genomsequenz dieser Hüllproteine eine hochvariable Region, innerhalb eines Subtyps kann die Aminosäuresequenz bis >30% divergieren. Dadurch entstehen immunologisch unterschiedliche Varianten der einzelnen Subtypen.

Influenza A Viren sind in vielen Vögel- und Säugetierspezies weit verbreitet und für die meisten Influenzaepidemien sowie für Influenzapandemien der menschlichen und aviären Population verantwortlich. Für humane Infektionen sind dies vor allem die Subtypen HA 1,2 und 3. Natürliches Reservoir für alle Subtypen sind Wildwasservögel, die symptomlos Influenzaviren über den Stuhl ausscheiden können.[20]

Für Influenza B gibt es keine Subtypen, es existieren allerdings zwei genetisch unterschiedliche Linien, Hauptwirt ist der Mensch. Infektionen mit Influenza C spielen nur eine untergeordnete Rolle, da sie nur sporadisch zu leichten Infektionen beim Menschen führen.

Da es sehr schnell zu Änderungen in den antigenen Domänen der Hüllproteine Hämagglutinin und Neuraminidase kommt, wird nach einer Infektion keine lebenslange Immunität aufgebaut. Diese Antigen-Änderungen können auf zwei verschiedenen Wegen auftreten.

Erstens gibt es langsame, kontinuierliche Veränderungen, welche als *Antigenic drift* bezeichnet werden. Diese werden durch Punktmutationen auf den für die beiden Hüllproteine kodierenden Genabschnitten hervorgerufen. Begünstigt werden diese durch das Fehlen von

RNA-Reparaturenzymen und einer Exonukleaseaktivität der Polymerase. Das heißt es gibt keine Proofreading Funktion, falsch eingebaute Nukleotide oder Mutationen werden somit nicht repariert. Die hierbei entstehenden Subtypvariationen führen zu saisonalen Epidemien und erschweren außerdem die Herstellung eines langwirksamen Impfstoffes.

Der zweite Mechanismus wird als *Antigenic shift* bezeichnet und ist eine Besonderheit, die durch das segmentierte Genom möglich wird. Das segmentierte Genom ist kennzeichnend für Inflenzaviren, es besteht aus sechs bis acht einzelnen und voneinander unabhängigen RNA-Strängen. Kommt es zu einer Doppelinfektion eines Individuums mit unterschiedlichen Influenzasubtypen, kann es zu einer Mischung der verschiedenen Gensegmente kommen und daraus eine Vielzahl von Mischviren entstehen. Diese haben eine unterschiedliche genetische Ausstattung. Ist eines dieser Viren replikationsfähig und infektiös, kann dadurch eine Pandemie entstehen. In diesem Falle trifft ein neuer Virussubtyp mit einer für das Immunsystem völlig unbekanntem Antigenstruktur auf eine immunologisch naive Population. Da im Respirationstrakt des Schweins sowohl Rezeptorstrukturen für aviäre als auch humane Inflenzaviren existieren, ist dieses Tier prädisponiert für Doppelinfektionen. Es fungiert somit als sogenanntes „mixing vessel“ für die Entstehung neuer Influenzamischviren. Begünstigt wird das Zustandekommen dieser Doppelinfektion an Orten, wo ein enges Zusammenleben von Mensch, Geflügel und Nutztier existiert. [21, 22]

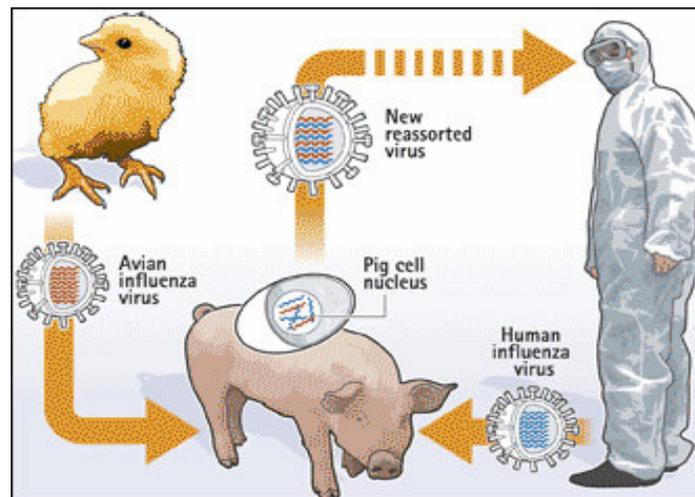


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines genetischen Reassortment (antigenic shift) zwischen einem humanpathogenen und einem aviären Inflenzavirus. Das Schwein ist gleichzeitig mit beiden Viren infiziert, diese replizieren und mischen ihre Gensegmente im Zellkern von respiratorischen Epithelzellen des Schweins. Daraus entsteht eine neue Virusvariation mit Anteilen des aviären Influenzavirus, welches in Menschen repliziert und somit eine Mensch zu Mensch Übertragung möglich macht. (Quelle: http://www.hsph.harvard.edu/review/rvw_winter06/rvwwinter06_flucatchers.html)

Das segmentierte negativ-Einzelstrang-RNA-Genom der Orthomyxoviren besteht aus sechs (Thogotovirus) bis acht Einzelsegmenten (Influenza A und B). Diese Segmente kodieren für insgesamt 11 Proteine, welche einzeln transkribiert und translatiert werden.

Die Polymerasegene PB1, PB2 und PA kodieren für eine Polymerase, die eine cap-snatching-Funktion besitzt. Diese schneidet die 5′methylierten Enden von der zellulären messenger RNA ab und verwendet diese als Primer für die Translation viraler Proteine.[22] Das Nukleokapsidprotein (NP) bindet an die RNA und initiiert die Amplifikation dieser. Das Matrixprotein dient dem Virusassembly und Transport viraler Proteine, das M2-Protein bildet einen Ionenkanal für H⁺ Ionen in der Lipiddoppelmembran der Virushülle. Zusätzlich gibt es Nicht-Struktur-Proteine, welche an Splicing, Translation und Polymeraseaktivitäten beteiligt sind. Des Weiteren sind die Oberflächenproteine Hämagglutinin und Neuraminidase kodiert, die nachfolgend näher erläutert werden.

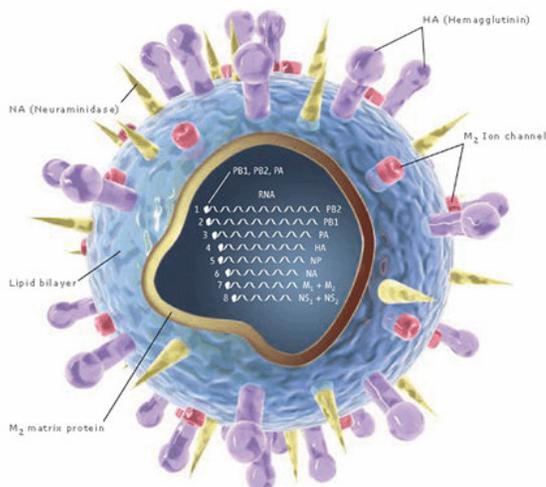


Illustration: Chris Bickel/Science. Reprinted with permission from Science Vol. 312, page 380 (21 April 2006) © 2006 by AAAS

Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Influenza A Virus. Im Inneren ist das segmentierte Genom mit acht Einzelsträngen abgebildet. Auf der Hülle befinden sich die beiden Oberflächenproteine Hämagglutinin (lila dargestellt) und Neuraminidase (gelb dargestellt), sowie der Ionenkanal M2 (rot).

Quelle:

<http://www.sciencemag.org/content/312/5772/380>

1.3.1 Die Oberflächenproteine Hämagglutinin und Neuraminidase

Durch die Oberflächenproteine Hämagglutinin und Neuraminidase werden die Influenza A Viren in Subtypen eingeteilt.

Das Glykoprotein Hämagglutinin ist dabei wesentlich für die Rezeptorbindung und die Membranfusion zum Eindringen des Virus in die Zellen verantwortlich.

Es wird als Vorläuferhämagglutinin H0 synthetisiert und lagert sich in Form eines Trimers zusammen. Es benötigt eine posttranslationale Spaltung durch zelleigene trypsinähnliche Proteasen, um das Virion zu Infektiosität zu befähigen. Dies wird durch eine Absenkung des pH-Wertes eingeleitet und führt zu einer Spaltung der beiden Untergruppen HA1 und HA2.

Diese bleiben allerdings weiterhin über Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden. Durch diese Spaltung kommt es zu einer Konfigurationsänderung des Hämagglutinins, welches zu einer Membranfusion zwischen Wirtszelle und Virus führt. Das für diese Spaltung benötigte Enzym ist für humane Influenzaviren und niedrig pathogene aviäre Influenzaviren (LPAI Low Pathogenic Avian Influenza) eine trypsinähnliche Protease, welche im menschlichen Respirationstrakt und aviären Gastrointestinaltrakt vorkommt. [23] Bei Mutationen im Aminosäuremotiv dieser Schnittschnelle, kann die Spaltung und somit Aktivierung des Virus durch ubiquitär vorkommende Proteasen durchgeführt werden. Dadurch kommt es zu einer Virulenzsteigerung der Virus. [24, 25]

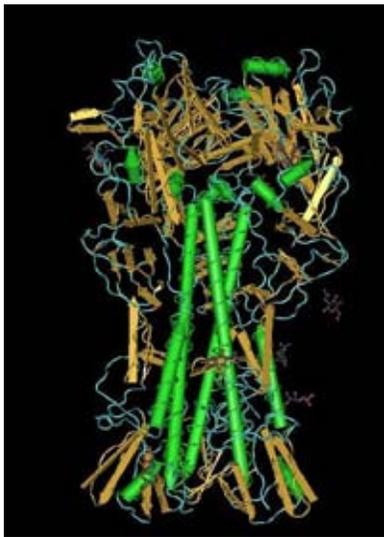


Abbildung 4: 3-D Rekonstruktion des Homotrimeren Hämagglutinins des Influenza A Virus, welches für den Viruseintritt in Zellen benötigt wird.

(Quelle

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=93838>)

Auch die Rezeptorbindung der Influenzasubtypen ist wirtsspezifisch und wird durch die Verknüpfungsstelle der Galaktose an die N-Acetylneuraminsäure bestimmt. Aviäre Influenzaviren binden bevorzugt an 2,3-N-Neuraminsäure. Erlangt das Virus durch Mutation die Fähigkeit an die beim Menschen vorkommende 2,6-N-Neuraminsäure zu binden, kann es zu speziesübergreifenden Infektionen kommen. [26-28] Porcine Influenzaviren können an beide Neuraminsäurereste binden. [29] Die Bindungsstelle ist bei allen Influenzaviren in der globulären Domäne der HA1 Untereinheit des Hämagglutintrimeren lokalisiert und wird als RBS (*receptor binding site*) bezeichnet. Sie wird gebildet aus einer alpha-Helix, zwei Schleifen (*Loops*) und enthält einen Anteil an konservierten Aminosäuren. [30] Die Aminosäuresequenz dieser Region bestimmt dabei die Affinität des Virus zu dem jeweilig gebundenen Galaktoserestes. Ein Austausch von wenigen Aminosäuren kann bereits zu einem Wechsel der bevorzugten Bindungsstelle führen. [25, 31]

Neuraminidase ist für die Freisetzung neuer Viruspartikel von wesentlicher Bedeutung. Es schneidet Neuraminsäurereste und wird dadurch für Knospung (Budding) und Freisetzung von neuen Virionen benötigt. Es liegt in Form eines Homotetramers vor. [22]

Hämagglutinin und Neuraminidase sind die beiden hauptantigenen Strukturen des Influenza A Virus. Sie durch eine hochvariable Aminosäuresequenz gekennzeichnet, welche in einer Subgruppe um bis zu 30% divergieren kann. Sowohl die Rezeptorbindung als auch die Spaltungsvorgänge bestimmen die Wirtsspezifität und Infektiosität.[6]

1.4 Prophylaxe

Eine Prophylaxe gegen die saisonal auftretende Grippe ist durch eine jährliche Impfung möglich. Diese wird für Menschen über 60 Jahren, Kinder und Erwachsene mit Grunderkrankungen (chronische Herz- und Lungen-Erkrankungen, Stoffwechselerkrankungen wie z.B. Diabetes, Immundefekte usw.) sowie medizinisches Personal empfohlen und sollte jeweils vor Beginn der „Grippesaison“ durchgeführt werden.

Durch die genetische Variabilität des Influenza Virus wird allerdings die Entwicklung eines länger wirksamen Impfstoffes erheblich erschwert und ist bis zum heutigen Zeitpunkt nicht gelungen. Zurzeit erfolgt die jährliche Impfstoffproduktion auf Empfehlung der WHO, die Vorgaben zur voraussichtlich auftretenden Antigenzusammensetzung macht.[32]

Eine Prophylaxe gegen pandemisch auftretende Influenza ist nicht möglich, da der Impfstoff für den jeweilig auftretenden Typ neu entwickelt werden muss.

Durch die Verwendung von Hühnereiern für die Produktion von Impfsen dauert die Herstellung drei bis sechs Monate.

1.5 Nachweissysteme

1.5.1 Nachweis saisonaler Influenza

Der labortechnische Nachweis von Influenzainfektionen wird nur bei speziellen Fragestellungen durchgeführt. Material dafür sind Nasen und Rachenabstriche, ggf. auch Abstriche der tieferen Atemwege.

Wird von einer saisonalen Influenza ausgegangen ist die Diagnose meist klinisch zu stellen. Möglich ist der Einsatz eines sogenannten Schnelltestes im frühen Stadium der Erkrankung, da in diesem Fall noch der Einsatz von Virostatika zu erwägen ist. Diese Schnellteste basieren auf dem Nachweis von Virusantigenen mittels Immunoassay oder Immunchromatographie.

Sie vermögen eine Aussage darüber zu machen, ob eine Erkrankung durch Influenzaviren vorliegt und zum Teil eine Differenzierung zwischen Influenza A und B. Eine weitere Differenzierung hinsichtlich einzelner Subtypen ist dadurch nicht möglich.

1.5.2 Nachweismethoden von Influenzasubtypen

Eine sehr sensitive und gut etablierte Methode ist der Direktnachweis des Virus durch Beimpfung von bebrüteten Hühnereiern oder durch Viruszellkultur.

Zur Subspezifizierung werden monospezifische Antisera gegen die verschiedenen Hämagglutinin und Neuraminidase Antigene in Immunodiffusionstests eingesetzt. Alternativ dazu kann der neu aufgetretene Virus in Hämagglutinin und Neuraminidase Inhibitionstests gegen polyklonale Sera untersucht werden.

Eine neuere und spezifische Nachweismethode von saisonaler und neu auftretenden Formen von Influenza A ist mittels konventioneller RT PCR (*Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction*). Dabei werden entweder konservierte Genabschnitte, sogenannte Matrixproteine, oder die spezifischen Hämagglutinin und Neuraminidasegene aus den klinischen Proben oder Viruszellkulturen nachgewiesen.

Eine höhere Sensitivität und die Möglichkeit der Quantifizierung der Virusmenge wird durch eine Real Time Reverse Transkriptase PCR (*Real-Time RT PCR*) erreicht. Schwierigkeiten hierbei sind die zeitnahe Erfassung eines neuen Virussubtyps und damit Entwicklung passender Primer und Validierung der PCR beim Auftreten neuer Mutationsformen. Die eingesetzten Primer sind hochspezifisch und zeigen eventuell geringere Bindungskapazitäten bei genetischen Varianten.

Eine weitere Möglichkeit besteht auch hier in der Anzuchtung des Virus in der Zellkultur. Sekundär dazu muss ein Nachweis mittels RT-PCR, Immunfluoreszenz oder Hämagglutinin-Inhibition geführt werden. Allerdings gelingt die Anzucht nur bei vergleichsweise hoher Viruslast. [33, 34]

1.5.3 Serologische Nachweismethoden

Serologische Nachweise werden bei Influenza Ausbrüchen, zu Fragen des öffentlichen Gesundheitswesens oder aus wissenschaftlichem Interesse geführt. [5]

Der Nachweis von Antikörpern erfolgt durch Hämagglutinin Inhibitionstest (*HI*), Virusneutralisation (*VN*) und Enzym Immuno Assays (*EIA*). Diese Methoden sind vor allem

aus epidemiologischen Aspekten interessant. Der serologische Nachweis humaner Infektionen mit aviären Erregern ist mit Schwierigkeiten behaftet, da sie zum Teil nur eine geringe Antikörperproduktion hervorrufen.[35]

Zur Bestätigung einer H5N1 Infektion ist der Nachweis mittels RT-PCR oder Viruskultur durch ein WHO Referenzlabor gefordert.

1.5.4 Der Virusneutralisationstest

Mit dem Neutralisationstest kann man Antikörpern gegen ein bestimmtes Virus in Patientensera nachweisen. Sind neutralisierende Antikörper im Serum enthalten, binden diese an das Virus und verhindern dadurch den Zelleintritt und damit die Virusreplikation in der Zellkultur.

Praktisch wird dabei eine Kontrolle angesetzt, in der eine bestimmte Menge des Virus in eine Zellkultur gegeben wird. Durch Virusvermehrung entsteht ein zytopathischer Effekt, bei dem die Zellen absterben.

In weiteren Ansätzen wird eine Verdünnungsreihe des Patientenserums zur Zellkultur mit definierter Virusmenge gegeben. Bleibt ein zytopathischer Effekt im Assay aus, sind neutralisierende Antikörper vorhanden. Es hat somit eine immunologische Auseinandersetzung im Patienten mit dem eingesetzten Virus stattgefunden. Anhand der Verdünnungsreihe lässt sich ein Antikörpertiter im Serum bestimmen.

Vorteil des NT-Tests ist seine sehr hohe Spezifität, welche von keinem anderen Immunoassay erreicht wird. [35, 36]

Nachteil des Neutralisationstest ist der hohe zeitliche und personelle Aufwand. Beim Nachweis von HPAIV ist das Arbeiten auf Labore der biologischen Sicherheitsstufe 3 beschränkt. Des Weiteren ist der Test nicht verwertbar bei immundefizienten Patienten, da bei diesen die Bildung von Antikörpern gestört ist oder unterbleibt.

1.6 Pandemien

1.6.1 Überblick

Erste Beschreibungen von Influenzaepidemien finden sich bereits bei Hippokrates im Jahr 412 v.Chr.[37]

Im 20sten Jahrhundert sind drei Hauptpandemien bedingt durch H1N1, H2N2 und H3N2 aufgetreten. Einen Überblick darüber gibt Tabelle 1.[6, 38]

Tabelle 1: Übersicht der Influenzapandemien seit dem 20igsten Jahrhunderts

Jahr	Bezeichnung	Antigenstruktur	Todesfälle durch Influenza
1918-1919	Spanische Grippe	H1N1	20-50 Millionen
1957	Asiatische Grippe	H2N2	2 Millionen
1968	Hongkong Grippe	H3N2	1 Million
2009/2010	„Schweinegrippe“	H1N1	18.000

1.6.2 Die Spanische Grippe

Die Spanische Grippe war die fatalste Influenzapandemie in der Geschichte.

Sie trat in drei großen Erkrankungswellen auf, wobei die Erste im Frühjahr 1918 „nur“ mit einer erhöhten Erkrankungszahl, nicht aber mit einer Übersterblichkeit eintrat. Diese erfolgte im Herbst/Winter 1918, sowie im Frühjahr 1919, wobei das Mortalitätsrisiko auf 2,5% über den Durchschnitt anstieg und die meisten Todesfälle zu beklagen waren. Insgesamt war ein Drittel der Weltbevölkerung erkrankt, schätzungsweise 50 Millionen Menschen starben. Neuere Schätzungen gehen von bis zu 100 Millionen Todesfällen aus. Das Besondere war eine Übersterblichkeit von 25% unter gesunden Menschen jüngeren bis mittleren Alters, abweichend von Todesfällen durch saisonal bedingte Influenza, die vor allem Immungeschwächte, ältere Menschen und Kinder betrifft. Die Spanische Grippe betraf vor allem Nordamerika und Europa, wohl aber auch den asiatischen Raum, wobei die zweite Welle weltumspannend auftrat.[39]



Abbildung 5: Militärnotfallkrankenhaus in Kansas, USA; während der Influenzapandemie 1918/1919 (Quelle: <http://puesoccurrences.wordpress.com/2010/05/17/professor-john-oxford-on-the-1918-1919-influenza-pandemic/>)

Die Sequenzanalyse des Virus aus Organproben des Jahres 1919 und phylogenetischen Untersuchungen widerlegten frühere Annahmen, dass dieser H1N1 Subtyp durch ein Reassortment *antigenic shift* aus bereits zirkulierenden Stämmen entstanden sei. [40] Es wird angenommen, dass H1N1 von einer noch unbekanntem Quelle aus dem Tierreich auf den Menschen übergegangen ist. Erklärbar ist dies durch eine Mutation *antigenic drift* in der rezeptorbindenden Domäne des Hämagglutinins. Dadurch wäre das Virus befähigt α -2,6-N-Neuraminsäure zu binden und Zellen des menschlichen Respirationstraktes zu infizieren. [40] Normalerweise bindet das Hämagglutinin aviärer Influenzaviren an eine α -2,3-N-Neuraminsäure, welche im Gastrointestinaltrakt von Vögeln vorkommt. An die im humanen Alveolarepithel vorkommenden Neuraminsäure kann das Virus normalerweise nicht ausreichend binden bzw. nicht gespalten werden. [41, 42]

Viele Fragen sind bisher noch nicht abschließend geklärt, wie die schnelle Abfolge verschieden schwerer Erkrankungswellen, das Virusreservoir, die Übersterblichkeit gesunder junger Menschen etc.

Nach der schweren Pandemie 1918-1919 zirkulierte H1N1 weiterhin durch die menschliche Population und sorgte mit anderen Virussubtypen für saisonale Epidemien.

1.6.3 Asiatische Grippe

1957 tauchte in China ein neuer Virusstamm mit der Antigenformel H2N2 auf und löste die Asiatische Grippe aus. Diese Pandemie forderte weltweit ca. 2 Millionen Todesopfer und führte zu einer Zunahme der Sterblichkeit um $>0,1\%$.

Zur gleichen Zeit verschwand H1N1 komplett aus der menschlichen Population.

1.6.4 Hongkong-Grippe

Der Stamm der Asiatischen Grippe H2N2 zirkulierte bis 1968 und wurde durch den Virusstamm H3N2 abgelöst. Dieser tauchte zuerst in Hongkong auf und führte zur Hongkong-Grippe-Pandemie, die weltweit ca. 1 Million Todesopfer forderte.

Sowohl H2N2 als auch H3N2 sind aus einem Reassortment aus aviären Influenzaerregern und humanen Influenza A Viren entstanden. Das H2N2 Virus entstand aus dem bis dahin zirkulierenden H1N1 und einem aviären Influenza A Virus aus Wildenten. Von diesen stammen die Gene für Hämagglutinin und Neuraminidase, sowie für die PB1.

H3N2 entstand aus Segmenten von H2N2, von denen es unter anderem die Neuraminidasegene erhielt. Die Gensegmente für das Hämagglutinin und die PB1 stammten aus einem aviären Influenzavirus aus Wildenten. [43, 44]

1977 tauchte der Stamm H1N1 erneut auf, diesmal in China.

Seit dieser Zeit zirkulieren Varianten von H1N1 und H3N2, sowie Influenza B-Virusstämme in der menschlichen Population und sind für die saisonalen Influenzainfektionen verantwortlich. Die durchschnittliche Sterblichkeit durch Influenza A-Virusinfektionen beträgt 300.000 - 500.000 pro Jahr.

1.6.5 H1N1 Pandemie 2009/ 2010 „Schweinegrippe“

Im Frühjahr 2009 breitete sich ein neuer H1N1 Stamm von Mexiko und Nordamerika kommend rasch über die gesamte Welt auf und wurde als neue Grippe oder Schweinegrippe bekannt. Eine neue Influenzapandemie brach aus.

Bei dem H1N1-Subtyp (A/California/7/2009) handelte es sich um ein Mischvirus aus zwei Influenzaviren, die vorher in Schweinen gefunden wurden. Das Mischvirus selbst konnte allerdings nie aus Schweinen isoliert werden. [45, 46]

Die meisten Infektionen waren durch einen milden und selbstlimitierenden Verlauf gekennzeichnet, wobei vor allem Kinder und jüngere Menschen erkrankten. Ältere Menschen, die sonst vermehrt an Influenza erkrankten, waren weniger betroffen. In der Gruppe der unter 65-Jährigen kam es vermehrt zu schweren Verläufen, vor allem durch respiratorische Komplikationen und die meisten Todesfälle waren in dieser Altersgruppe zu beklagen. Allerdings war die generelle Letalität geringer als bei saisonalen Influenzaviren, was auf eine Dominanz dieses Virusstammes und somit weniger Infektionen durch saisonale Influenzaviren und dadurch bedingte Todesfälle bei älteren Patienten zurückzuführen ist. [47, 48]

Durch die WHO wurde im Juni 2009 Pandemiealarm der höchsten Stufe 6 ausgerufen, um eine weitere Ausbreitung einzudämmen. Da sich im Verlauf zeigte, dass dies nicht gelang und der Virusstamm durch eine geringe Pathogenität gekennzeichnet war, wurde dieser im Sommer 2010 als beendet erklärt und als Postpandemiephase eingestuft.[49]

Im Winter 2010/2011 zirkulierte H1N1 als saisonale Grippe. [32]

1.7 Aviäre Influenza

1.7.1 Allgemeines

Als aviäre Influenza werden im Allgemeinen Erkrankungen unter Vogelartigen durch Influenzaviren bezeichnet. Diese werden in hoch pathogene (HPAIV) und niedrig pathogene aviäre Influenzaviren eingeteilt (LPAIV). Hoch pathogene Influenzaviren sind einige Subtypen von H5 und H7 und sind verantwortlich für schwere Influenzaausbrüche in Geflügelfarmen, mit Mortalitätsraten zwischen 80-100%. Die Zahl der Ausbrüche nimmt in den letzten Dekaden stetig zu. Ebenso steigt die Zahl der zur Eindämmung gekeulten Tiere welches große ökonomische Folgen hat.[50]

Influenza A Viren haben ihr natürliches Reservoir in wilden Wasservögeln [51], alle bekannten HA und NA Subtypen konnten aus diesen isoliert werden. Dort existieren sie als LPAIV, in einem stabilen Zustand der Aminosäuresequenz und somit genetisch konserviert, was auf eine optimale Adaptation des Virus an den Vogel-Wirt schließen lässt. Erst bei Übertragung auf domestizierte Vögel, vor allem Geflügel, und Replikation in diesem können sie in einen hoch pathogenen Virusstamm übergehen und zeigen dann eine gesteigerte Mutationsrate.[52]

Gewöhnlicherweise werden Menschen und Säugetiere nicht direkt von einem aviären Influenzastamm infiziert, da diese dort normalerweise nur ineffizient replizieren können. Weiterhin wird die Wirtsspezifität durch die beiden Oberflächenproteine und deren Bindungsfähigkeit an zelluläre Rezeptoren bestimmt.

Die Virulenzsteigerung von hoch pathogenen Formen von H5N1 und H7N7 wird durch die Fähigkeit ubiquitär vorkommende Proteasen zur Spaltung des Vorläuferhämagglutinins zu nutzen bestimmt. Bei anderen Influenzaviren wird dafür eine wirtsspezifische trypsinähnliche Protease benötigt, die beispielsweise im menschlichen Alveolarepithel vorkommt.

In den letzten Jahren sind allerdings im Zusammenhang mit dem Auftreten von AIV (*Avian Influenza Virus*)-Ausbrüchen unter Geflügel auch humane Erkrankungen durch aviäre Influenzaviren aufgetreten, welches auf eine Verschiebung der Infektiosität von aviärer Influenza auf den Menschen schließen lässt.[53]

Seit 1997 ist es immer wieder zu Erkrankungen von Menschen mit H5N1 gekommen. Darauf wird in 1.7.2 näher eingegangen.

1999 traten in Hongkong zwei Fälle von humanen Erkrankungen mit H9N2, einem LPAIV, auf. Die jungen Patienten zeigten milde klinische Symptome einer Influenzainfektion und erholten sich vollständig. [54]

2003 kam es auf einer Geflügelfarm in den Niederlanden zu einem Ausbruch von HPAIV H7N7 unter dem Geflügelbestand. Gleichzeitig wurden virale Konjunktivitiden unter den Arbeitern beobachtet. Bei sieben von Ihnen traten milde influenzaähnlichen Symptome auf, die auf eine Infektion von H7N7 zurückgeführt werden konnten. Ein Arbeiter verstarb an den Folgen eines ARDS (*Acute Respiratory Distress Syndrome*) durch eine Influenzapneumonie. Insgesamt wurde bei 89 Personen, die direkt oder indirekt mit der Geflügelfarm in Verbindung standen, eine Infektion mit H7N7 nachgewiesen. [55]

1.7.2 H5N1

Der Vorläufer von H5N1, der später zu humanen Infektionen führen sollte, trat erstmals 1996 in Gänsefarmen der chinesischen Provinz Guangdong auf.

1997 kam es zu einem Ausbruch von HPAI H5N1 in Geflügelfarmen und Tiermärkten in Hongkong. Dabei kam es erstmals zu einer Infektion von 18 Menschen mit H5N1, sechs davon verliefen tödlich. Durch Keulung der gesamten Geflügelbestände Hongkongs wurde das Virus damals eingedämmt.

Zwischen 1999 und 2002 kam es zu einer Zunahme der Virulenz des H5N1 Influenza A Virus, vor allem bei Infektionen von Säugetieren. [56]

2002 trat erneut ein Genotyp von H5N1 in Hongkong auf. Bei diesem Ausbruch verendeten ein großer Teil der Wildvögel in einem Nationalpark. Zusätzlich wurden zwei menschliche Infektionen mit diesem Virus bestätigt, eine davon endete tödlich. Der Erreger war der Vorläufer des Z-Genotypes, welcher sich in zwei Unterstämme aufteilte und für die meisten H5N1-Ausbrüche seither verantwortlich ist. [57, 58] Weitere Genotypen wie der V-Strang und der A-Strang traten nur vereinzelt auf. Der Z-Stamm führte Ende 2003/ Anfang 2004 relativ zeitgleich zu mehreren schweren Erkrankungsausbrüchen in Geflügelfarmen in acht Ländern Südostasiens. Ebenfalls verstarben vier Großkatzen an H5N1 Infektionen. Bis dahin ging man davon aus, dass Katzen und katzenartige Raubtiere resistent gegen Influenza sind. Dies waren die ersten berichteten Influenza-bedingten Todesfälle bei dieser Spezies. [59, 60] Mitte 2004 kam es zu einer zweiten Infektionswelle in Südostasien, wobei vor allem in Thailand und Vietnam neben Erkrankungen von Vögeln und Tieren auch humane Infektionen mit Todesfolge auftraten. Die Letalität betrug damals >50%.

Im April 2005 wurde am See Qinghai in Zentralchina, eine Sammelstelle für Zugvögel, ein ausgeprägtes Sterben unter Wildvögeln beobachtet. Ursächlich geht man von einer Reinfektion mit HPAIV durch domestizierte Vögel aus. Dieses Phänomen, dass Wildvögel,

die eigentlich symptomlose Wirte von Influenzaviren sind, an Vogelgrippe erkrankten und verstarben, wurde erstmals beobachtet. [61, 62]



Abbildung 6: Zugvögel am See Qinghai, Nordchina. Erstmals erkrankten die sonst symptomlosen Wirte an HPAIV und waren wahrscheinlich mitverantwortlich für die Verbreitung des Virus entlang der Migrationsrouten. (Quelle: <http://www.life.com/image/56863238>)

Von Mitte 2005 an kam es zu einer westwärts gerichteten Ausbreitung von H5N1 Infektionen, mit Ausbrüchen in Geflügel und Wildvögeln. Vereinzelt traten zum Teil tödliche Infektionen von Säugern und Menschen auf. Diese fanden sich in Indien, Russland, Türkei, Teilen von Afrika und des mittleren Ostens, wie auch auf dem europäischen Festland inklusive Deutschland. Gleichzeitig kam es zu einer weiteren Verbreitung innerhalb Südostasiens. H5N1 gilt dort seitdem in Geflügel endemisch. Vor allem in Indonesien, Ägypten und Vietnam kommt es bis zum heutigen Zeitpunkt immer wieder zu letal verlaufenden humanen Infektionen. Bisher wurden 508 humane Infektionen mit H5N1 bestätigt, 302 davon verliefen tödlich. [3]

Der Übertragungsweg der aviären Influenza auf den Menschen ist noch nicht vollständig verstanden. Von einer direkten Übertragung bei engem Kontakt mit infiziertem Geflügel wird ausgegangen, wenngleich diese nur bedingt möglich ist. Es gibt keinen abschließenden Beweis für eine Mensch zu Mensch Übertragung, auch wenn vereinzelt Fälle unter engen Familienmitgliedern beschrieben sind. [18, 63, 64]

H5N1 ist in mehrfacher Hinsicht außergewöhnlich. Das Wirtsspektrum von HPAI H5N1 hat sich von domestiziertem Geflügel auf Wildvögel, Katzenartige und domestizierte Katzen, Schweine und Robben ausgebreitet. Weiterhin trifft das Virus auf eine immunologisch naive menschliche Population. Sollte H5N1 durch Mutation oder Reassortment mit einem zirkulierenden saisonalen Influenzavirusstamm die Fähigkeit zu einer effizienten Mensch zu Mensch Übertragung erlangen, würden sich die anhaltenden Bedenken hinsichtlich einer möglichen Pandemie als nur allzu berechtigt erweisen.

1.8 Arbeitshypothese und Fragestellung

Aus epidemiologischer Sicht und hinsichtlich der Infektiosität stellte sich die Frage nach Vorhandensein und Ausmaß klinisch inapparenten Verläufen von H5N1-Infektionen.

Die bisher vorhandenen serologischen Testsysteme zum Nachweis abgelaufener Influenza A Infektionen haben eine sehr geringe Spezifität und sind daher für Reihenuntersuchungen von Tieren und Menschen ungeeignet.

Die einzig valide Untersuchungsmethode zurzeit ist der Virusneutralisationstest. Er ist durch eine hohe Spezifität hinsichtlich des Influenzasubtyps gekennzeichnet. Nachteil dabei ist die Arbeit mit lebendem Vollvirus, welches die Arbeit im Sicherheitslabor notwendig macht und dadurch einen hohen personellen und finanziellen Aufwand bedingt. Eine Alternative ist ein hochspezifischer serologischer Test, der ohne infektiöses Vollvirus auskommt. Für die Entwicklung eines solchen Tests sind verschiedene grundlegende technische Voruntersuchungen notwendig.

Zielsetzung dieser Arbeit war die Charakterisierung und Expression der rezeptorbindenden Domäne des Hämagglutininmonomers des Influenza A H5N1 Virus in *E.coli*.

Dazu sollte spezifisch der rezeptorbindende Anteil des Hämagglutinins anhand eines Strukturmodells abgegrenzt und in einen bakteriellen Vektor kloniert werden. Anschließend sollte eine Expression und Aufreinigung des viralen Proteins erfolgen.

Außerdem sollte die mögliche kompetitive Hemmung des exprimierten Proteins im Zellkultursystem untersucht werden. Hierfür sollte ein spezifisches Zellkultur- und Real-Time RT PCR basiertes Nachweissystem für H5N1 und H7N7 etabliert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

<u>Artikel</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Brutschränke	Memmert (Schwabach)
Gefrierschränke	
-20°C	Bosch (Stuttgart)
-80°C	Nunc (Wiesbaden)
Geldokumentation	Biostep (Jahnsdorf)
Gelelektrophoresekammer	Bio Rad (München)
Glaswaren	Schott
Heizblock	Eppendorf (Hamburg)
Kapillarsequenzier	Beckman-Coulter (Krefeld)
Magnetrührer	Ika (Staufen)
Mikroskope Leitz Diavert	Leitz (Wetzlar)
Neubauer Zählkammer	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
Photometer BioPhotometer	Eppendorf (Hamburg)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Real-Time Cyclers	
Light Cycler 1.5	Roche (Mannheim)
Light Cycler 480	Roche (Mannheim)
Sequenzier ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems Carlsbad USA
Sterilwerkbank	ICN Biochemicals (Eschwege)
Stickstofftanks	Taylor-Wharton (Mildstedt)
Thermocycler Peqlab primus 25	Peqlab (Erlangen)
UV-Tisch	Biozym (Oldendorf)
Vortexer	Ika (Staufen)
Waage	Scaltec (Göttingen)
Western Blot Kammer und Zubehör	Invitrogen (Karlsruhe)
Zentrifugen	
-Tischzentrifugen	Heraeus (Hanau)
-Ultrazentrifuge Sorvall	Thermo (Waltham, US)

2.1.2 Verbrauchsartikel

<u>Artikel</u>	<u>Bezugsquelle</u>
ELISA Platten	Greiner (Frickenhausen)
Falkons 15ml, 50ml	Sarstedt (Nürnberg)
Kryotubes 1,0 ml	Nunc (Wiesbaden)
Küvette	Eppendorf (Hamburg)
Light Cycler Kapillaren	Roche (Basel, Schweiz)
Nitrocellulose	Whatman (Kent, UK)
Pasteurkapillarpipetten	WU (Mainz)
PCR-Reaktionsgefäße	Abgene (Epsom, UK)
Pipetten 1,5, 10, 25ml	Sarstedt (Nürnberg)
Pipettenspitzen 10, 200, 1000 µl	Sarstedt (Nürnberg)
Reaktionsgefäße 1,5ml; 2,0 ml	Eppendorf (Hamburg)
Skalpelle	Braun (Tuttlingen)
Whatman Transfer Membran	Whatman (Kent, UK)
Ni-NTA Superflow Säulen	Qiagen (Hilden)
Zellkulturflaschen (25cm ² , 50cm ²)	Sarstedt (Nürnberg)
Zellkulturplatten (6-,24-,96-Lochplatten)	Sarstedt (Nürnberg)

2.1.3 Reagenzien/ Chemikalien

<u>Chemikalien</u>	<u>Hersteller</u>
Aceton	Roth (Karlsruhe)
Agar	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Sigma-Aldrich (München)
AmPure	Beckman-Coulter(Fullerton, USA)
Aqua dest.	Fresenius Kabi (Bad Homburg)
Avicel	FMC Biopolymer (Brüssel, BL)
Bovines Serum Albumin (BSA)	NEB (Ipswich, Maryland, USA)
Carbenicillin	Roth (Karlsruhe)
Coomassie-Blau-Farbstoff	Invitrogen (Karlsruhe)
Diatomeenerde	Sigma-Aldrich (München)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth (Karlsruhe)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich (München)

DMEM	PAA (Pasching, Österreich)
EDTA	Roth (Karlsruhe)
Essigsäure (EtCOOH)	Roth (Karlsruhe)
Ethanol	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Formaldehyd	Roth (Karlsruhe)
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA (Pasching, Österreich)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Guanidin HCl	Roth (Karlsruhe)
Harnstoff	MP Biomedicals (Illkirch, FR)
HCl	Roth (Karlsruhe)
Imidazol	Sigma-Aldrich (München)
Isopropyl- β -D-Thiogalactosidase (IPTG)	Invitrogen (Karlsruhe)
LB-Medium	Roth (Karlsruhe)
L-Glutamin	PAA (Pasching, Österreich)
L-Glutamin	PAA (Pasching, Österreich)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
MOPS	Invitrogen (Karlsruhe)
MOPS	Invitrogen (Karlsruhe)
NaH ₂ PO ₄	Merck (Darmstadt)
NaOH	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth (Karlsruhe)
NEAA (Nichtessentielle Aminosäuren)	PAA (Pasching, Österreich)
Nichtessentielle Aminosäuren (NEAA)	PAA (Pasching, Österreich)
Nickel-NTA Agarose	Qiagen (Hilden)
Paraffinöl	Merieux Marcy L'Etoile
Penicillin/ Streptomycin	PAA (Pasching, Österreich)
Penicillin/Stroptomycin	PAA (Pasching, Österreich)
PMSF	Roth (Karlsruhe)
Pyruvat	PAA (Pasching, Österreich)
Pyruvat	PAA (Pasching, Österreich)
RotiBlock	Roth (Karlsruhe)
SDS-Gele	Invitrogen (Karlsruhe)
SDS-Lade-Puffer (NuPage LDS 4x Sample Puffer)	Invitrogen (Karlsruhe)

Tris	Roth (Karlsruhe)
Trypsin-EDTA	PAA (Pasching, Österreich)
Tween 20	Roth (Karlsruhe)

2.1.4 Enzyme

EcoRI Restriktionsendonuklease	NEB (Frankfurt am Main)
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	NEB (Frankfurt am Main)
SuperScript™ One Step Reverse Transkriptase	Invitrogen (Karlsruhe)

2.2 Puffer; Lösungen und Medien

2.2.1 Puffer

Puffer	
PBS (<i>phosphate buffered saline</i>)	140 mM Natriumchlorid 2 mM Kaliumchlorid 10 mM Natriumhydrogencarbonat 2 mM Kaliumhydrogenphosphat
1x MOPS-Puffer für Protein-Elektrophorese und Western Blot	50 ml 20x MOPS 950 ml a.d.
20x Transferpuffer für Western Blot	10,2 g Bicine 13,1 g Bis-Tris 0,75 g EDTA 0,025 g Chlorbutanol
1x Transferpuffer für Western Blot	50 ml 20x Transferpuffer 100 ml Methanol 1 ml Antioxidant 849 ml a.d.
1x Blocklösung für Western Blot	1/10 Rotiblock (10x) 9/10 a.d.
1. AK-Lösung für Western Blot	10 ml 1x PBS 10 µl Tween 20 500 µl 1x Roti-Block-Lösung 10 µl Anti-HA 5-AK

2. AK –Lösung für Western Blot	10 ml 1xPBS 10 µl Tween 20 500 µl 1x Roti-Block-Lösung <u>+5 µl HRP-Anti-Rabbit-AK</u>
Waschpuffer für Western Blot	1x PBS <u>0,1% Tween 20</u>
TAE 50x	242 g Tris 500 ml a.d. 100 ml 0,5M EDTA 57,1 ml Essigsäure auf 1 l mit a.d. auffüllen <u>pH auf 7,8 einstellen</u>
LB-Medium	10,0 g Trypton 5,0 g Hefeextrakt 5,0 g Natriumchlorid auf 1 l a.d. <u>autoklavieren, pH auf 7,0</u>
SOC	20,0 g Trypton 5,0 g Hefeextrakt 0,5 g NaCl 2,5 g KCl auf 1l mit a.d. auffüllen pH auf 7,5einstellen <u>10 mM MgCl₂ hinzufügen</u>
Puffer für native Proteinaufreinigung	
10 mM Waschpuffer	9,8 ml PBS <u>200 µl Imidazol (2M)</u>
250 mM Elutionspuffer	7,0 ml PBS <u>1,0 ml Imidazol (2M)</u>
Puffer für denaturierende und renaturierende Proteinaufreinigung	
Lysispuffer A (Proteinaufreinigung)	13,8 g NaH ₂ PO ₄ (100mM) 1,2 g Tris Base (10mM) 573 g Guanidinhydrochlorid (6M) auf 1l mit a.d. auffüllen

Lysispuffer B	<p>pH mit NaOH auf 8 einstellen</p> <p>13,8 g NaH₂PO₄ (100mM)</p> <p>1,2 g Tris Base (10mM)</p> <p>480,5 g Urea (8M)</p> <p>auf 1 l mit a.d. auffüllen</p>
Waschpuffer C	<p>pH mit NaOH auf 8 einstellen</p> <p>Lysispuffer B</p>
Elutionspuffer D	<p>pH mit HCl auf 6 einstellen</p> <p>Lysispuffer B</p>
Elutionspuffer E	<p>pH mit HCl auf 5,9 einstellen</p> <p>Lysispuffer B</p>
Harnstofffreier Waschpuffer	<p>pH mit HCl auf 4,5 einstellen</p> <p>1,2 g Tris Base</p> <p>13,8 g NaH₂PO₄</p> <p>auf 1 l mit a.d auffüllen,</p> <p>pH auf 8 einstellen</p>

2.2.2 Zellkulturmedien

Medium	Zusammensetzung
Erhaltungsmedium	<p>500 ml DMEM</p> <p>50 ml FCS Gold</p> <p>5 ml Pyruvat</p> <p>5 ml Nicht-essentielle AS</p> <p>5 ml Penicillin Streptomycin_</p> <p>5 ml L-Glutamin</p>
Infektionsmedium	<p>500 ml DMEM</p> <p>10 ml FCS</p> <p>5 ml Penicillin/ Streptomycin</p> <p>5 ml NEAA</p>
Einfriermedium	<p>20 ml Erhaltungsmedium</p> <p>+5 ml DMSO</p> <p>30 ml FCS</p>

2.2.3 Kits

Champion pET Directional TOPO Expression Kits	Invitrogen (Karlsruhe)
Genome Lab Methods Development Kit (Sequenzierung)	Beckman-Coulter (Krefeld)
QIAEX II (Gelextraktion)	Qiagen (Hilden)
Opti 4 CN	BioRad (München)
QIAamp Viral RNA Mini Kit	Qiagen (Hilden)
QIAprep Miniprep-Kit	Qiagen (Hilden)
Roti Quant	Roth (Karlsruhe)

2.2.4 Verwendete Vollvirusstämme

Influenza A Virus (A/mallard/Bavaria/1/2006(H5N1))
Influenza A Virus (A/Bratislava(H7N7))
Influenza A Virus (A/Sichuan/2/87/(H3N2))

2.2.5 Verwendete Antikörper

Monoklonaler Maus V5 AK	Invitrogen (Karlsruhe)
Peroxidase-konjugierter Anti-Rabbit-AK	Dako (Glostrup, DK)
Polyklonaler Rabbit-AK Anti Avian Influenza A HA (H5N1)	Abcam (Cambridge, UK)
RhodaminRot Goat Anti-Mouse-AK	Dianova (Hamburg)

2.2.6 Plasmide

2.2.6.1 Plasmid mit Virussequenz

pRT 611 Vietnam (A/Viet Nam/1194/2004(H5N1))
Segment 4, Hämagglutinin Gen
(Sequenz in 12 abgebildet)

freundlicherweise zur Verfügung
gestellt durch R.Fouchier,
Department of Virology, Erasmus
Medical Centre, Rotterdam,
Netherlands

2.2.6.2 Verwendete Vektoren

pET 102/ D-TOPO	Invitrogen (Karlsruhe)
pET 151/ D TOPO	Invitrogen (Karlsruhe)

2.2.7 Bakterienstämme

TOP10 Zellen (<i>E.coli</i>)	Invitrogen (Karlsruhe)
--------------------------------	------------------------

BL 21* Star (DE3) (*E.coli*)

Invitrogen (Karlsruhe)

2.2.8 Zelllinien

MDCK 2 Zellen

freundlicherweise zur Verfügung gestellt
durch Dr. Baumgarte, Hygieneinstitut
Hamburg

MDCK 2 Zellen

freundlicherweise zur Verfügung gestellt
durch S.Linke, RKI, Arbeitsgruppe
Influenza, Berlin

2.2.9 Molekulargewichtsmarker

GeneRuler™ 100bp DNA Ladder, 100-3000bp

Fermentas (St.Leon Roth)

GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, 250-10.000bp

Fermentas (St.Leon Roth)

Supercoiled DNA Ladder

NEB (Ipswich, UK)

PageRuler™ Unstained Protein Ladder

Fermentas (St.Leon Roth)

PageRuler™ Prestained Protein Ladder

Fermentas (St.Leon Roth)

2.2.10 Primer

Primer zur Herstellung von PCR Produkten

Sense-Primer: H5 fwd: 5'-caccGTGAAGCCTCTAATTTTGAGAGATTG-3'

Antisense-Primer: H5 rev: 5'-ACCATATTCCAATTCACCTTTCATAATTGTTGAG-3'

Sequenzierprimer:

Sense-Primer:

T7 fwd.prom: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

TrxFus fwd: 5'-TTCCTCGACGCTAACCTG-3'

Antisense-Primer T7 rev: 5'-TAGTTATTGCTCAGCGGTGGC-3'

Real-Time RT PCR Primer und Light Cycler Sonde:

LC Sonde M+64: 6FAM-TCAGGCCCCCTCAAAGCCGA XT—PH

Sense-Primer M+25: 5'-AGATGAGTCTTCTAACCGAGGTCG-3'

Antisense-Primer M-124: 5'-TGCAAAAACATCTTCAAGTCTCTG-3'

2.3 Verwendete Software

Windows Office 2003	Microsoft Cooperation, USA
Adobe Photoshop 7.0	Adobe, San Jose, USA
EndNote X	Thomson Reuters, Carlsbad, USA
ExPASy Proteomics	Swiss Institute for Bioinformatics (SIB), Lausanne, Swiss
Cn3D 4.1	NCBI (National Center for Biotechnology Information), USA
NCBI Homepage	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Lasergene (MapDraw, Protean)	DNASTAR Inc., Madison, USA
BioEdit SeqMan	Ibis Bioscience, Carlsbad, USA

2.4 Methoden

2.4.1 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Größenauftrennung von DNA-Fragmenten, da ein logarithmischer Zusammenhang zwischen dem Molekulargewicht der DNA und der Wanderungsgeschwindigkeit im Gel besteht.

Zur Herstellung eines Gels wurde je nach erwarteter Fragmentgröße 1,0-1,5 g Agarose in 100ml 1x TAE-Puffer eingewogen und kurz erhitzt, bis die Agarose sich vollständig gelöst hatte. Es wurden 2,5 µl Ethidiumbromid zugegeben, welches mit der DNA interkaliert und diese dadurch im UV-Licht sichtbar gemacht werden konnte. Die noch flüssige Agarose wurde in einen Gelschlitten gegossen und nach Aushärten in eine Elektrophoresekammer mit 1x TAE-Puffer gegeben. Die Proben wurden mit 6x Laufpuffer gemischt und vorsichtig in die Geltaschen pipettiert. Zur Größenbestimmung wurden 5 µl Molekulargewichtsmarker verwendet. Die Elektrophorese erfolgte für 30-45 min bei einer angelegten Spannung von 80 V. Die Laufgeschwindigkeit betrug 10 V/cm Gellänge. Anschließend wurde das Gel unter einer UV-Lampe betrachtet und zur Dokumentation photographiert.

2.4.2 DNA-Präparation aus Agarosegel

Um die DNA aufzureinigen, wurde die gewünschte Bande aus dem Agarosegel unter UV-Licht mit einem scharfen Skalpell herausgeschnitten, der Agarosegelwürfel gewogen und die DNA mit dem *QIAEX II Kit (Qiagen)* aufgereinigt.

Dafür wurde zu dem Gelwürfel die sechsfache Menge an PufferQX gegeben und dieser bis zur vollständigen Auflösung bei 50°C schüttelnd inkubiert. Die enthaltene Kieselsäure mit der daran gebundenen DNA wurde durch Zentrifugation (13000rpm/ 30sec) sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 500 µl Puffer QXI resuspendiert und es folgte ein zweimaliger Waschschrift mit je 500 µl PE-Puffer. Nach dem letztmaligen Zentrifugieren wurde der Überstand erneut verworfen und das Pellet getrocknet. Dieses wurde in 50 µl Elutionspuffer aufgenommen, für 10 min bei 50°C inkubiert und für 10 min bei 13000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, darin befand sich die aufgereinigte DNA zur Weiterverwendung.

2.4.3 Klonierung von PCR-Produkten

Als Klonierung bezeichnet man die Einführung eines DNA-Fragmentes in einen Vektor. Das daraus entstandene Plasmid kann als ringförmige DNA in Bakterienzellen transformiert werden und wird in diesen repliziert. Dadurch lässt es sich beliebig vervielfachen. Kodiert das DNA-Fragment für ein Protein und ist ein entsprechender Promoter vorhanden, lässt sich dieses dadurch anschließend exprimieren.

Die Klonierung erfolgte mit dem *Champion pET Directional TOPO Expression Kit* (Invitrogen) in nachfolgenden Einzelschritten:

Auswahl einer geeigneten PCR-Strategie und eines Vektors, Konstruktion der PCR-Primer und Herstellung von PCR Produkten, Amplifizierung des gewünschten Genabschnittes, Klonierungsreaktion und Transformation von chemisch kompetenten *E.coli*.

2.4.3.1 Allgemeines Primerdesign

Die synthetisierten Oligonukleotide waren optimalerweise zwischen 20-25 Basen lang. Sie sollten nicht mehr als vier gleiche Basen hintereinander haben, für Guanidin nicht mehr als drei. Insgesamt sollte der G-C Gehalt nicht unter 40% sein, optimalerweise ist er 50-60%. Am 5'Ende sollten mindestens drei starke Bindungen (C, G) vorhanden sein, am 3'Ende nicht mehr als zwei. Der G-C Gehalt sollte in Vorwärts- und Rückwärtsprimer ungefähr gleich sein, um ein ähnliches Schmelzverhalten zu gewährleisten.

2.4.3.2 Konstruktion der PCR-Primer

Für die Amplifizierung des ausgewählten Genabschnittes und die anschließende Klonierung in *pET/D-TOPO*-Vektoren wurden spezielle PCR-Primer benötigt. Diese dienten der Markierung des Amplifikates, um es anschließend in korrekter Orientierung in den Vektor klonieren zu können.

Am 5' Ende des Vorwärtsprimers wurde die Sequenz CACC angefügt, welche mit der Überhangssequenz GTGG des *pET TOPO* Vektors Basenpaare bilden sollte.

Der Rückwärtsprimer wurde komplementär zu dem zu amplifizierenden Genabschnitt entworfen unter Beachtung der allgemeinen Regeln zum Primerdesign. Es wurde kein Überhang zur Vektorsequenz benötigt, da die Orientierung durch das CACC Motiv des Vorwärtsprimers gewährleistet wurde. Um eine Umkehr der Orientierung zu vermeiden, sollte dieses Motiv im Rückwärtsprimer vermieden werden.

Die zur Proteinherstellung benötigte Gensequenz für das Stoppcodon war auf dem Vektor enthalten.

2.4.3.3 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (*PCR*) dient der Vervielfältigung eines DNA-Stranges. Die PCR besteht aus einer sich zyklisch wiederholenden Reaktion. Bei der Denaturierung werden dabei die beiden DNA Stränge durch Hitzeeinwirkung aufgetrennt. Durch Temperaturabsenkung erfolgt das Annealing, bei dem sich die konstruierten Oligonukleotide (*Primer*) an die Zielsequenz anlagern. Im Temperaturoptimum der eingesetzten Polymerase erfolgt dann die Strangsynthese, bei dem durch Anlagerung von Nukleotiden an den Matrizenstrang der Tochterstrang synthetisiert wird. Mit jedem Zyklus verdoppelt sich somit die Kopienzahl der Zielsequenz.

2.4.3.4 Herstellung von blunt-end-PCR-Produkten

Um den gewünschten Genabschnitt in den verwendeten Plasmidvektor zu klonieren, wurden sogenannte blunt-end-PCR-Produkte benötigt. Diese besaßen keine Basenüberhänge und wurden mit den zuvor konstruierten Primern hergestellt. Durch den Vorwärtsprimer wurde am 5' Ende eine zusätzliche Sequenz angehängen, um eine korrekte Orientierung im ausgewählten Plasmidvektor zu erreichen. Durch die ausgewählte Phusion Polymerase wurden keine zusätzlichen Nukleotide angefügt.

Zu 0,5 µl (50ng) Template-DNA wurden je 1 µl (200µM) jedes Primers, 0,5 µl (1U) Phusion High Fidelity DNA Polymerase, 4 µl dNTP-Mix und 10 µl HF-Puffer gegeben und mit 33 µl a.d. auf ein Reaktionsvolumen von 50 µl aufgefüllt.

Die PCR wurde im Thermocycler bei folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

Allgemeines Temperaturprofil:

Temperatur in °C	Zeit in sec	Zykluszahl
98	20	1
98	10	
58	20	35
72	20	

2.4.3.5 Aufreinigen von PCR-Produkten mit AMPure

In Lösung befindliche DNA kann mit Hilfe von magnetischen Partikeln vorübergehend gebunden und die Lösung somit mehrfach gewaschen werden. Die DNA Lösung wird dadurch von überschüssigem Puffer, Primer und Nukleotiden gereinigt. Die Technik wird als SPRI-Technik bezeichnet (*Solid Phase Reversible Immobilization*). [65]

Dieses Prinzip wurde sowohl für die Aufreinigung von PCR-Produkten wie auch in der Sequenzierreaktion angewendet. Dafür wurden *AMPure* und *CleanSeq* der Firma Agencourt verwendet.

Für die Aufreinigung wurden 50 µl des PCR Produktes mit dem 1,8fachen Volumen von *AMPure* versetzt, gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur, dann weitere 10 min auf der Magnetplatte inkubiert. Die gebundene DNA bildete einen magnetisch gebunden Ring am Reaktionsgefäß und die Lösung wurde klar. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgezogen, ohne den Partikelring zu berühren. Anschließend wurde zweimalig mit je 200 µl 70% Ethanol gewaschen. Um die DNA zu eluieren, wurden 40 µl EB dazugegeben, die Magnetpartikel durch die Magnetplatte fixiert und der klare Überstand mit der aufgereinigten DNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.4.3.6 Ligation von PCR-Produkten in Plasmidvektoren

Bei der Ligation werden zwei DNA-Abschnitte mittels des Enzyms Ligase miteinander verbunden. Dadurch wird die gewünschte Sequenz, welche durch eine PCR hergestellt wurde, in einen Plasmidvektor verbracht.

Bei der eingesetzten TOPO-Klonierung war dieser Schritt ohne Ligase möglich. Das Insert wurde am 5'Ende durch eine Vierbasensequenz markiert, welche dem Basenüberhang des Vektors am 3'Ende entsprach. Vor dieser Basensequenz befand sich die Topoisomerase, die diese Verbindung in der richtigen Orientierung stabilisierte. Das 3'Ende des Inserts lag ohne Erkennungssequenz vor.

Dafür wurden frisch hergestellte PCR-Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen und die Qualität und Quantität überprüft. Anschließend wurden die PCR-Produkte aufgereinigt und photometrisch quantifiziert.

In der Arbeit wurden für die Ligation die Plasmidvektoren Vektoren *pET 102 D/TOPO* und *pET 151 D/TOPO* verwendet. Das Verhältnis zwischen eingesetztem PCR-Produkt und Vektor entsprach dabei 4:1. Die Ligation erfolgte nach folgendem Protokoll:

Reagenz	Eingesetzte Menge
PCR-Produkt	4µl
Salzlösung	1µl
Vektor	1µl

Der Reaktionsansatz wurde vorsichtig gemischt und für 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in TOP 10 Zellen transformiert.

2.4.3.7 Transformation in TOP 10 *E.coli*-Zellen

Bei einer Transformation werden Plasmide in Bakterienzellen übertragen.

TOP 10 *Escherichia coli* (*E.coli*) Zellen sind chemisch kompetente Bakterien, die durch Temperaturänderung Plasmide aufnehmen. In den bakteriellen Vektoren können Plasmide analysiert, erhalten und propagiert werden. Eine Expression möglicher toxischer, in den Plasmiden enthaltener, Proteine wird durch die Abwesenheit eines T7-Promoters verhindert.

Für die Transformation wurden 3 µl Ligationsprodukt auf TOP 10 *E.coli* Zellen gegeben, vorsichtig durch Rühren mit der Pipettenspitze gemischt und 15 min auf Eis gestellt. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 30 sec wurden 250 µl SOC Medium dazugeben und die transformierten Bakterien für eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden je 100 µl davon auf Carbenicillinplatten ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden fünf Klonkolonien mit einer Pipettenspitze vorsichtig aufgenommen, in 5 ml LB-Medium mit Carbenicillin gegeben und wieder über Nacht schüttelnd bei 37°C inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurden die Klone auf das Vorhandensein des Plasmids und die korrekte Orientierung des eingefügten Genabschnitts untersucht.

2.4.4 Klonscreening

Das Klonscreening dient der Isolierung und Analyse von Plasmid-Klonen, die den gewünschten Genabschnitt (das Insert) aufgenommen haben. Dies erfolgte nach Plasmid-DNA-Isolierung aus den Bakterienzellen mittels Restriktionsverdau und anschließender Sequenzreaktion.

2.4.4.1 Plasmid-DNA-Isolierung aus Bakterien

Die Plasmid-Isolierung aus transformierten Bakterien dient der Aufreinigung des Plasmids zur Analyse, sowie zur Transformation in neue Bakterienstämme und der anschließenden Expression der zu untersuchenden Proteine.

Sie erfolgte mit dem *QIAprep Miniprep Kit* der Firma Qiagen nach dem nachfolgenden Protokoll für low-copy-Vektoren aus Flüssigkultur. Alle verwendeten Puffer sind im Kit enthalten.

Die Bakterien wurden durch Zentrifugation pelletiert und eine Zelllyse durchgeführt. Dafür wurden 250 µl RNAase-haltiger Puffer P1 zugegeben und das Pellet wurde durch vortexen resuspendiert. Dazu wurden 250 µl Puffer A2 pipettiert und mit der Lösung durch invertieren gemischt. Nach ca. 5 min begann diese klar zu werden und es wurden 300 µl Puffer A3 zugefügt und die Lösung erneut durch Invertieren des Reaktionsgefäßes gemischt. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde der Überstand auf eine Säule gegeben, die eine Siliziummembran enthielt. Die Plasmid-DNA konnte bei salzreichem Puffer an diese binden und durch salzarme Puffer eluierbar werden. Nach Zentrifugation wurde der Durchfluss verworfen und die gebundene Plasmid-DNA mit 0,5 ml Puffer PB und 0,75 ml Puffer PE gewaschen, erneut zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die Elution erfolgte mit 50 µl Elutionspuffer EB.

2.4.4.2 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau der Plasmid-DNA dient der Überprüfung, ob das Insert in dem Plasmidvektor vorhanden ist. Dafür werden Restriktionsendonukleasen verwendet, die eine ganz spezielle Basensequenz in der DNA erkennen und an dieser Stelle schneiden.

Dafür wurde ein Restriktionsenzym mit Hilfe von MapDraw (Programm zur Darstellung von Vektor und Insert als Sequenz mit Restriktionsschnittstellen) ausgewählt, welches im Insert, aber nicht im Vektor schneidet. Hat der Vektor das Insert mit der Schnittstelle aufgenommen, kann die DNA linearisiert werden. Durch die Linearisierung ist sie aufgrund ihrer

Konformation größeren Wanderungshindernissen ausgesetzt als ringförmig geschlossene, in sich verdrehte (supercoiled) Plasmid-DNA und wandert dadurch deutlich langsamer im Gel. Für den Restriktionsverdau wurden 0,1 µl Restriktionsenzym mit 1 µl Puffer versetzt und mit jeweils 10 µl Plasmid-DNA für eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend mittels eines Agarosegels analysiert.

2.4.4.3 Sequenzanalyse

Die Sequenzierungsmethode durch den Kettenabbruchnachweis geht auf Sanger zurück.[66] Dafür wurde das *Genome Lab Methods Development Kit* der Firma Beckman-Coulter verwendet.

Es enthält neben einer DNA Polymerase und Desoxynukleotiden, fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide, welche durch Einbau in den synthetisierten Strang zum Kettenabbruch führen. Statistisch gesehen findet dieses Ereignis basenspezifisch an jeder beliebigen Position statt. Diese werden der Größe nach aufgetrennt und der basenspezifische Farbstoff durch einen Laser angeregt und gemessen. Anhand der spezifischen aufgezeichneten Farbsignale lässt sich die Abfolge der einzelnen Basen und somit die Sequenz der DNA bestimmen.

Dies wurde im Kapillarsequencer CEQ 2000 (Beckman-Coulter) durchgeführt und mit Hilfe von DNA Star ausgewertet. Für die Sequenzierung wurde vorab eine Amplifikation der zu analysierenden Plasmidsequenz mittels PCR durchgeführt und diese mit AMPure aufgereinigt.

2.4.4.4 CEQ-Reaktion

Die Sequenzierreaktion nach folgendem Protokoll angesetzt:

5 µl	aufgereinigtes PCR Produkt
2 µl	CEQ (Desoxynukleotide, Polymerase und fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide)
1 µl	Primer
0,5 µl	DIL-Puffer
1,5 µl	a.d.

Das wie oben angesetzte Reaktionsgemisch wurde in einem Thermocycler mit nachfolgendem Protokoll inkubiert:

	Temperatur in °C	Zeit in sec	Zyklenzahl
Denaturierung	95	20	
Annealing	50	20	40
Elongation	60	240	

2.4.4.5 Aufreinigen der CEQ-Reaktion

Die Sequenzierreaktion wurde mit CleanSeq der Firma Agencount aufgereinigt und beruht wie in 2.4.3.5 beschrieben, auf der SPRI Technik. Dafür wurden 10 µl des Reaktionsproduktes mit 10 µl Clean Seq Magnetpartikeln (*Beads*) und 42 µl 85% Ethanol gemischt und für 5 min auf eine Magnetplatte gestellt. Der klare Überstand wurde vorsichtig entfernt ohne den magnetisch gebundenen Rand zu berühren. Danach wurde zweimal für 5 min mit 85% Ethanol gewaschen und dieser anschließend abpipettiert. Nach Trocknung des Reaktionsgefäßes mit den immer noch gebundenen Beads wurden 30 µl SLS dazugegeben, das Probenröhrchen von der Magnetplatte genommen und die Nukleinsäure dadurch gelöst. Zum Entfernen der Magnetpartikel wurde das Reaktionsgefäß wieder auf die Magnetplatte verbracht, die klare Lösung mit der aufgereinigten Nukleinsäure abpipettiert und direkt im Kapillarsequencer ausgelesen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm *DNA Star*.

2.4.5 Expression des PCR-Produktes

2.4.5.1 Transformation von H5-Plasmid in BL 21*-Zellen

Bei der Transformation wird Plasmid-DNA in Bakterienzellen übertragen, welche nach Induktion das gewünschte Protein exprimieren.

Dafür wurde der BL21* *E.coli* Stamm verwendet, welcher speziell für die durch einen T7-Promoter regulierte Genexpression hergestellt wurde. Dieser ist ein Bakteriophagen-Promoter, der eine sehr starke Aktivität besitzt und spezifisch von der T7-RNA Polymerase erkannt wird und welche im verwendeten pET Vektor enthalten ist.

Dazu wurden chemisch kompetente *E.coli* Bakterienzellen BL21* 5 min auf Eis aufgetaut und 2 µl aufgereinigte Plasmid-DNA dazugegeben. Die Reaktion wurde für 30 min auf Eis inkubiert, anschließend folgte ein Hitzeschock für 30 sec im Wasserbad bei 42°C. Danach wurde 250 µl auf Zimmertemperatur erwärmtes SOC Medium hinzugefügt und der Reaktionsansatz für weitere 30 min bei 250 rpm im Thermomixer bei 37°C geschüttelt.

Die transformierten Bakterienzellen wurden vollständig in 10 ml LB-Medium, versetzt mit 50 µg/ml Carbenicillin, gegeben und über Nacht bei 37°C im Brutschrank schüttelnd inkubiert. Auf dem verwendeten pET Vektor war eine β-Laktamase kodiert, welche zu einer

Resistenz gegen das β -Laktamantibiotika wie Ampicillin oder Carbenicillin, führte. Dadurch konnten Bakterienzellen, die das Plasmid aufgenommen haben, selektioniert werden.

Die Übernachtskultur wurde in einer Pilotexpression analysiert und für die anschließende Expression zur Proteinherstellung verwendet.

2.4.5.2 Pilotexpression

Bei der Pilotexpression wurden Proben der Bakterienkultur zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht, um die besten Bedingungen für die Expression herauszufinden.

Dafür wurden 500 μ l der Übernachtskultur in 10 ml Carbenicillinhaltiges LB-Medium gegeben und ca. zwei Stunden bei 37 C schüttelnd inkubiert. Bei einer OD 600 (photometrisch bestimmte Bakteriendichte) zwischen 0,5 bis 0,8 befanden sich die Bakterien in der mittleren Wachstumsphase und die Kultur wurde auf zweimal 5 ml Kulturen aufgeteilt. Eine davon wurde mit 5 μ l 1M IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert. Die andere 5 ml Kultur wurde nicht induziert und unter gleichen Reaktionsbedingungen mitgeführt. Es wurden 500 μ l Probe pro Kultur als Nullpunktprobe abgenommen, bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet bei -20°C eingefroren. Die Kulturen wurden bei 37°C weiter inkubiert. Zwischen vier und sechs Stunden nach Induktion wurden stündlich je 500 μ l Proben entnommen, zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet eingefroren. Anschließend wurden alle Proben gleichzeitig analysiert und miteinander verglichen.

2.4.5.3 Probenanalyse

Die entnommenen Proben wurden aufgetaut, mit je 50 μ l 2x SDS Ladepuffer und je 5 μ l DTT versetzt, 15 min bei 99 °C erhitzt und anschließend 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Auf ein SDS-Page Gel wurden 10 μ l jeder Probe sowie ein Größenmarker aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und angefärbt.

Die Qualität und Quantität der Proteinexpression konnte vorab anhand des Größenmarkers und der Dicke der angefärbten Proteinbande abgeschätzt werden. Die nichtinduzierte Probe diente dabei als Negativkontrolle. Eine genaue Quantifizierung schloss sich nach der Aufreinigung mittels Bradford Assay an.

Eine abschließende Kontrolle, ob die exprimierte Proteinbande dem gewünschten Protein entspricht, wurde mit einem Western Blot durchgeführt.

2.4.5.4 Expression zur Proteinherstellung

Die Expression dient zur Herstellung größerer Mengen des gewünschten rekombinanten Proteins.

Die 10 ml Übernachtskultur wurden à 5 ml geteilt, zu jeweils 500 ml LB-Flüssigmedium mit Carbenicillin gegeben und für ca. 2 h bei 37°C inkubiert. Bei einer OD 600 (photometrische bestimmte Bakteriendichte) von ca. 0,6 wurde in jede Kulturflasche 0,5 ml IPTG (Endkonzentration 1 mM) gegeben, um die Proteinexpression zu induzieren. Nach ca. 4 h, dem vorher in der Pilotexpression ermittelten besten Zeitpunkt, wurden die Bakterienzellen bei 6000 rpm für 15 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde anschließend aufgereinigt oder bis zur Weiterverwendung bei -20°C eingefroren.

2.4.6 Proteinaufreinigung

Die in den Bakterienzellen exprimierten Proteine befinden sich innerhalb der Bakterienzelle und sind je nach Löslichkeit des Proteins im Zytoplasma enthalten. Bei schlecht löslichen Proteinen bilden diese Proteinaggregate, sogenannte Inclusion bodies, im Zytoplasma.

Proteine bilden räumliche dreidimensionale Strukturen aus, welche für die Funktion dieser elementar sind. Diese werden durch Wasserstoffbrückenbindungen, Disulfidbrücken und nichtkovalente Wechselwirkungen ausgebildet, wie beispielsweise hydrophobe Kräfte des Polypeptidrückrats sowie der Aminosäurereste der Seitenketten.

Zur weiteren Charakterisierung und Verwendung des rekombinant hergestellten Proteins war es notwendig dieses aus den Bakterienzellen zu lösen und es von Zellresten und Organellen zu reinigen. Dafür wurden verschiedene Aufreinigungsmethoden verwendet.

2.4.6.1 Native Proteinaufreinigung

Bei der nativen Proteinaufreinigung wird die native räumliche Struktur des exprimierten Proteins während der Aufreinigung beibehalten.

Dazu wurde das Bakterienpellet für 15 min auf Eis aufgetaut und in 10 ml PBS resuspendiert. Es wurden 100 µl PMSF zugefügt, welches als Proteaseinhibitor fungierte und die Lösung für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde eine Zellyse mit Ultraschall durchgeführt, wobei bei 250 W Impulse für je 20 sec gegeben wurden folgend von einer Pause von 20 sec, um ein Überhitzen zu vermeiden. Dies wurde fortgeführt, bis die Lösung durchscheinend wurde. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 4000 rpm für 15 min bei 4°C abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und pro 4 ml mit 1 ml Nickel-NTA-Agarose für mindestens 30 min gemischt. Das Gemisch wurde auf eine *Ni-NTA Superflow* Säule gegeben und der Durchfluss aufgefangen. Danach wurde fünf Mal mit je 1 ml 10 mM Waschlösung gewaschen. Die Elution erfolgte vier bis sechs Mal mit je 500 µl 250 mM Elutionslösung.

Die gesammelten Proben wurden mittels eines SDS-Gels analysiert.

2.4.6.2 Denaturierende Proteinaufreinigung

Bei der denaturierenden Proteinaufreinigung wird die räumliche Struktur des Proteins mit hohen Salzkonzentrationen zerstört, um eine Lösung des Proteins zu erzielen. Durch eine Absenkung des pH-Wertes wird das Protein anschließend von der Säule gelöst.

Das Bakterienpellet wurde dafür ca. 15 min auf Eis aufgetaut, ausgewogen und in 5 ml Lysispuffer A (6M GuanidinHCl) oder B (8M Harnstoff) pro Gramm Pellet resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen bei Raumtemperatur für eine Stunde geschüttelt, bis die Lösung durchscheinend wurde. Durch nachfolgende Zentrifugation bei 10.000 rpm für 30 min wurde der Überstand von Zellresten separiert und dieser mit 1 ml Ni-NTA-Agarose pro 4 ml Überstand versetzt und für mindestens eine halbe Stunde bei Raumtemperatur schüttelnd vermischt. Das Gemisch wurde auf eine Säule gegeben und der Durchfluss aufgefangen. Es folgte ein zweimaliger Waschschriff mit je 4 ml Puffer C. Die Elution wurde zunächst viermalig mit je 500 µl Puffer D und danach viermalig mit je 500 µl Puffer E durchgeführt.

Die gesammelten Proben wurden über ein SDS-Page Gel mittels CoomassieBlue Färbung analysiert.

2.4.6.3 Renaturierende Proteinaufreinigung

Bei der renaturierenden Aufreinigung wird durch einen Harnstoffgradienten der Salzgehalt der Reinigungslösung so verändert, dass das Protein, welches vorher zur Lyse denaturiert wurde, auf der Aufreinigungssäule in seine räumliche Struktur zurückgefaltet wird.

Dafür wurde wieder das Zellpellet auf Eis aufgetaut und mit 5 ml Lysispuffer mit GuanidinHCl (8 M) oder Harnstoff (6 M) pro Gramm versetzt und bis zur Lyse geschüttelt. Diese wurden dabei in zwei unabhängigen Versuchen äquimolar ausgetauscht und die Ergebnisse miteinander verglichen.

Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 10.000 rpm. Der Überstand wurde mit 4 ml Nickel-NTA-Agarose pro Gramm für 30 min gemischt und anschließend auf eine Säule gegeben. Vorab wurden Renaturierungspuffer hergestellt, wobei Lysispuffer B (8 M) in 1-molaren Schritten so verdünnt wurde, so dass acht verschieden konzentrierte Harnstofflösungen (7 M – 1 M Harnstoff und harnstofffreier Puffer) zur Renaturierung bereitstanden. Die Renaturierung erfolgte mit je 1 ml Puffer in absteigender Harnstoffkonzentration. Anschließend wurde vier Mal mit je 500 µl harnstofffreiem Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte achtmalig mit je 500 µl 250 mM Imidazolösung.

Analysiert wurden die gesammelten Proben über ein SDS-Page-Gel mittels CoomassieBlue Färbung.

2.4.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-(Natriumdodecylsulfat) PAGE dient der Größenauftrennung von Proteinen. Dafür wurde ein vorgefertigtes SDS-PAGE-Gel (Invitrogen) in eine Elektrophoresekammer eingebaut, diese mit Elektrophoresepuffer gefüllt und das Gel anschließend mit vorbereiteten Proben a 10 µl bestückt. Weiterhin wurde ein Proteinmarker aufgetragen. Die Vorbereitung der Proben diente der Denaturierung durch SDS und der Reduktion von Disulfidbrücken durch DTT. Dafür wurden 15 µl Probe mit 15 µl 2x SDS-Loading Puffer und 3 µl DTT für 5 min bei 95°C aufgekocht. Anschließend wurde bei 13000 rpm zentrifugiert um eventuell entstandene Kristalle aus der Lösung zu entfernen. Die angelegte Spannung betrug 150 V. Nachdem der sichtbare Ladepuffer die untere Gelgrenze erreicht hatte, wurde die Stromzufuhr gestoppt und die Proteine mit Coomassie-Blau gefärbt oder mit einem Western Blot analysiert.

2.4.8 Western Blot

Der Western Blot dient der Übertragung der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran mittels Elektrophorese. Der genaue Nachweis der separierten Proteine erfolgte mit einer Immundetektion mit Antikörpern, an die eine enzymatische (HRP) Reaktion zur Visualisierung gekoppelt waren.

Für den Western Blot wurde ein SDS-Page-Gel mit je 10 µl Proteinprobe wie in 2.4.7 beschrieben durchgeführt. Das Gel wurde vorsichtig aus der Kammer genommen. Blotting-Pads, Filterpapier und die Membran wurden vorher in 1x Transferpuffer getränkt. Der Aufbau der Blotkammer erfolgte von der Anode an wie folgt: Nach zwei durchtränkten Blottingpads folgten ein Filterpapier, die Membran sowie das vorher gelaufene Gel, welches vorher vorsichtig auf die Nitrocellulosemembran gelegt wurde. Es folgte ein weiteres Filterpapier und zwei weitere Blottingpads. Anschließend wurde die Blottingkammer verschlossen, um ein Verrutschen der Membran auf dem Gel zu verhindern, die äußere Kammer mit a.d. gefüllt und für eine Stunde bei 30V geblottet.

Anschließend wurde die Kammer auseinandergebaut und die Membran über Nacht mit 20 ml 1x Roti-Block bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert, um freie Bindungsstellen zu blockieren. Am nächsten Morgen wurde die Blockierlösung abgegossen und eine Antikörper-Detektion durchgeführt. Dafür wurde eine 1:1000 Verdünnung des Primärantikörpers mit PBS

+ 0,1% Tween 20 und 0,5% Rotiblock hergestellt, diese Lösung auf die Membran gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Der Primärantikörper war gegen das nachzuweisende Protein gerichtet. Anschließend wurde dreimalig mit PBS + 0,1% Tween 20 (PBS-T) gewaschen und dadurch der nichtgebundene Erstantikörper entfernt werden. Anschließend wurde der Zweitantikörper in einer 1:2.000 Verdünnung in PBS-T und 0,5% Rotiblock eingesetzt und für zwei Stunden inkubiert. Mit dem Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper konnte die Bindung des Erstantikörpers spezifisch nachgewiesen werden. Nach Inkubation von 2 h wurde die Membran ebenfalls dreimalig mit PBS-T für je 10 min gewaschen und dadurch überschüssiger Antikörper entfernt. Die Peroxidasereaktion wurde mit Opti-4-CN durchgeführt, der Blot wurde damit überschichtet und für 15 min gekühlt geschüttelt. Bei Bindung zwischen dem Antikörper gegen das exprimierte Protein, wurde diese Bindung durch den Zweitantikörper als graue Bande sichtbar gemacht.

2.4.9 Proteinquantifizierung nach Bradford

Um Proteinmengen zu quantifizieren, wurde der Bradford Test verwendet [67]. Durch Bindung von *Coomassie blue* an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm ohne Protein zu 595 nm mit Protein. Die Zunahme der Absorption bei 595nm entspricht dabei der Konzentration an Protein. Da das Maß der Farbreaktion von dem eingesetzten Protein abhängt, ist eine Kalibrierung mit einem Standardprotein wie BSA notwendig. Als Farbagens wurde *Roti-Quant* der Firma Roth verwendet.

Dafür wurde eine Standardverdünnungsreihe von BSA (0-100 µg/ml) hergestellt, diese sowie die zu bestimmenden Proteinproben à 50 µl in eine Mikrowellplatte pipettiert, mit 200 µl verdünnter *Roti-Quant* Lösung versetzt und nach 5 min bei 590 nm Wellenlänge im Photometer gemessen. Aus den Messwerten der Standardreihe von BSA wurde eine Eichkurve erstellt, anhand dessen die Konzentration an Protein in der gemessenen Probe abgelesen werden konnte.

2.4.10 Methoden der Zellkultur und Virusanzucht

2.4.10.1 Kultivieren und Passagieren von Zellen

Die adhärennten Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) Zellen wurden in 10 ml Erhaltungsmedium (MEM) in 25 cm² Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank gehalten. Ein Mediumwechsel wurde alle 2-3 Tage durchgeführt.

Eine Passage der Zelle wurde bei Konfluenz des Zellrasens durchgeführt. Dafür wurde das Medium abgenommen, mit 10 ml 1x PBS gewaschen und die Zellen mit 3 ml Trypsin-EDTA

für ca. 10 min bei 37°C inkubiert. Dadurch erfolgte eine Ablösung des Zellrasens. Das Trypsin, welches toxisch für Zellen ist, wurde in 7 ml Erhaltungsmedium durch das darin enthaltene FCS inaktiviert und die Zellen darin durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Anschließend wurde 1 ml Zellsuspension in eine neue Flasche mit 10 ml Medium zur Anzucht gegeben.

2.4.10.2 Zellzahlbestimmung und Aussaat der Zellen

Nach Ablösen der Zellen mit Trypsin-EDTA und Inaktivierung in Medium wurde die Zellzahl in einer Neubauer-Zellzählkammer bestimmt. Dafür wurden jeweils vier Felder ausgezählt, die Zahl durch vier geteilt und mit 10^4 multipliziert. Dies ergab die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension in Medium.

Für die Aussaat in Sechsllochplatten wurde eine Gesamtmenge von $2 \cdot 10^6$ Zellen in 12 ml Medium aufgenommen und je 2 ml pro Vertiefung ausgesät.

2.4.10.3 Lagerung der Zellen

Um Zellen längerfristig zu lagern wurden Zellstocks angefertigt. Dafür wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und ausgezählt. Es wurde eine Zellkonzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml Kryomedium angefertigt, diese in Kryotubes gegeben und für eine Nacht bei -80°C gelagert. Anschließend wurden die Zellen bei -196°C im Stickstofftank gelagert und bei Bedarf aufgetaut.

Dafür wurden die Zellen möglichst schnell bei 37°C aufgetaut, 5 min bei 4000rpm zentrifugiert und der Überstand mit dem zelltoxischen DMSO verworfen. Das Zellpellet wurde in 10 ml Erhaltungsmedium resuspendiert, in eine 25 cm² Zellkulturflasche gegeben und bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

2.4.10.4 Virusinfektion

Alle Arbeiten mit Vollvirus erfolgten in einem Labor der biologischen Sicherheitsstufe 3.

Die Virusinfektion diente dem Aufbau eines Virusassays sowie Vorarbeiten zu den nachfolgenden Zellkulturversuchen mit rekombinant hergestelltem Hämagglutinin.

Dafür wurde eine Sechsllochplatte falls nicht anders beschrieben mit 2×10^6 MDCK Zellen pro Loch ausgesät und über Nacht im CO₂ Brutschrank bei 37°C bis zu einer Konfluenz von 75-80% kultiviert.

Am Folgetag wurde eine Virusverdünnungsreihe hergestellt. Dafür wurde in das erste Loch 1 ml Vollvirusstock gegeben. In den folgenden Löchern wurden je 900 µl Medium für die

Virusinfektion vorgelegt und mit je 100 µl aus dem vorangegangenen Loch der höheren Viruskonzentration durchmischt. Als Adsorptionsphase, in welcher das Virus die Zellen penetriert, wurden zwei Stunden gewählt. Dies erfolgte bei 37°C in 5% CO₂. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgezogen, die Zellen zwei bis dreimal mit PBS gewaschen und 3 ml Erhaltungsmedium pro Loch pipettiert.

Als Probe an Tag 0 wurden je 100 µl Zellkulturüberstand in 560 µl AVL-Puffer pipettiert und anschließend eine RNA Extraktion durchgeführt. Die infizierten Zellen wurden für insgesamt drei Tage bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, pro Loch wurden 100 µl Überstand nach jeweils 24, 48 und 72 h entnommen und wie oben beschrieben behandelt. Die Auswertung erfolgte über eine Real-Time RT PCR oder Plaque-Assay.

2.4.11 RNA-Extraktion mit Diatomeenerde

Um die Viruskonzentration und den Wachstumsverlauf mittels Real-Time RT PCR zu ermitteln wurde die virale RNA aus Zellkulturüberstand extrahiert.

Dafür wurde je 100 µl Zellkulturüberstand in 560 µl AVL-Lysis-Puffer (Qiagen) bei Raumtemperatur inkubiert und damit die Virus-RNA inaktiviert. In einem neuen Reaktionsgefäß wurde eine kleine Spatelspitze Diatomeenerde sowie 560 µl Ethanol abgegeben und der lysierte Zellkulturüberstand dazu pipettiert. Nach kräftigem vortexen wurde das Diatomeenerde-Zellkulturgemisch bei 25°C für 30 min schüttelnd inkubiert, um eine Sedimentation der Diatomeenerde zu verhindern. Es folgte eine Zentrifugation für 3 min bei 13000 rpm und Raumtemperatur, der Überstand wurde abgegossen. Die an die Diatomeenerde gebundene virale RNA verblieb als Pellet am Boden. Anschließend wurde jeweils mit 500 µl des Puffers AW1 sowie 500 µl des Puffers AW2 Puffer (Qiagen) gewaschen. Dafür wurde der Puffer AW1 zum Pellet pipettiert, ca. 30 sec gevortext und anschließend für 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand wiederum abgegossen und der zweite Waschschrift mit dem Puffer AW2 ebenso durchgeführt. Nach dekantieren des Überstandes wurden 400 µl Aceton auf das Pellet gegeben, wieder gevortext und zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Das Pellet wurde für 20 min bei 56°C getrocknet und anschließend mit 100 µl a.d eluiert. Nach mischen und erneuter Zentrifugation konnte die in a.d. gelöste RNA in ein neues Reaktionsgefäß aufgenommen werden. Diese wurde entweder bei -20°C eingefroren oder sofort in der Real-Time RT PCR weiterverwendet.

2.4.12 Quantitative Real-Time RT PCR

Die Real-Time RT PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren bei der gleichzeitig eine quantitative Aussage über die eingesetzte Menge an Nukleinsäure möglich ist.

Dafür werden einerseits die zur Amplifikation benötigten PCR-Primer eingesetzt. Zur Quantifizierung werden spezielle fluoreszenzmarkierte Sonden (bsw. TaqMan- oder LightCycler-Sonden) eingesetzt und Änderungen der Fluoreszenzintensität detektiert. Der Grad der Fluoreszenz wird in Relation zur Amplifikation gesetzt, anhand dessen eine Aussage über die Menge der Nukleinsäure in der Probe gegeben werden kann.

Eingesetzt wurde eine Matrix Influenza A PCR, bei der die eingesetzten Primer auf einen konservierten Bereich des Influenza A Virus Genoms konzipiert waren. Durch den Einsatz einer fluoreszenzmarkierten Sonde kann im Vergleich mit einem Standard die Virusmenge quantifiziert werden. Dieser wurde durch Dr. Panning in unserem Labor etabliert.

Bei den eingesetzten Virusproben wurde vorab die RNA mittels Diatomeenerde oder mit dem QIAamp Viral RNA Mini Kit extrahiert und bei -70°C bis zum Ansetzen der PCR aufbewahrt.

Eingesetzt wurde die *Superscript TM One Step RT-PCR with Platinum Taq* Polymerase. Diese hat den Vorteil, dass die Reverse Transkriptase (RT) Herstellung von cDNA aus dem viralen Genom und gleichzeitig die Amplifikation durch PCR in einem Reaktionsgefäß durchgeführt werden kann. Dabei sind in dem RT/Platinum Taq Mix die Enzyme *SuperScript II Reverse Transcriptase* und *Platinum Taq DNA Polymerase* enthalten. SPL enthält eine Mischung aus Puffer und Nukleotiden.

Für die Amplifikation wurde folgender Mastermix mit einem Volumen von 20 µl pro Reaktion hergestellt:

Reagens	Volumen	Konzentration
SPL	12,5 µl	1x
Mg 50	1,5 µl	0,4 mM
BSA	1,0 µl	0,6 µM
Fwd Primer	1,5 µl	0,6 µM
Rev Primer	1,5 µl	0,2 µM
LC Sonde	0,5 µl	0,04 µM
RT/ Platinum Taq Mix	1,0 µl	-
a.d.	0,5 µl	-

Dazu wurden vorsichtig 5 µl Template zugemischt und diese in Light Cycler Kapillaren pipettiert und die Real-Time RT PCR nach folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

	Temperatur in °C	Zeit	Zyklenzahl
Reverse Transkription	45	30 min	1
Strangtrennung	95	3 min	1
Amplifikation	95	15 sec	45
Detektion	60	25 sec	45

2.4.13 Plaque Assay und Virusquantifizierung

Das Plaque Assay ist eine Methode zur Quantifizierung von virushaltigen Lösungen, sowie zur Virusisolation und Aufreinigung von Virusstocks.

Grundlage dafür ist die Bildung von Plaques oder Löchern in einem einschichtigem Zellrasen, die durch die Infektion einer einzelnen Zelle von einem Viruspartikel entstehen. Der Zellrasen ist mit einem Methylzellulosegemisch überschichtet, so dass eine Infektion nur von einer Zelle auf die benachbarten Zellen direkt übergehen kann. Die infizierten Zellen sterben durch Virusreplikation ab und bilden somit „Löcher“ im Zellrasen.

Dafür wurden $1,5 \times 10^6$ MDCK Zellen auf einer Sechsllochplatte ausgesät, bei 80%iger Konfluenz der Zellen eine Virusverdünnungsreihe hergestellt und das Virus für 2 h auf den Zellen absorbiert. Danach wurde der Virusüberstand abgenommen und die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig mit je 3 ml Kleistermedium überschichtet. Dieses bestand aus einem Teil 3%iger Methylcellulose gemischt mit zwei Teilen DMEM. Die überschichteten Zellen wurden für 3 Tage im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Methylzellulosegemisch vorsichtig abgenommen und die Zellen für 30 min in 4%igem Formalin fixiert und inaktiviert. Nach Abwaschen des Formalins mit PBS wurden die Zellen für 20 min mit Kristallviolett-Lösung gefärbt, diese darauffolgend mit H₂O abgewaschen und die entstandenen Plaques ausgezählt. Jeder Plaque ist damit auf ein infektiöses Partikel zurückzuführen und wird als „Plaque forming unit“ (PFU) bezeichnet. [68, 69] Anhand dieser lässt sich der eingesetzte Virustiter nach folgender Formel berechnen:

$$\text{Virustiter (PFU/ml)} = \text{Plaqueanzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10$$

Bezieht man die PFU auf die Anzahl der ausgesäten Zellen lässt sich das Maß für die Infektiosität die MOI (multiplicity of infection) errechnen.

$$\text{PFU / Zahl der ausgesäten Zellen} = \text{MOI}$$

3 Ergebnisse

3.1 Auswahl und Analyse der rezeptorbindenden Domäne von H5

Hämagglutinin stellt die rezeptorbindende Domäne des Influenzavirus dar, und ist gleichzeitig die hauptantigene Struktur. Das Hämagglutinin besteht aus drei Untereinheiten und bildet in seiner Quartärproteinstruktur ein Trimer aus.

Die Analyse dieser Domäne des Hämagglutinin 5 des H5N1 Influenza A Virus wurde mit dem Programm *ExPASy Proteomics* (Swiss Institute of Bioinformatics SIB) und *Cn3D 4.1* (NCBI) Software durchgeführt.

Der Wirtstropismus von Influenza-A Viren wird die Rezeptorbindungsstelle (RBS) wesentlich bestimmt. Diese befindet sich am Ende der globulären Domäne des HA1. Über diese findet eine Bindung an Zuckerreste der Neuraminsäure statt. Aviäre Influenzaviren binden an 2,3-N-Neuraminsäure, während humanpathogene Influenzaviren sich an 2,6-N-Neuraminsäure anlagern. Durch Mutation im Aminosäuremotiv dieser Region kann es zu einer Veränderung der Bindungsfähigkeit und damit zu einer speziesübergreifenden Infektion kommen.

Als Erstes wurde dafür ein Abgleich mit der vorhandenen Aminosäuresequenz des verwendeten Virusstammes mit der Sequenzdatenbank der National Center for Biotechnology Information (NCBI) durchgeführt. Dies wurde über ein sogenannte BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) Suche abgeglichen.

Die dabei gefundene Sequenz wies eine hohe Übereinstimmung mit der verwendeten Sequenz auf und wurde für den folgenden theoretischen Teil weiterverwendet.

Über die Auswahl des Hämagglutinins ließ sich die 3 D Struktur weiterverwenden.

Dabei konnten beliebige Punkte in der 3D-Rekonstruktion des Proteins markiert werden, die markierte Stelle wurde dann in dem dazugehörigen Proteinkode angezeigt. Somit ließ sich eine Auswahl über den zu exprimierenden Bereich treffen und die Primer entsprechend konstruiert werden.

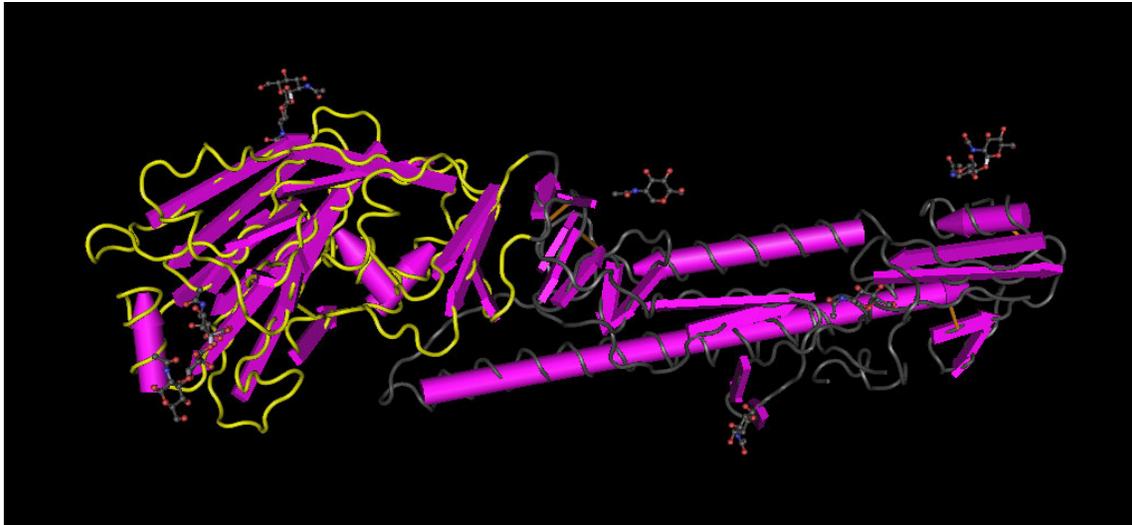


Abbildung 7: 3 D Rekonstruktion eines Hämagglutininmonomer von H5. Die Sekundärstruktur ist in lila dargestellt. Der gelbe Bereich stellt den ausgewählten Bereich für das rekombinante Protein dar. Die Seitenketten wurden aufgrund der Übersichtlichkeit in der Darstellung nicht berücksichtigt.

In Abbildung 7 stellt der gelb markierte Bereich den später zu exprimierenden Proteinanteil dar. Es wurde beschlossen nahezu den gesamten Bereich der globulären Domäne des HA1 zu wählen. Diese besteht aus einem großen Anteil an β -Faltblattstrukturen. Bei einer Expression eines kleineren Anteils der globulären Domäne wären diese Sekundärstrukturen aufgrund fehlender Bindungen nicht zustande gekommen. Dies hätte wahrscheinlich einen Funktionsverlust zur Folge gehabt. Da für die Rezeptorbindung diese Tertiärstruktur allerdings elementar ist und die Domäne hinsichtlich einer kompetitiven Hemmung in der Viruszellkultur verwendet werden sollte, wurde sich für die oben gezeigte Auswahl entschieden. Des Weiteren sind im Bereich des oberen Teils der globulären Domäne zwei Zuckerreste (Ringstrukturen, Bindungen grau dargestellt) vorhanden. Bei Verwendung von prokaryoten Expressionssystemen werden diese nicht ausgebildet, da eine posttranslationale Glykosylierung in diesen fehlt.

3.2 Molekularbiologischer Teil

3.2.1 Auswahl des Vektors und der PCR-Strategie

Als Expressionssystem diente das *Champion pET Directional TOPO Expression Kit* von Invitrogen, ein T7-Promoter gesteuertes *E.coli* System. Dieses war im Labor für die Arbeit mit viralen Proteinen etabliert.

Als Expressionsvektor wurde der pET 102/D-TOPO verwendet. Durch die Verwendung dieses Vektors sollte eine bessere Ausbeute an rekombinantem Hämagglutinin erzielt werden, da er ein Thioredoxin enthielt. Durch dieses kann sich die Löslichkeit und Translationseffizienz exprimierter Proteine steigern lassen, wenn es in *E.coli* überexprimiert wird.[70] Ein zusätzlicher Vorsteil des Vektors bestand in dem Vorhandensein des sogenannten His-Patch Thioredoxin. Dieses ist zusätzlich zu den in allen pET Vektoren enthaltenen sechs Histidinresten vorhanden und erlaubt eine bessere Aufreinigung über metallische Chelatbildner. Nachteil des bakteriellen Vektors ist das Fehlen von posttranslationaler Modifizierung wie die Glykosylierung von Seitenketten. Nach Analyse der rezeptorbindenden Domäne schienen die beiden Zuckerketten jedoch nicht direkt an der Bindung mit dem Rezeptor beteiligt zu sein. Daher wurde dieser Punkt vernachlässigt. Nach vorangegangener Analyse der rezeptorbindenden Domäne von Hämagglutinin 5 wie in 3.1 beschrieben, wurden Primer mit Hilfe des Programms *BioEdit* konstruiert. Der Vorwärtsprimer erhielt dabei wie in 2.4.3.2 beschrieben die Modifikation CACC. Diese bildete am gewünschten Genabschnitt einen Basenüberhang, welcher zur Vektorsequenz GTGG komplementär ist und den Einbau in korrekter Orientierung im Vektor ermöglicht.

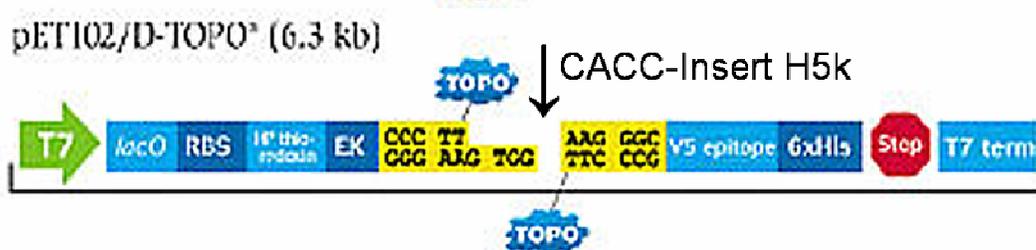


Abbildung 8: Ausschnitt aus dem Vektor pET 102/D-TOPO. Darauf ist das HP-Thioredoxin zu sehen (dritter Balken von links), sowie in gelb markiert, die Stelle an der das Insert H5k in den Vektor kloniert wurde.

Es wurde die *Phusion DNA-Polymerase* verwendet, da diese Polymerase PCR Produkte ohne A-Überhänge generiert, wie dies für die Klonierungsstrategie erforderlich war. Das daraus entstandene, 678 bp lange Fragment wurde als H5k bezeichnet.

3.2.2 Klonierung von H5k in pET 102 D/TOPO und Klonanalyse

Das blunt end PCR Produkt wurde mit den vorab konstruierten Primern H5 fwd und H5 rev, wie in 2.4.3.4 beschrieben, hergestellt und mittels Gelelektrophorese auf Qualität und Menge des amplifizierten Genabschnittes überprüft. Das Template für das Insert wurde von dem

Plasmid *pRT 611 Vietnam* entnommen. Auf diesem Plasmid befand sich die gesamte H5-Gensequenz. Für das herzustellende Protein wurde allerdings nur der in 3.1 ausgewählte Hämagglutininanteil benötigt und die Primer dementsprechend konstruiert. Das erwartete PCR Produkt hatte eine Größe von 678 Basenpaaren. In Abbildung 9 ist diese Bande mit 1 markiert. Diese lag zwischen 600-700bp und entsprach somit der errechneten Größe des PCR-Produktes.

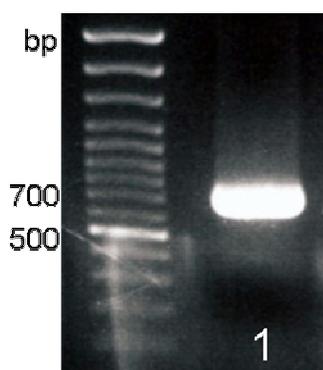


Abbildung 9: Gelelektrophorese zur Detektion des blunt-end PCR Produktes. Es wurden 20 µl PCR Produkt aufgetragen und anschließend aus dem Gel extrahiert. Die Bande hat die richtige Größe von 678 bp. (1) Marker: GeneRuler 100bp DNA Ladder, Fermentas

Anschließend wurde die Bande aus dem Gel ausgeschnitten und wie in 2.4.2 beschrieben, aufgereinigt. Die nachfolgende Ligation in den pET 102 Vektor erfolgte in einem Verhältnis von 1:4. Durch den Überschuss an Insert sollte die Klonierungseffizienz gesteigert werden. Anschließend wurde die Transformation des Ligationsansatzes in Bakterienzellen durchgeführt. Dafür wurden TOP 10 chemisch kompetente *E.coli* verwendet, nach Transformation diese auf Carbenicillinplatten ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Durch Verwendung von antibiotikahaltigen Agarplatten erfolgte eine Selektion auf Bakterien mit dem transformierten Plasmid.

Fünf Einzelklone wurden willkürlich ausgewählt und nach Isolation der Plasmid DNA wie in 2.4.4.1 eine erste Überprüfung über einen Restriktionsverdau durchgeführt. Dafür wurde mit Hilfe des Programms *Mapdraw* eine Plasmidkarte von Insert und Vektor erstellt und ein Restriktionsenzym ausgewählt, welches einmal im Insert, nicht aber im Vektoranteil schneidet. Mit *EcoRI* wurden diese Voraussetzungen erfüllt und die isolierte Plasmid-DNA testweise verdaut. Linearisierte Plasmide und damit positive Klone konnten anhand ihres Migrationsverhaltens im Agarosegel identifiziert werden. Dadurch wurde eine Vorabselektion der anschließend zu sequenzierenden Klone ermöglicht.

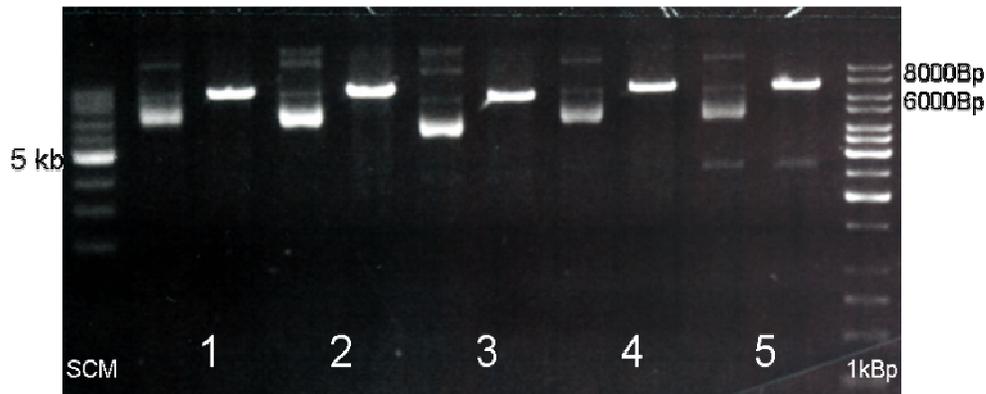


Abbildung 10: Restriktionsverdau von fünf verschiedenen H5 Klonen. Vergleich zwischen der unverdauten Plasmidform und der mit *EcoRI* verdauten Form. Dabei wurden die Klone von 1 bis 5 durchnummeriert. Dabei stellt die erste Spur die Plasmidform und die zweite die mit *EcoRI* linearisierte DNA des Klons Nummer 1 dar. Dementsprechend sind auch die Klone 2 – 5 aufgetragen. Marker: links Supercoiled DNA Ladder, NEB. Rechts GeneRuler 1kbp DNA Ladder, Fermentas.

Wie in Abbildung 10 gezeigt wird, konnten alle getesteten Klone linearisiert werden und haben somit das Insert aufgenommen. Zur genaueren Analyse wurde eine Sequenzierung der Einzelklone angeschlossen.

Um ein besseres Ergebnis bei der Sequenzierreaktion zu erreichen, wurde eine PCR auf den gewünschten Abschnitt der Plasmid DNA durchgeführt. Als Primer wurden die kommerziell erhältlichen Primer T7 fwd prom und T7 rev eingesetzt. Beide setzten im Vektorteil an, so dass das Insert und auch die Bindungsstellen im Vektor komplett erfasst wurden. Die Qualität des PCR-Produktes wurde mittels Agarosegel überprüft.

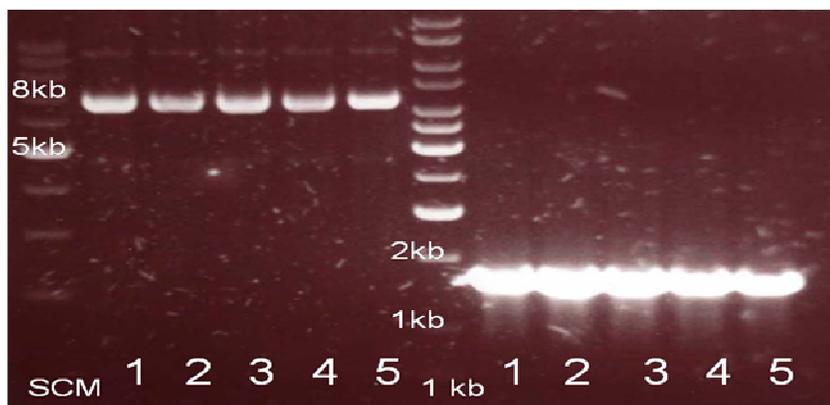


Abbildung 11: Gelelektrophorese der Plasmid-PCR. Auf den linken Gelspuren wurden je 5 µl der Plasmide der fünf Einzelklone (1 – 5) aufgetragen. Die rechten fünf Gelspuren sind mit je 5 µl PCR Produkten der jeweiligen Klone beladen. Die errechnete Größe ist für das Plasmid ~7000bp und für das PCR Produkt ~1500bp. Marker: Supercoiled DNA Ladder, NEB und GeneRuler 1kbp DNA Ladder, Fermentas.

Die Plasmidgröße errechnete sich aus dem Vektor pET 102/TOPO und dem Insert und hatte eine Größe von 6993 Basenpaaren.

Das PCR Produkt wurde gebildet aus dem Vektoranteil von T7prom bis T7rev und dem Insert und hatte eine Größe von 1438bp. Die Banden in der Gelelektrophorese lagen alle in dem vorab errechneten Größenbereich. Da alle außerdem eine ähnliche Qualität im Agarosegel aufwiesen wurde eine Sequenzierung aller fünf Klone wie in 2.4.4.3 beschrieben, durchgeführt.

Die Auswertung der Einzelsequenzen erfolgte mit dem Programm *SeqMan*. Durch die Sequenzanalyse wurde die genaue Basenabfolge des zu translatierenden Genabschnittes überprüft und ein Verschieben des Leserahmens (*Frameshift*) ausgeschlossen. Des Weiteren wurde die richtige Orientierung des eingefügten Inserts im Vektor überprüft. In den Klonen Nummer eins, vier und fünf fanden sich ein korrekte Basenpaarabfolge und die richtige Orientierung des Inserts im Vektor. In den Klonen zwei und drei zeigten sich Punktmutationen im Bereich des Inserts.

Deswegen wurden die Plasmide Nummer eins, vier und fünf für die Expression und Proteinarbeit weiterverwendet.

3.2.3 Testexpression H5k in pET102

Da es Variationen im Expressionsverhalten verschiedener Proteine gibt, wurde als erstes eine Testexpression durchgeführt. Dabei sollten die optimalen Reaktionsbedingungen für die Expression bestimmt werden. Dafür wurden die Plasmide eins, vier und fünf in BL 21 * *E.coli* Zellen transformiert und diese über Nacht inkubiert. BL 21* Zellen sind speziell konstruierte *E.coli* Zellen für die Expression von T7 Promotor gesteuerten Genen. Als Selektivantibiotikum wurde Carbenicillin gewählt, da dies stabiler als Ampicillin ist und dadurch den Expressionslevel günstig beeinflussen soll.

Am Folgetag wurden die drei Kulturen jeweils halbiert, eine Hälfte mit IPTG (-/+) induziert und die andere uninduziert mit weitergeführt. Zu zwei verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben zur Untersuchung des Expressionsniveaus gesammelt, zentrifugiert und mittels Gelelektrophorese analysiert. Die Proteingröße wurde vorab mit dem Programm *Protean* auf 42,7 kDa berechnet.

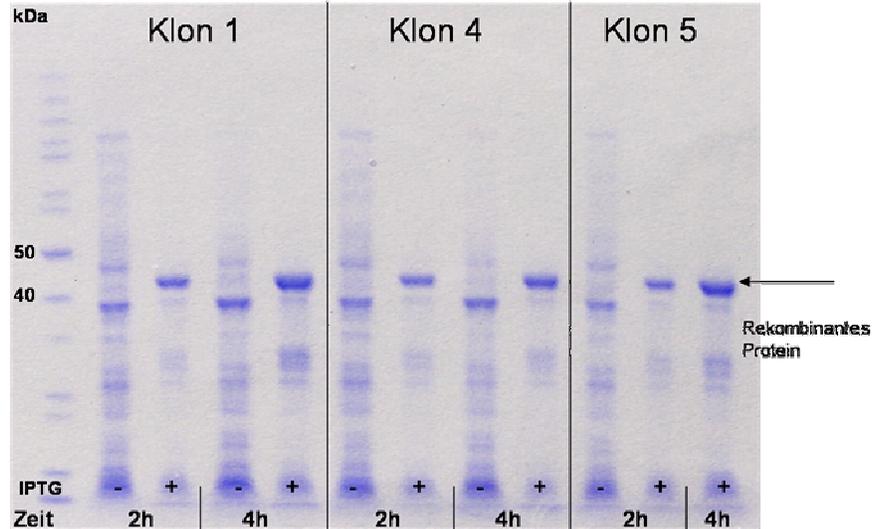


Abbildung 12: Testexpression der drei Klone hinsichtlich ihres Expressionsverhalten des rekombinanten Proteins. Dargestellt sind jeweils vier (Klon 1 und 4) bzw. drei (Klon 5) Proben pro Klon. Entnahmezeit war nach zwei und vier Stunden, sowie mit (+) und ohne (-) IPTG Induktion. Die errechnete Größe des rekombinanten Proteins war 42,7 kDa.

Marker: PageRuler Protein Ladder, Fermentas.

Wie in Abbildung 12 gezeigt, exprimierten alle Klone, die mit IPTG induziert wurden, ein Protein der gewünschten Größe. Zusätzlich ließ sich eine quantitative Steigerung nach vier Stunden Induktionszeit bei allen Klonen beobachten. Dabei wies Klon 1 den höchsten Expressionslevel nach 4 h auf (Dicke der Bande) und wurde deshalb für Folgearbeiten ausgewählt. Eine exakte Quantifizierung der Proteinmenge wurde mittels Bradford Assay angeschlossen. Zur genaueren Untersuchung des exprimierten Proteins wurde eine größere Kultur hergestellt und anschließend aufgereinigt. Um nachzuweisen, dass es sich bei diesem Protein um die Hämagglutinin-domäne von H5 handelt wurde ein Western Blot angeschlossen.

3.3 Proteinbiochemischer Teil: Aufreinigung des rekombinanten Proteins H5k in pET 102

3.3.1 Native Proteinaufreinigung

Da als Vektor das pET TOPO System gewählt wurde, konnte die Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose erfolgen. Im exprimierten Vektorteil war C-terminal ein Polyhistidinrest und

über den pET 102 Vektor zusätzlich das sogenannte HP-Thioredoxinprotein eingefügt, welches das Nickel der Agarose als Chelatbildner nutzte. Darüber konnte das Protein über eine Säule isoliert und aufgereinigt werden. Mit Imidazol oder einem pH-Gradienten wurde das Protein wieder von der Säule abgelöst.

Der ausgewählte Klon 1 wurde erneut in BL 21* Zellen transformiert und in 500 ml mit Carbenicillin versetztem LB Flüssigmedium kultiviert. Am Folgetag wurde IPTG zur Induktion der Proteinexpression zugesetzt. Wie in der Testexpression ermittelt, lag das größte Expressionsniveau bei 4h nach Induktion. Nach dieser Zeit wurden die Bakterienzellen abzentrifugiert und eine Zellyse mittels Ultraschall wie in 2.4.6.1 beschrieben, durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgte nach Zusatz von Ni-NTA Agarose mittels Imidazolhaltigem Elutionspuffer in sechs Fraktionen.

Bei dem Gellauf, auf welchen Durchfluss, Wasch- und Elutionsfraktionen aufgetragen wurden, ließen sich keine deutlichen Banden im errechneten Größenbereich von 42 kDa nachweisen.

Da allerdings im Testlauf Protein exprimiert wurde, konnte sich dieses nur in einem der Zwischenprodukte befinden. Auf ein weiteres Gel wurden deshalb das Bakterienpellet (P-) vor Lyse und eine Zellrestprobe nach Ultraschall (P+) mit auf das Gel aufgetragen. Dies ist in Abbildung 13 dargestellt.

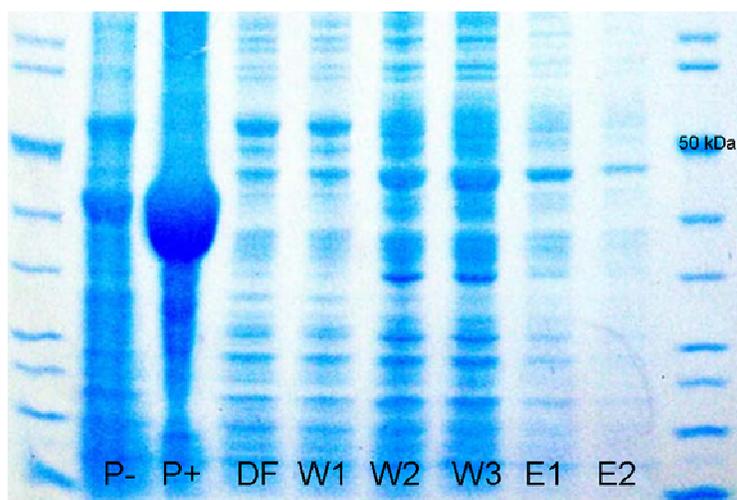


Abbildung 13: SDS-PAGE der nativen Proteinaufreinigung des rekombinanten H5 in pET 102 Vektor. Aufgetragen sind das Nativpellet vor Zellyse mit Ultraschall (P-), das Zellpellet nach Lyse (P+), der Durchfluss (DF), Wasch-(W1-W3) und Elutionsfraktionen (E1/E2). Marker PageRuler Protein Ladder, Fermentas.

Die als P+ dargestellte Zellrestprobe nach Lyse durch Ultraschall beinhaltete eine sehr starke Bande im Größenbereich des exprimierten Proteins von 42.8 kDa. In den sich anschließenden Wasch- und Elutionsfraktionen fanden sich in diesem Bereich keine Banden. Das Protein lies sich somit auf nativem Wege nicht aus den Bakterienzellen aufreinigen. Ursächlich dafür wurde eine Zusammenlagerung des Proteins in intrazellulären Einschlußkörperchen (*Inclusion bodies*) und damit die Bildung unlösliche Proteinaggregate angenommen. Dieses Problem ist bei Expression von Proteinen in E.coli bekannt[71] und wurde auch in unserer Arbeitsgruppe bei anderen, rekombinant hergestellten viralen Proteinen beobachtet. Da eine native Aufreinigung nicht möglich war, wurde eine denaturierende Proteinaufreinigung angeschlossen.

3.3.2 Denaturierende Aufreinigung

Durch die denaturierende Aufreinigung wurde eine bessere Löslichkeit des Proteins und somit eine Ausbeute an Protein angestrebt.

Dafür wurden wieder BL 21* Zellen mit Plasmid, bestehend aus H5k im pET 102 Vektor, transformiert. Diese wurden kultiviert und zur Proteinexpression mit IPTG induziert.

Im Unterschied zur nativen Proteinaufreinigung wurden nun die Bakterienzellen mit 8 M Harnstoff lysiert und über eine Ni²⁺ NTA Agarose-Säule denaturierend aufgereinigt. Dafür wurden verschiedene Elutionspuffer mit absteigendem pH Gradienten wie in 2.4.6.2 verwendet. Dadurch wurde die Tertiärstruktur, und zum Teil auch die Sekundärstruktur, des Proteins durch den fallenden pH-Wert des Harnstoffpuffers aufgehoben.

Die Überprüfung der verschiedenen Elutionsfraktionen auf Vorhandensein des rekombinanten H5 Proteins erfolgte wieder mittels SDS-PAGE. Dies ist in **Abbildung 14** dargestellt.

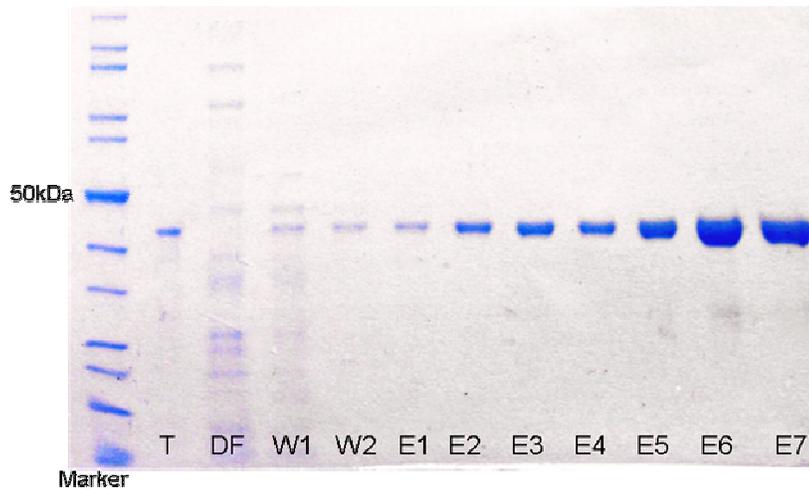


Abbildung 14: Denaturierende Proteinaufreinigung von H5k in pET102. Aufgetragen wurden das Nativpellet vor Lyse (T), der Durchfluss (DF), sowie zwei Wasch- (W1/W2) und sieben Elutionsfraktionen (E1 bis E7). Die errechnete Proteingröße betrug 42,7 kDa. Deutlich sichtbare reine Banden, ab E2 auch quantitative Zunahme des Proteins.

In allen aufgetragenen Gelspuren (Ausnahme DF) fand sich eine Bande im errechneten Größenbereich des Proteins H5k. Das Protein ließ sich sehr sauber und quasi ohne störende Nebenprodukte denaturierend aufreinigen. Vor allem im niedrigen pH Bereich in den Fraktionen E3 bis E7 ließ sich es mit einer guten Ausbeute eluieren.

3.3.3 Western Blot zum Nachweis des exprimierten Proteins

Wie vorab gezeigt, besaß das exprimierte Protein H5k die errechnete Größe von 42,7 kDa und der Vektoranteil mit Insert konnte vollständig sequenziert werden.

Der Nachweis, dass das exprimierte Protein der antigenen Domäne von H5 des aviären Influenzavirus A entspricht, wurde mittels Western Blot geführt. Dafür wurde ein kommerziell erworbener, polyklonaler Antikörper gegen das Hämagglutinin H5 verwendet.

Der Western Blot wurde auf eine wie in 3.3.2 denaturierend aufgereinigte Probe durchgeführt und ist in Abbildung 15 dargestellt.

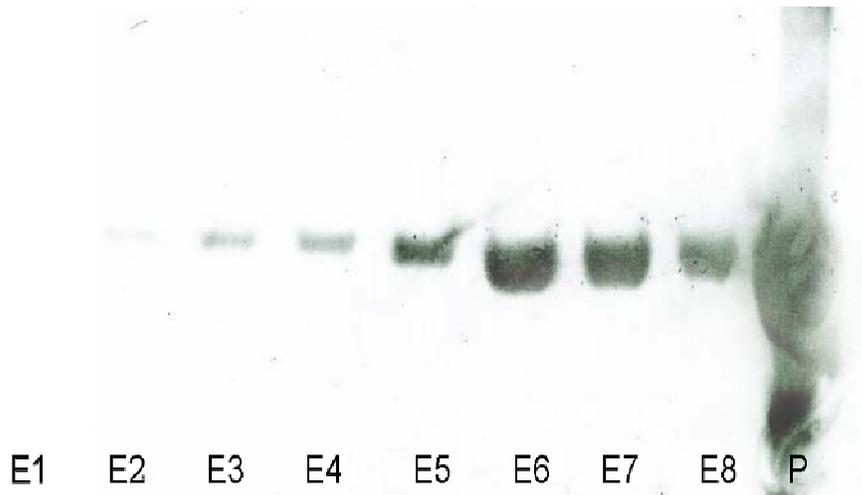


Abbildung 15: Western Blot auf denaturierend aufgereinigtes H5k-Protein in pET 102 mit einem Antikörper gegen H5 des Influenza A Virus. E1 bis E8 sind die verschiedenen Elutionsfraktionen, P das Pellet nach Lyse mit Harnstoff. Nachweis von H5 durch deutliche Banden in den Elutionsfraktionen E3 bis E8, sowie in dem Pellet nach Lyse (P).

In den Elutionsfraktionen E3 bis E8 sind saubere Banden nachweisbar. Die quantitativ größte Bande befand sich in der sechsten Elutionsfraktion. Zusätzlich wurde ein Zellpellet nach Lyse mit Harnstoff aufgetragen, dort fand eine sehr ausgeprägte Reaktion zwischen Protein und Antikörper statt. Dies bestätigte die Vermutung, dass sich ein Großteil des Proteins weiterhin nicht aufreinigen ließ.

Über den dargestellten Western Blot ließ sich nachweisen, dass das exprimierte Protein der reaktiven Domäne des Hämagglutinins 5 entsprach.

Darüber konnte gezeigt werden, dass das hergestellte Protein ein sehr gutes Expressionsniveau besaß. Allerdings erbrachte der Thioredoxinanhang des pET 102 Vektors keinen Vorteil hinsichtlich einer besserer Löslichkeit oder einer Verringerung der Proteinaggregatbildung in *E.coli*. Dieser Anhang stellte stattdessen eine zusätzliche Fremdstruktur dar, die für anschließende Zellkulturarbeiten unerwünscht war, da mit einem möglichst reinen Protein gearbeitet werden sollte. Um demzufolge den exprimierten Vektoranteil zu verkleinern und dadurch die Expression eines möglichst naturgetreuen Proteins zu erreichen, wurde eine Umklonierung in den Vektor pET 151 vorgenommen.

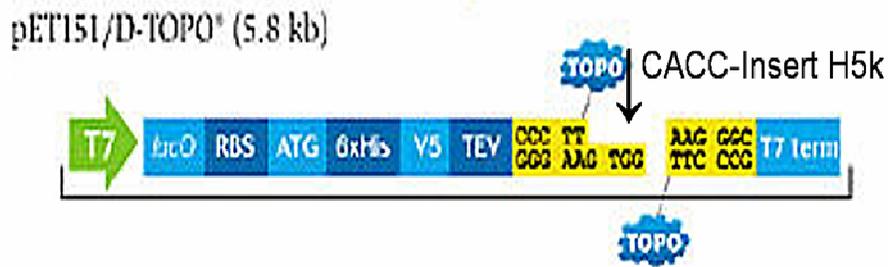


Abbildung 16: Vektorausschnitt von pET 151/D-TOPO mit der Klonierungsstelle für H5k

3.3.4 Optimierung durch Umklonierung von H5 in pET 151 D-TOPO

Der Versuchsablauf entsprach im Wesentlichen der Klonierungsreaktion von H5k in den pET 102 Vektor wie in 3.2.2. Als Template für das Insert wurde wieder das Plasmid *pRT 611 Vietnam* verwendet, als Primer wurden die vorab konstruierten Primer H5 fwd und H5 rev eingesetzt.

Der erste Schritt bestand aus der Herstellung von blunt end PCR Produkten, welche in Abbildung 17 dargestellt sind. Die Bande war sauber, die PCR hatte eine gute Ausbeute und das PCR Produkt die richtige Größe von 678 bp.

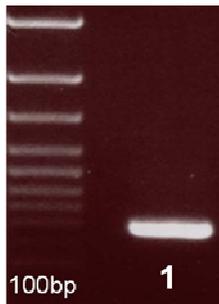


Abbildung 17: Amplifikation von H5k (1) zur Klonierung in Vektor pET 151 mit der errechneten Größe von 678 bp, Marker: GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Fermentas

Das Fragment wurde nach Aufreinigung wie 2.4.2 beschrieben in den Vektor pET 151 ligiert und in TOP 10 Zellen kloniert. Bei der Analyse der Transformanten wurde diesmal auf einen Restriktionsverdau verzichtet und stattdessen zur genauen Analyse gleich eine Sequenzreaktion durchgeführt.

Dafür wurde zunächst eine Amplifikation des Plasmidabschnittes, in dem sich das Insert befand, durchgeführt. Als Primer wurden erneut die kommerziell erworbenen T7 fwd prom und T7 rev eingesetzt. Das Ergebnis ist in Abbildung 18 dargestellt.

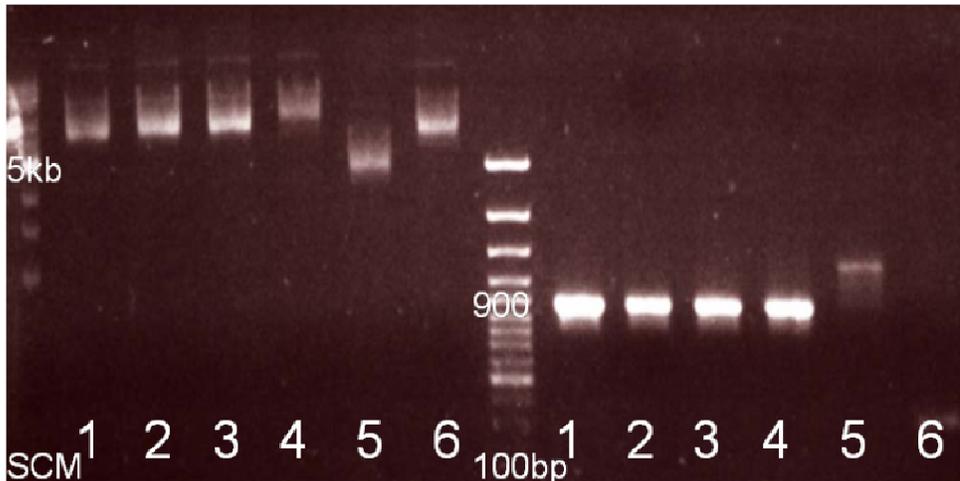


Abbildung 18: Klonscreening H5 in pET 151. Auf den linken Gelspuren sind die Plasmide sechs verschiedener Klone (1-6) aufgetragen. Auf der rechten Seite die dazugehörigen PCR-Produkte der jeweiligen Klone (1-6). Marker links Supercoiled DNA Ladder, NEB. Marker Mitte GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Fermentas. Die errechnete Größe betrug für das Plasmid 6438 bp und für das PCR-Produkt 944 bp. Die Klone 1 bis 3 wurden für die Sequenzierung ausgewählt.

Dabei ist zu erkennen, dass das PCR Produkt (auf dem rechten Gelbild dargestellt) lediglich bei den ersten vier Klonen die richtige Größe von 944 bp aufweist. Diese errechnete sich aus dem Vektoranteil zwischen den Primern T7 fwd prom und T7 rev sowie dem Insert. Vergleicht man die PCR-Produkte mit den dazugehörigen Plasmiden, welche in den ersten Gelspuren aufgetragen wurden, weisen dort die Klone eins bis drei die richtige Größe von 6438 bp auf.

Die Klone eins bis drei wurden deshalb für die Sequenzreaktion ausgewählt. In Abbildung 19 ist ein Ausschnitt der anschließenden Auswertung der Einzelsequenzen zu sehen. Dargestellt ist der Bereich der Klonierungsstelle mit Beginn des Inserts. Es fand sich eine korrekte Basenpaarabfolge zur Originalsequenz, die in der obersten Reihe dargestellt war.

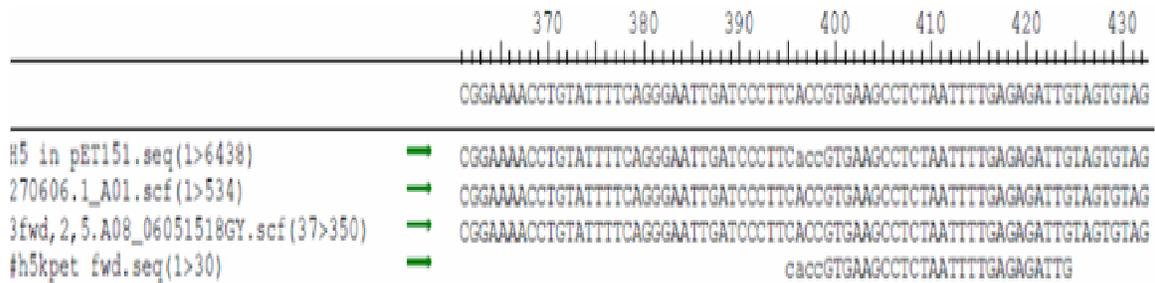


Abbildung 19: Ausschnitt aus der Sequenzanalyse des Klon Nr. 3 von H5 in pET 151, welche mit dem Programm SeqMan von Lasergene durchgeführt wurde. Dabei sind die mittleren beiden Spuren die Sequenzierung, die erste Zeile ist die erwartete Sequenz, in der unteren Zeile ist der Primer H5 fwd markiert. Dort befindet sich auch die Klonierungsstelle von dem Insert in den Vektor.

Bei der Sequenzreaktion wiesen alle drei Klone die korrekte Basenpaarabfolge und richtige Orientierung des Inserts H5 im Vektor pET 151 auf.

Als nächster Schritt folgte die Pilotexpression der drei Klone. Dabei wurde wiederum das Expressionsverhalten der drei sequenzierten Klone unter IPTG untersucht. Mittels *Protean* wurde ein Proteingewicht von 29 kDa ermittelt.

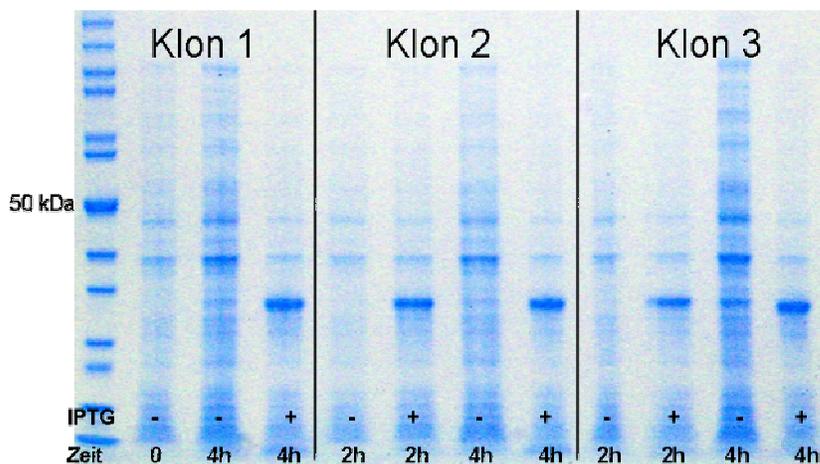


Abbildung 20: Testexpression von 3 verschiedenen Klonen (1-3) H5k in pET 151. Aufgetragen sind für Klon 1 Probe zum Zeitpunkt der Induktion (0), sowie 4h (4h) nach Induktion mit IPTG (+) und ohne Induktion (-). Für die Klone 2 und 3 wurde jeweils nach 2h und nach 4h das Expressionsniveau untersucht. Dabei wurde jeweils eine Probe ohne (-) und mit IPTG-Induktion (+) aufgetragen. Das errechnete Proteingewicht betrug 29 kDa.

Wie in Abbildung 20 dargestellt, waren alle drei Klone mit IPTG induzierbar und exprimierten ein Protein der errechneten Größe. Dies war als Bande bei den mit IPTG +

Proben zu sehen. Auch in den pET 151 Klonen stieg das Expressionsniveau nach 4h, welches durch eine stärkere Bande im Vergleich zu den 2h Werten sichtbar wurde. Besonders deutlich war dies bei Klon 3 zu sehen. Eine genaue Proteinquantifizierung wurde mittels Bradford Assay angeschlossen.

Da die drei Testklone untereinander alle ein ähnliches Expressionsniveau aufwiesen wurde willkürlich der Klon Nr. 3 für Folgearbeiten gewählt.

3.3.5 Aufreinigung des Proteins H5 in pET 151

Um eine optimale Ausbeute an gereinigtem Protein zu erzielen, wurden zunächst verschiedene Proteinaufreinigungsverfahren miteinander verglichen.

Dabei wurde die Expression eines Reaktionsansatzes in je 500 ml Flüssigkultur durchgeführt. Wie bereits bei der Aufreinigung von rekombinanten H5 in pET 102 in 3.3 beschrieben, wurde mit einer nativen Aufreinigung begonnen. Das Bakterienpellet wurde mit Ultraschall behandelt, um die Zellen zu lysieren und das Protein aus diesen frei zu setzen. Die Elution erfolgte mit 250 mM Imidazol Elutionspuffer. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE: Da sich in der vorangegangenen Expression mit pET 102 Schwierigkeiten hinsichtlich der Löslichkeit des Proteins ergaben, wurde hier initial das Bakterienpellet nach Lyse mit auf das Gel aufgetragen.

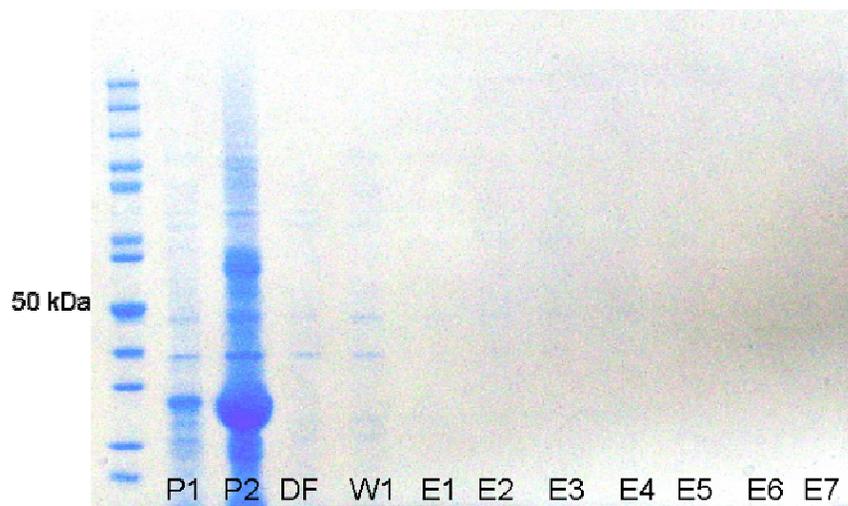


Abbildung 21: SDS-Page der nativen Proteinaufreinigung von H5 in pET 151. Aufgetragen wurde das Bakterienpellet vor Zellyse (P1), das Pellet nach Ultraschallbehandlung (P2), der Durchfluss (DF), eine Wasch- (W1) und sieben Elutionsfraktionen (E1 bis E7). Die errechnete Proteingröße betrug 29 kDa.

In Abbildung 21 ist zu erkennen, dass ein Protein der errechneten Größe von 29 kDa erprimiert wird. Dieses ließ sich allerdings ausschließlich in den Zellpellets vor und nach

Lyse durch Ultraschall (P1 und P2) nachweisen. In den Wasch- und Elutionsfraktionen waren keine Proteine nachweisbar. Rekombinantes H5k lies sich somit nicht nativ aufreinigen.

In einem nächsten Schritt wurde eine denaturierende Aufreinigung durchgeführt. Da das Protein allerdings in seiner natürlichen Konfiguration für die anschließende Zellkulturarbeit benötigt wurde, folgte nach einer denaturierenden Lyse der Bakterien eine renaturierende Aufreinigung des exprimierten Proteins wie in 2.4.6.3.

Dafür wurden die Bakterienzellen mit 8 M Harnstoffpuffer denaturierend lysiert. Die anschließende Aufreinigung des Proteins erfolgte über Ni-NTA-Agarosesäulen. Dabei wurde durch einen absteigenden Harnstoffgradienten der Harnstoff langsam aus der Probe entfernt und das Protein somit auf der Säule zurückgefaltet. Die Elution erfolgte achtmalig mit je 500 µl 250 mM Imidazolpuffer.

In Abbildung 22 sind die Elutionsfraktionen dieser Aufreinigung im SDS-PAGE dargestellt.

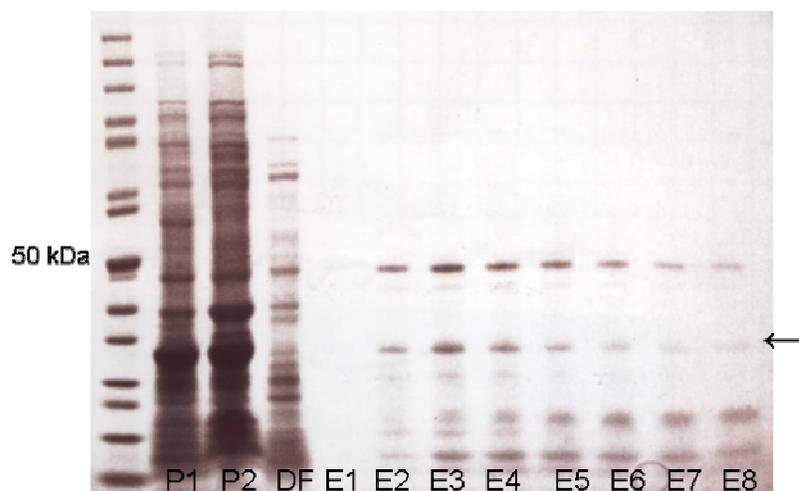


Abbildung 22: Renaturierende Proteinaufreinigung von H5 in pET 151. Die Lyse wurde mit 8 M Harnstoffpuffer durchgeführt. Aufgetragen sind das native Pellet vor Lyse (P1), das Pellet nach Zellyse (P2), der Durchfluss (DF) und acht Elutionsfraktionen (E1-E8). Errechnete Proteingröße 29 kDa, die korrekte Proteinbande ist mit dem Pfeil markiert.

Ein großer Teil des Proteins verblieb auch hier im Bakterienpellet vor und nach Lyse mit 8 M Harnstoff. In den Elutionsfraktionen E2 bis E6 ließ sich eine geringere Menge an exprimiertem Protein von der Säule aufreinigen. Störend war das Vorhandensein von Nebenbanden, was die Reinheit des gewünschten Proteins herab setzte.

Da sich auch unter der denaturierenden Lyse mit Harnstoff nur eine unzureichende Löslichkeit des H5 Proteins erreichen ließ, wurde im Folgeversuch 6 M Guanidinhydrochlorid

zur Zellyse eingesetzt und anschließend renaturierend wie in 2.4.6.3 aufgereinigt. GuanidinHCl ist ein stärkeres Denaturierungsmittel als Harnstoff, welches auch die Proteinlöslichkeit verstärkt und äquimolar zu 8 M Harnstoff eingesetzt wurde [72] Damit sollte eine größere Ausbeute an Protein aus dem Pellet erreicht werden.

Dazu wurde das vorab induzierte Bakterienpellet mit 6 M GuanidinHCl (Lysispuffer A) lysiert. Anschließend wurde dieses denaturierende Reagenz mit einem absteigenden Harnstoffgradienten schrittweise entzogen und das Protein auf der Säule renaturiert. Im Anschluss wurde acht Mal mit je 500 µl 250 mM Imidazolösung das Protein eluiert und über eine SDS-PAGE analysiert. Dies wurde in Abbildung 23 dargestellt.

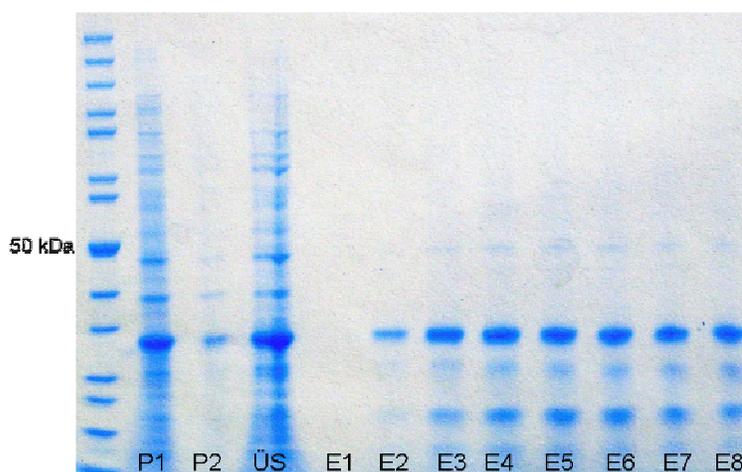


Abbildung 23: Renaturierende Proteinaufreinigung von H5 in pET 151 mit GuanidinHCl als Lysepuffer. Aufgetragen wurden das Pellet vor (P1) und nach Lyse (P2), der Überstand nach Lyse (ÜS) sowie acht Elutionsfraktionen (E1-E8). Die errechnete Proteingröße war 29 kDa.

Im Bereich des Bakterienpellets nach Lyse (P2) fand sich nur noch ein geringer Anteil des Proteins. Der Hauptanteil ließ sich mit GuanidinHCl aus den Bakterien lösen (ÜS) und in den Elutionsschritten aufreinigen. Für die anschließende Zellkulturarbeit wurden die Elutionsfraktionen E3-E8 mittels Bradford Assay quantifiziert und weiter verwendet. Im Vergleich zu den vorab durchgeführten Proteinaufreinigungen zeigte sich bei der renaturierenden Aufreinigung nach Lyse mit GuanidinHCl die beste Ausbeute an rekombinantem H5. Ein Nachteil war das Vorhandensein von Nebenbanden, welche die Reinheit des aufgereinigten Proteins herab setzten.

Der Nachweis, dass es sich bei dem eluierten Protein um rekombinantes Hämagglutinin 5 handelte, wurde mit einem Western Blot geführt.

3.3.6 Western Blot zum Nachweis von H5 in pETn151

Das für den Western Blot verwendete SDS-Page mit renaturierend aufgereinigtem H5 in pET 151 ist in Abbildung 24 dargestellt. Das exprimierte und aufgereinigte Protein befand sich im Größenbereich von ~ 30 kDa und entsprach damit der errechneten Proteingröße des rekombinanten H5 von 29 kDa. Wie bereits in 3.3.5 sind verschiedene Nebenbanden sichtbar. Die Nebenbande im Bereich von 50 kDa sollte auf einen möglichen Dimerisierungseffekt des Hämagglutinins hin untersucht werden.

Zum Nachweis des rekombinanten Hämagglutinins wurde ein kommerziell erworbener polyklonaler Primärantikörper gegen H5 des Influenza A Virus benutzt. Als Sekundärantikörper wurde ein HRP-konjugierter Antikörper eingesetzt.

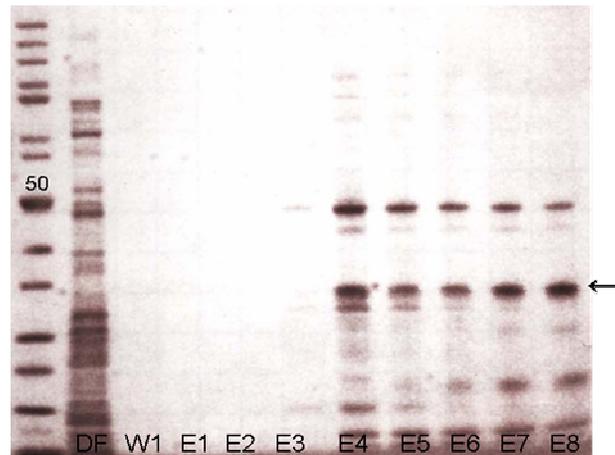


Abbildung 24: Renaturierende Proteinaufreinigung nach Lyse mit GuanidinHCl. Aufgetragen wurden der Durchfluss (DF), die Waschfraktion (W1) und acht Elutionsfraktionen (E1 bis E8). Der Pfeil markiert das rekombinante H5 Protein. Die Bande im 50 kDa Bereich sollten hinsichtlich einer möglichen Dimerisierung im Western Blot untersucht werden.

In Abbildung 25 ist der wie in 2.4.8 beschrieben durchgeführte Western Blot dargestellt.

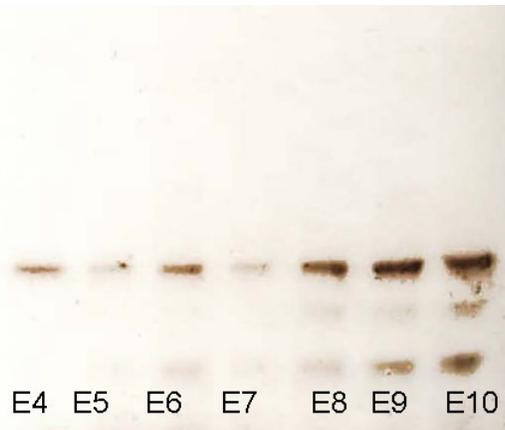


Abbildung 25: Western Blot zum Nachweis von rekombinantem H5 in pET 151-Vektor durch einen polyklonalen Anti-H5N1 Primärantikörper. Das Protein wurde vorab mit GuanidinHCl lysiert und renaturierend wie in 3.3.6 aufgereinigt.

Durch die Bandenbildung wurde das exprimierte Protein H5 in pET 151 als antigene Domäne des Hämagglutinins 5 des Influenza A Virus nachgewiesen. Da auch im unteren Bereich eine Reaktion mit dem Antikörper stattfand, musste es sich um Proteinfragmente von rekombinantem H5 handeln. Da das korrekte Protein prozentual im Vorteil gegenüber den unspezifischen Banden lag, wurde mit diesem in den Zellkulturversuchen weitergearbeitet.

Ein möglicher Dimerisierungseffekt ließ sich nicht bestätigen.

Für die folgenden Zellkulturarbeiten wurden die Expressionskulturen mit GuanidinHCl lysiert und renaturierend über eine Ni-NTA-Agarosesäule aufgereinigt. Über eine SDS-PAGE wurden die Elutionsfraktionen ermittelt, in denen das Protein von der Säule gelöst werden konnte. Diese wurden gepoolt und mittels Bradford Assay wie in 2.4.9 quantifiziert. Die jeweilig benötigte Proteinkonzentration wurde anschließend in den Zellkulturversuchen eingesetzt.

3.4 Zellkulturarbeit mit H5N1 Vollvirus

Für die Zellkulturarbeit waren verschiedene Vorarbeiten nötig.

Da im Labor zum Zeitpunkt der Arbeit keine Influenzazellkultur vorhanden war, mussten sowohl die Arbeit mit MDCK-Zellen sowie die Arbeit mit Influenzaviren etabliert werden. Dazu gehörten die Herstellung von Zell- und Virusstocks, Virusstandards festzulegen und die Vorarbeiten zur Austestung von rekombinantem Protein.

Da bei der Arbeit mit H5N1 Influenza A Virus kein zuverlässig reproduzierbares Plaque Assay etabliert werden konnte, wurde die Auswertung für dieses Virus mittels Real-Time RT PCR durchgeführt.

Alle Arbeiten mit H5N1 sowie H7N7 Influenza A Virus wurden im Sicherheitslabor der Stufe S3 durchgeführt.

3.4.1 Wachstumskinetik für H5N1 mittels Plaque Assay und RT-PCR

Um die Infektiosität des eingesetzten H5N1 Virusstocks (A/mallard/Bavaria/1/2006(H5N1)) zu ermitteln, wurde ein Plaque Assay mit H5N1 durchgeführt.

Eingesetzt wurde dort eine Verdünnungsreihe von H5N1 Virusstock (10^0) bis zu einer Verdünnung von 10^{-4} und eine Negativkontrolle ohne Virus. Die Verdünnung wurde in Infektionsmedium mit geringer FCS-Konzentration durchgeführt.

Bis zur 10^{-1} Verdünnung war eine deutliche Ausdünnung des Zellrasens zu sehen, in höheren Verdünnungsstufen waren keine Plaques oder Ausdünnungen mehr nachweisbar. Die Ausdünnung entsprach der Anzahl durch Infektion abgestorbener Zellen. Das Plaque Assay wurde in Abbildung 26 dargestellt.

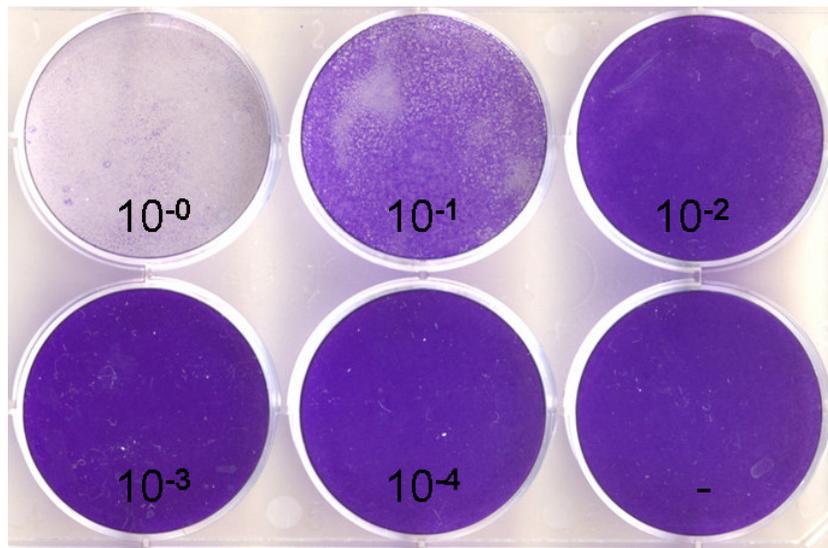


Abbildung 26: Plaque Assay von H5N1. 10^0 ist der Virusstock von H5N1 Bavaria, 10^{-1} bis 10^{-4} logarithmische Virusverdünnungen. Im letzten Feld ist eine Negativkontrolle ohne Virus aufgetragen.

Allerdings ließen sich keine Plaques auszählen. Die freien Stellen im Zellrasen waren zu klein und konfluieren teilweise. Weitere Versuche zählbare Plaques aus dem H5N1 Stock durch

Änderung der Overlaymedien, des Infektionsmediums oder mittels Immunfokusassay zu erhalten, führten nicht zum gewünschten Erfolg.

Eine weitere Methode das Viruswachstum nachzuweisen war die Quantifizierung genomischer RNA mittels Real-Time RT PCR, welche im Anschluss verwendet wurde. Um zwischen den beiden Viruskulturen eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen wurden Primer verwendet, die an konservierte Bereiche im Influenza A Virus-Genom banden. So konnte das gleiche Protokoll für H5N1 und H7N7 verwendet werden. Alle nachfolgenden Zellkulturproben wurden vor Quantifizierung in der Real-Time RT PCR wie in 2.4.11 aufgereinigt.

Um die optimale Viruskonzentration für eine Wachstumskinetik zu bestimmen, wurde eine Virustitration auf MDCK Zellen vorgenommen. Dafür wurde eine Virusverdünnungsreihe des H5N1 Stocks hergestellt. Aufgrund der Ergebnisse im Plaqueassay wurde die Verdünnungsreihe von 10^0 bis 10^{-2} gewählt. Die Adsorption des Virus erfolgte für zwei Stunden. Da H5N1 ein hoch pathogenes aviäres Influenzavirus mit einer veränderten Spaltungsstelle des Hämagglutinins ist, welches ubiquitär vorkommende Proteasen zur Spaltung nutzen kann, wurde die Adsorption von H5N1 ohne Zusatz von Trypsin durchgeführt.[33] Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen mit Medium überschichtet und für zwei Tage im Brutschrank inkubiert. Eine Probenentnahme wurde an Tag 0, nach 24 und nach 48 Stunden durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt waren ein Großteil der Zellen abgestorben und schwammen im Medium, so dass von einer Weiterinkubation abgesehen wurde. Nach RNA Extraktion wurden die Proben mittels Real-Time RT PCR wie in 2.4.12 ausgewertet und in Abbildung 27 dargestellt.

Vorab wurde mittels einer Verdünnungsreihe des eingesetzten Virus ermittelt, dass auch in der hier verwendeten PCR eine logarithmische Verdoppelung der Virusgenommene 3.3 Zykluszahlen in der RT-PCR entsprach.

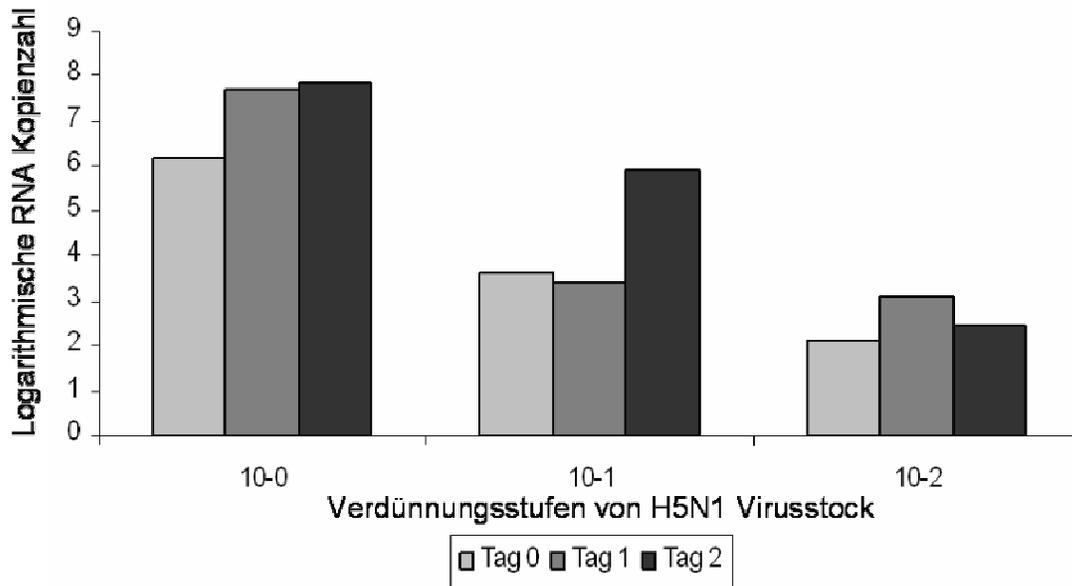


Abbildung 27: Viruswachstumskinetik von H5N1 bei unterschiedlichen Verdünnungsstufen von 10^0 bis 10^{-2} .

Auf der y-Achse ist die logarithmische Zunahme an Virusgenom-RNA und auf der x-Achse die drei verwendeten Virusverdünnungsstufen über jeweils über zwei Tage aufgetragen. Dabei entsprechen die hellgrauen Balken der Zeitpunkt t_0 direkt nach der Adsorptionsphase, die dunkelgrauen Balken entsprechen Tag 1 (24h) und die schwarzen Balken Tag 2 (48h) nach Adsorption.

Vergleicht man die Virusgenom-RNA quantitativ an Tag 0 direkt nach der Adsorptionsphase (graue Balken) in den verschiedenen Verdünnungsstufen, fand sich ein Unterschied von je zwei Logstufen mit absteigender Verdünnung des Virusstocks.

Eine Zunahme an RNA und damit ein Viruswachstum fand in der direkten Stockprobe (10^0) am Tag eins statt. An Tag zwei erschien dies bereits ein gesättigter Effekt zu sein, da es dort kaum noch zu Wachstum kam. In der 10^{-1} Verdünnung gab es an Tag eins eine fast gleichbleibende Anzahl an Virusgenomkopien. Dies ließ möglicherweise auf einen höheren Anteil nicht infektiöser RNA schließen, da in der Real-Time RT-PCR nicht zwischen infektiösen und nichtinfektiösen Partikeln differenzieren werden kann. Von Tag ein auf Tag zwei trat dann eine Zunahme der Virusgenom-RNA von ca. 2.5 log auf. Bei der 10^{-2} Verdünnung gab es lediglich an Tag 1 eine geringe Zunahme an Virusgenom-RNA um ~1 Logstufe. An Tag zwei trat kein wesentlicher Effekt auf.

Dies entsprach den Ergebnissen des Plaque Assays, bei dem eine Infektiosität bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-1} festzustellen war. Mit dieser Verdünnung wurde in den Folgeversuchen mit H5N1 weitergearbeitet.

3.4.2 Aufbau und Standardisierung eines Virusassays für H5N1

Für die Standardisierung des Virusassays wurde unter gleichen Reaktionsbedingungen und gleicher eingesetzter Virusmenge ein Mehrfachansatz hergestellt.

Dafür wurde eine 24-Lochplatte mit je $1,5 \times 10^6$ Zellen ausgesät und über Nacht inkubiert. Dieses sowie alle Folgeexperimente wurden, falls nicht anders angegeben, auf 24-Loch Zellkulturplatten mit 80% konfluierenden Zellen durchgeführt, da dadurch die einzusetzende Proteinmenge verringert werden konnte.

Am Folgetag wurde je $200 \mu\text{l } 10^{-1}$ Virusverdünnung des H5N1 Stocks pro Loch für zwei Stunden adsorbiert, zwei Mal mit PBS gewaschen und mit Medium überschichtet. Die Probenentnahmen waren nach 0 h, 24 h, 48 h und 72 Stunden. Nach RNA Extraktion erfolgte die Analyse mittels Real Time PCR.

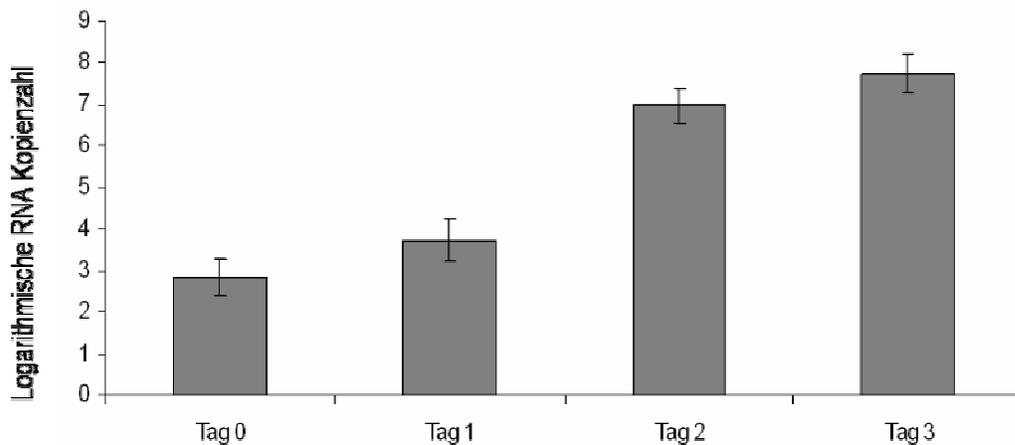


Abbildung 28: Standardisierung des Assays für H5N1. Unter gleichen Bedingungen wurden sechs Infektionen von H5N1 in der Verdünnung 10^{-1} durchgeführt und über drei Tage analysiert.

Auf der Y-Achse ist der logarithmische Virusgenomzuwachs aufgetragen, auf der x-Achse die Mittelwerte der jeweiligen Tagesproben. Zusätzlich angegeben ist die Standardabweichung.

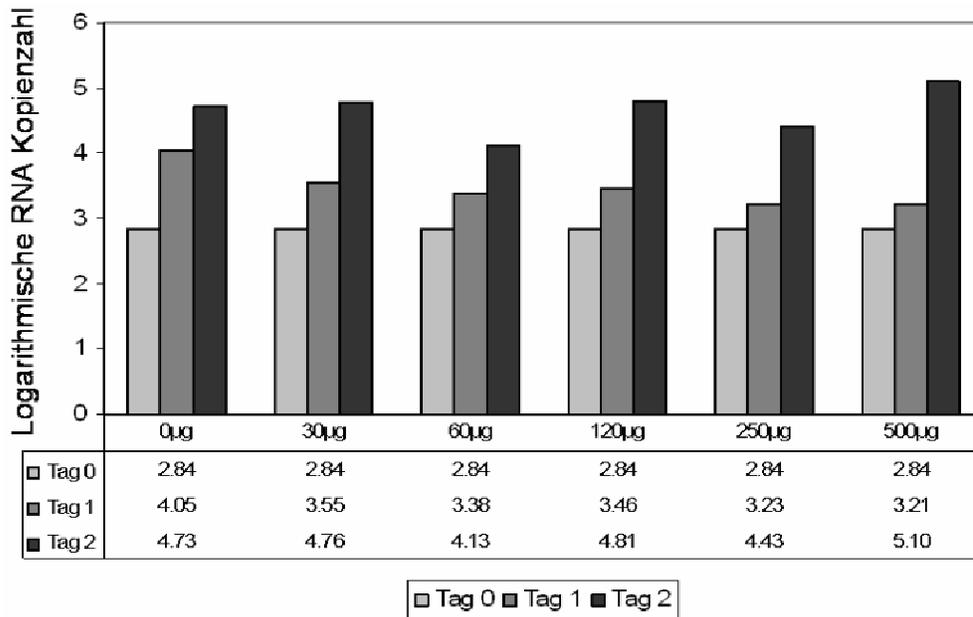
Aus jedem der sechs Ansätze wurde täglich eine Probe des Zellkulturüberstandes entnommen, aufgereinigt und ausgewertet. Aus diesen wurden Mittelwerte errechnet, welche in Abbildung 28 dargestellt sind. Ein Viruswachstum über vier Logstufen fand innerhalb der ersten beiden Tage nach Adsorption statt. Der Hauptzuwachs fand sich dabei zwischen Tag eins und zwei. Zwischen Tag zwei und drei fand kein wesentliches Wachstum mehr statt, alle Folgeversuche wurden deshalb über zwei Tage geführt.

In den nachfolgenden Schritten wurden verschiedene Inhibitionsassays auf H5N1 mit rekombinant hergestelltem H5 durchgeführt. Dafür wurden verschiedene Reaktionsansätze entwickelt.

3.4.3 Virusinfektion von H5N1 nach Präinkubation mit rekombinatem H5

Als Erstes wurde eine Präinkubation mit rekombinatem H5 vor Infektion mit H5N1 durchgeführt. Dabei sollten eine mögliche kompetitive Hemmung von rekombinatem H5 auf das Wachstum von H5N1 sowie Unterschiede zwischen den eingesetzten Proteinmengen untersucht werden. Der Versuch wurde über zwei Tage durchgeführt, das Hauptaugenmerk lag dabei auf dem Zeitraum zwischen Tag eins und zwei, da in den Vorversuchen in diesem Bereich der größte Wachstumszuwachs von H5N1 lag.

Dafür wurden MDCK 2 Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen (0, 30, 60, 120, 250 und 500 µg) von rekombinant hergestelltem H5 in PBS für zwei Stunden im Brutschrank präinkubiert. Daran anschließend wurde eine Adsorption von H5N1 in der Verdünnung 10^{-1} in diesem Ansatz durchgeführt. Die Zellen wurden nach zwei Stunden drei Mal mit PBS gewaschen, mit Medium überschichtet und für zwei Tage im Brutschrank inkubiert. Proben des infektiösen Zellkulturüberstandes wurden nach null, 24 und 48 Stunden nach Adsorption entnommen, die RNA wie in 2.4.11 extrahiert und eine quantitative Real-Time RT PCR wie in 2.4.12 angeschlossen. Die Ergebnisse wurden in der Abbildung 29 dargestellt. Dabei wurde der Zeitpunkt nach Adsorption (Tag 0) standardisiert.



Eingesetzte Konzentration an rekombinatem H5

Abbildung 29: Wachstumskinetik für H5N1 nach Präinkubation mit verschiedenen Mengen an rekombinant hergestelltem H5. Auf der y-Achse ist die Virusgenom-RNA logarithmisch aufgetragen. Auf der x-Achse sind die einzelnen Reaktionsansätze mit unterschiedlicher Menge an Protein (0-500 µg) aufgetragen. Dargestellt sind für jede Probe der Tag 0 als hellgraue, der Tag 1(nach 24h) als dunkelgraue und der Tag 2 (nach 48h) als schwarze Säule.

Betrachtete man die absoluten Zahlen der Virus-RNA an Tag 1 nach Adsorption fiel folgendes auf:

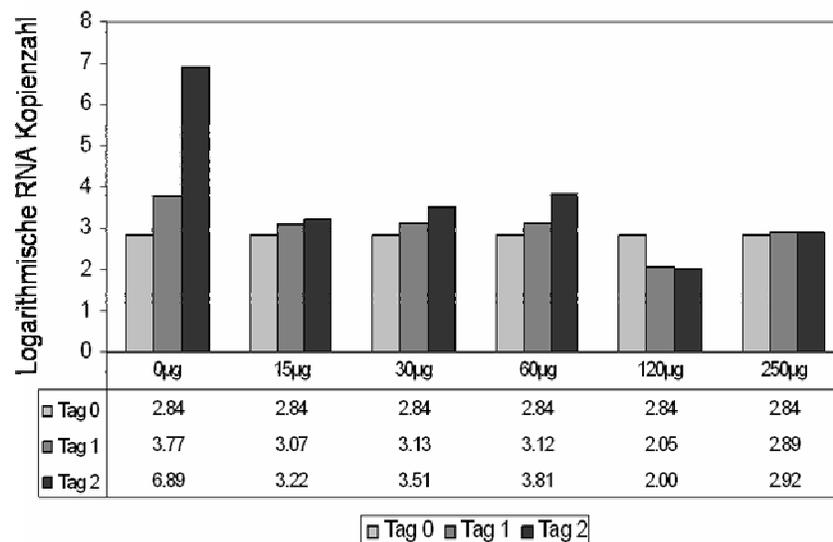
Bei der Infektion ohne Protein zeigte sich an Tag eins eine größere Virusmenge als in den Proben, welche mit rekombinatem H5 präinkubiert wurden. Dabei kam es zu einer Hemmung des Viruswachstums, die mit zunehmender Proteinkonzentration größer wurde. Im Vergleich von Tag 0 und Tag 1 für die Infektion ohne und mit Protein wurde dieser Unterschied noch deutlicher. Am Tag zwei war dieser Unterschied nicht mehr nachzuweisen. Das Viruswachstum von H5N1 in den Kulturen ohne sowie mit Präinkubation von H5 glich sich an. Es trat somit ein kompetitiver Hemmeffekt durch die Zugabe von rekombinatem H5 in den ersten Stunden der Infektion auf, der sich im Verlauf wieder relativierte. Dieser war zusätzlich konzentrationsabhängig.

In einem Folgeversuch wurde untersucht, ob sich eine kompetitive Hemmung auf das Viruswachstum in permanenter Anwesenheit von rekombinatem H5 erzielen ließ.

3.4.4 Virusinfektion mit H5N1 in Anwesenheit von rekombinantem H5 (15-250 µg)

In diesem Ansatz wurde eine Virusinfektion mit H5N1 mit unterschiedlichen Konzentrationen an rekombinantem H5 durchgeführt. Sowohl in der Adsorptionsphase wie auch in der nachfolgenden Infektionsphase über zwei Tage wurde H5 in das Medium gegeben und somit eine durchgehende Anwesenheit und gleichmäßige Verteilung des Proteins gewährleistet.

Der Versuch wurde in einer 24-Loch-Platte durchgeführt. Dafür wurden MDCK 2 Zellen in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ Platte ausgesät, eine 85%ige Konfluenz der Zellen war am Folgetag erreicht. Die Adsorption von H5N1 in 10^{-1} Verdünnung erfolgte zusammen mit rekombinantem H5 in folgenden Konzentrationen: Im ersten Loch kein Protein, im zweiten 15 µg, in dritten 30 µg, im vierten 60 µg, im fünften 120 µg und im sechsten Loch 250 µg. Das Gesamtvolumen betrug für die Adsorptionsphase 250 µl. Nach zwei Stunden wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen. Für die Infektionsphase wurden die gleichen Proteinkonzentrationen wie in der Adsorptionsphase verwendet und in Infektionsmedium zu einem Gesamtvolumen von 500 µl/ Loch zu den Zellen gegeben. Die Infektionsphase betrug zwei Tage. Dabei wurden Proben des infektiösen Zellkulturüberstandes 24 und 48 Stunden nach Adsorption entnommen, die RNA wie in 2.4.11 extrahiert und die Proben mittels Real-Time RT PCR wie in 2.4.12 quantifiziert.



Eingesetzte Konzentration an rekombinantem H5

Abbildung 30: Inhibitionsversuch von H5N1 in permanenter Anwesenheit von H5. Auf der y-Achse ist die logarithmische Virusgenom-RNA dargestellt. Auf der x-Achse sind die einzelnen Reaktionsansätze mit den unterschiedlichen Proteinkonzentrationen an Tag 0 (hellgrau), Tag 1 (dunkelgrau) und Tag 2 (schwarz) dargestellt.

In Abbildung 30 wurde die Wachstumskinetik von H5N1 in Anwesenheit von unterschiedlichen Konzentrationen an H5 dargestellt. Dabei zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen dem Viruswachstum ohne Protein und den Reaktionsansätzen mit Zusatz von rekombinantem H5 Protein. Der Effekt ist am ersten Tag eher gering ausgebildet, aber war zwei Tage nach Adsorption sehr deutlich zu sehen. Dabei zeigte sich ein Zuwachs an Virus-RNA um vier Logstufen zwei Tage nach Adsorption ohne Proteinzusatz. Im Vergleich dazu wurde das Viruswachstum bei allen Ansätzen mit Zugabe an rekombinantem H5 gehemmt. Der Zuwachs an Virus-RNA betrug weniger als eine Logstufe über zwei Tage nach Adsorption. Dabei gab es keinen wesentlichen Unterschied zwischen den unterschiedlichen Proteinkonzentrationen.

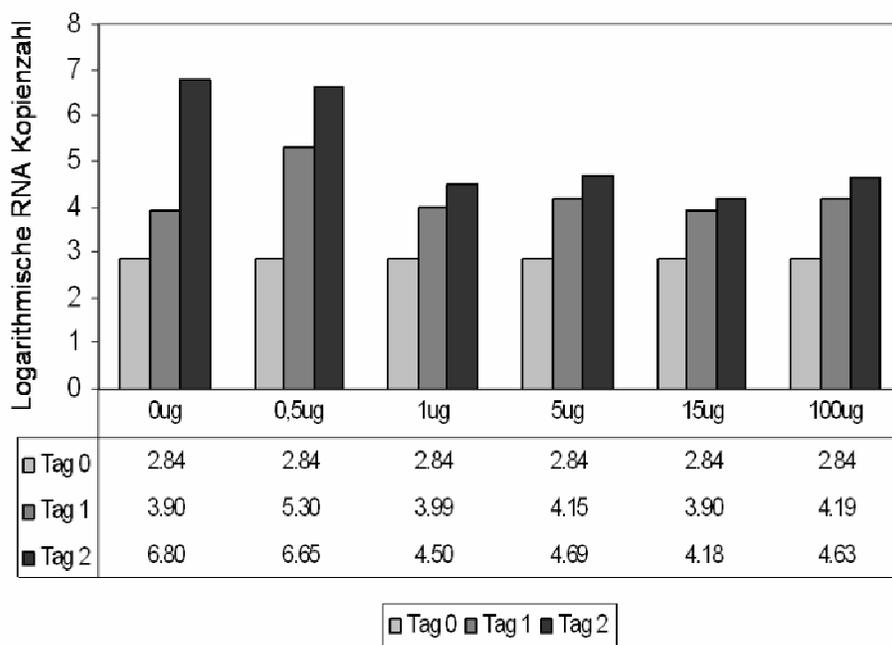
Die letzten beiden Reaktionsansätze mit hohen Proteinkonzentrationen (120 und 250 µg) waren dabei nur bedingt auswertbar. Bei diesen wurde makroskopisch ab dem ersten Tag nach Adsorption eine Ablösung des Zellrasens beobachtet. Mikroskopisch stellten sich die Zellen als Fragmente bzw. Zelltrümmer dar. Nach zwei Tagen waren alle Zellen in diesen Reaktionsansätzen abgestorben. Es besteht fraglich eine Zelltoxizität bei Zugabe hoher Proteinkonzentrationen. Diese Ablösung wurde auch bei Testung des Proteins auf Zellen ohne Virus in hohen Proteinkonzentrationen beobachtet.

Da bereits ab einer Konzentration von 15 µg an zugesetzten H5 Protein das Viruswachstum nahezu vollständig gehemmt werden konnte, wurden im Folgeversuch die Proteinkonzentrationen verringert und kompetitive Hemmung auf das Viruswachstum von H5N1 untersucht.

3.4.5 Virusinfektion mit H5N1 in Anwesenheit von rekombinanten H5 (0,5-100 µg)

Der Versuch wurde technisch wie 3.4.4 durchgeführt. Lediglich die eingesetzten Proteinkonzentrationen von rekombinantem H5 wurden wie folgt verändert: Im ersten Loch wurde kein Protein dazugegeben, im zweiten 0,5 µg, im dritten 1 µg, im vierten 5 µg, im Fünften 15 µg und im sechsten Loch 100 µg H5. Das Protein wurde sowohl bei der Adsorptionsphase von H5N1 sowie in der nachfolgenden Infektionsphase über zwei Tage dem Infektionsmedium zugegeben. Proben des infektiösen Zellkulturüberstandes wurden 24 und 48 Stunden nach Adsorption entnommen, die RNA wie in 2.4.11 extrahiert und in der

Real-Time RT PRC wie in 2.4.12 quantifiziert. Die Auswertung ist in Abbildung 31 dargestellt.



Eingesetzte Konzentration an rekombinatem H5

Abbildung 31: H5N1 Inhibitionsversuch von H5N1 mit niedrigen Konzentrationen an rekombinatem H5. Auf der y-Achse ist die logarithmische Zunahme an Virus-RNA aufgetragen. Auf der x-Achse sind die sechs verschiedenen Reaktionsansätze mit unterschiedlichen Konzentrationen an rekombinanten H5 abgebildet. Dabei sind pro Ansatz zwei Tage abgebildet, in hellgrau Tag 0, in dunkelgrau Tag 1 und in schwarz Tag 2 nach Adsorption.

Auch bei deutlich geringeren Proteinkonzentrationen als in 3.4.4 verwendet, zeigte sich eine kompetitive Hemmung von rekombinatem H5 auf das Wachstum von H5N1. Dabei kam es bereits ab einer Proteinkonzentration von 1 µg H5 zu einer Verringerung der nachweisbaren Virus-RNA im Vergleich zum Viruswachstum ohne Proteinzugabe. Dieser Effekt ist besonders deutlich zwei Tag nach Adsorption zu sehen, die Virusreplikation lässt sich durch Zugabe von rekombinatem H5 um mehr als zwei Logstufen verringern.

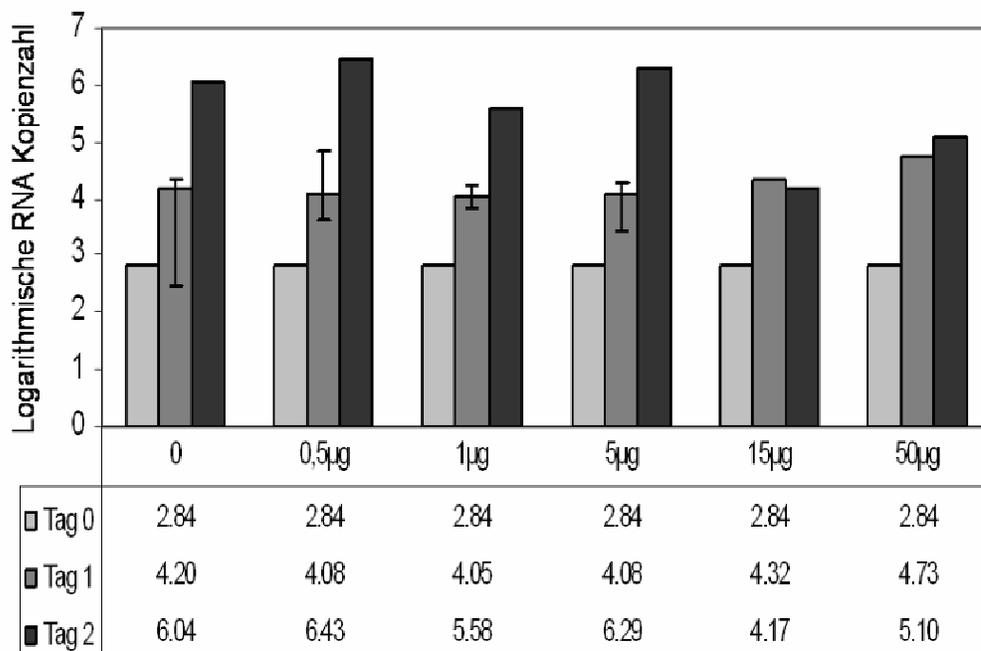
Makroskopisch wurde erneut bei Zugabe von größeren Proteinmengen (100 µg H5) nach zwei Tagen eine deutliche Ablösung des Zellrasens beobachtet.

3.4.6 Gegentestung mit einem Nicht-Influenzaprotein/ Test der Spezifität

Um die spezifische Hemmung von H5 auf das Viruswachstum von H5N1 zu testen, wurde eine Wachstumkinetik von H5N1 mit Zugabe eines Nicht-Influenza Proteins durchgeführt. Dabei sollte eine zufällige Reaktion, die durch die Zugabe eines rekombinanten Proteins zur Viruszellkultur zustande kommt, ausgeschlossen werden. Als Protein wurde dafür ein in der eigenen Arbeitsgruppe hergestelltes Spikeprotein des SARS-CoV verwendet. Dies wurde wie H5k in einen pET 151 Vektor kloniert, die Größe lag mit ~38 kDa in einer vergleichbaren Größenordnung. Auch eine renaturierende Aufreinigung wurde unter gleichen Bedingungen wie bei der Aufreinigung von H5 durchgeführt.

Die Virusinfektion erfolgte wie in 3.4.5 auf einer 24-Loch Zellkulturplatte. Die Konzentration von rekombinantem SARS-CoV Spikeprotein wurden wie folgt gewählt: im ersten Loch kein Protein, im zweiten 0,5 µg, im dritten 1 µg, im vierten 5 µg, im fünften 15 µg und im sechsten Loch 50 µg Spikeprotein. Dies wurde sowohl in der zweistündigen Adsorptionsphase von H5N1 10^{-1} als auch in der Infektionsphase über zwei Tage dem Infektionsmedium zugegeben. Dadurch wurde eine durchgehende und gleichmäßige Anwesenheit von Spikeprotein in der Viruszellkultur gewährleistet. Proben des infektiösen Überstandes wurden nach 24 und 48h entnommen, die RNA wie in 2.4.11 extrahiert und eine Quantifizierung über eine Real-Time RT PCR wie in 2.4.12 durchgeführt. Die Auswertung ist in Abbildung 32 dargestellt.

In allen Ansätzen kam es zu einem Zuwachs an Virusgenom-RNA von H5N1, sowohl ohne als auch mit Zugabe an SARS-Spikeprotein. Im Konzentrationsbereich bis zu 5 µg Spikeprotein war kein Unterschied zu den Proben ohne Protein festzustellen. Die Konzentration an detektierte RNA-Menge war in diesen Proben ähnlich. An Tag eins konnte kein Effekt von zugesetztem Spikeprotein auf das Viruswachstum von H5N1 festgestellt werden. Im Proteinkonzentrationsbereich von 15 µg und 50 µg kam es an Tag zwei zu einer geringen Abnahme der Virusgenom-RNA um eine Logstufe. Dies wurde bei einer relativ großen internen Schwankung in diesem Versuch als unspezifischer Effekt gewertet.



Eingesetzte Konzentration an rekombinantem SARS Spikeprotein

Abbildung 32: Wachstumskinetik von H5N1 mit unterschiedlichen Konzentrationen von rekombinant hergestelltem SARS-Spikeprotein. Auf der y-Achse ist logarithmisch die Virusgenom-RNA aufgetragen. Auf der x-Achse die Reaktionsansätze mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen. Dargestellt sind jeweils Tag 0 (hellgrau), 24h (dunkelgrau) und 48h (schwarz) nach Virusadsorption.

Somit ließ sich nachweisen, dass die Wirkung von rekombinantem H5 auf das Viruswachstum von H5N1 eine spezifische Hemmung hervorrief und keine unspezifische Inhibition durch Zugabe eines Proteins war.

In sich anschließenden Folgeversuchen kam es zu Schwierigkeiten in der Kultivierung der verwendeten MDCK-Zellen mit eingeschränktem Wachstumsverhalten und Adhärenzstörungen sowie lichtmikroskopisch sichtbarer Vakuolenbildung der Zellen. Eine durchgeführte Mykoplasmen-PCR war negativ. Bei einer zunehmend hohen Passagezahl der Zellen mussten diese gegen eine neue MDCK-Zellenlinie ausgetauscht werden.

3.5 Zellkulturarbeit mit H7N7 Vollvirus

Wie unter 3.4 gezeigt, ließ sich mit rekombinantem H5 das Viruswachstum von H5N1 hemmen. Eine Untersuchung ob diese Hemmung spezifisch für den Subtyp H5N1 des

Influenza A Virus war wurde angeschlossen. Dafür wurde das rekombinant hergestellte H5 Protein mit dem hoch pathogenen Influenza A Virus H7N7 getestet und das Viruswachstum untersucht.

Die Zellkulturversuche wurden dabei wie die vorangegangenen Versuche mit H5N1 strukturiert. Im ersten Schritt wurden eine Stockquantifizierung und Standardisierung des Viruswachstums durchgeführt. Anschließend wurde Inhibitionsversuche mit rekombinantem H5 auf das Viruswachstum von H7N7 durchgeführt.

3.5.1 Plaqueassay von H7N7

Die Quantifizierung des H7N7 Stocks (A/Bratislava(H7N7)) wurde mit einem Plaqueassay wie in 2.4.13 beschrieben, durchgeführt. Die Verdünnungsreihe wurde von 10^0 (Virusstock) bis 10^8 gewählt. Eine Negativkontrolle ohne Virus wurde mit aufgetragen. Es wurden $1,5 \times 10^6$ MDCK Zellen/ Platte ausgesät, die Virusadsorption erfolgte für 2h, die Infektionszeit betrug drei Tage. Das Plaque Assay wurde in Abbildung 33 abgebildet.

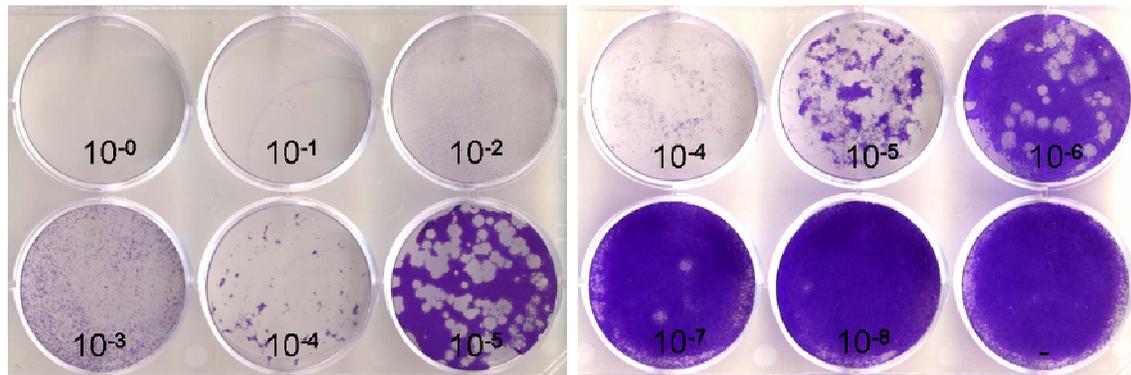


Abbildung 33: Plaqueassay von H7N7 Influenza A Virus (A/Bratislava(H7N7)) mit Kristallviolett färbung

Man sah einen ausgeprägten zytopathischen Effekt des Stocks, bei einer Verdünnung von 10^7 ließen sich zwei Plaques auszählen. Daraus erfolgte die Stockquantifizierung.

Um eine definierte Infektion zu haben wurde mit der 10^4 Virusverdünnung mit einem MOI von 0,001 weitergearbeitet.

3.5.2 Standardisierung des Virusassay mit H7N7

Für eine Standardisierung des Virusassays wurde ein Mehrfachansatz mit H7N7 10^4 auf einer Sechsllochplatte durchgeführt. Dabei wurde das Viruswachstum unter gleichen

Reaktionsbedingungen über drei Tage untersucht. Proben des infektiösen Zellkulturüberstandes wurden null, 24, 48 und 72 h nach Adsorption entnommen und die Virus-RNA wie in 2.4.11 extrahiert. Um die Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen von H5N1 zu haben, wurde die Quantifizierung von H7N7 Virusgenom-RNA mittels Real-Time RT PCR wie in 2.4.12 durchgeführt. In Abbildung 34 ist die Standardisierung des H7N7 Virusassay dargestellt.

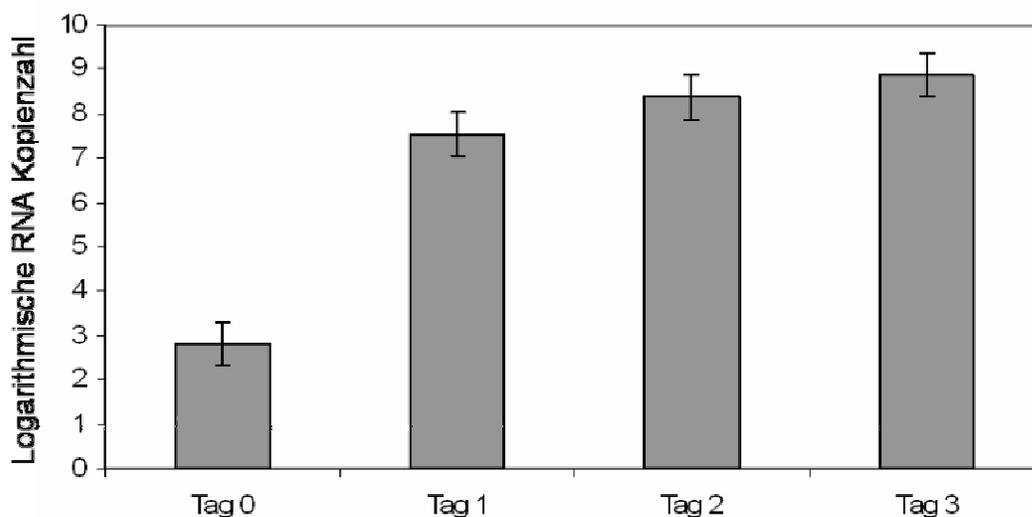


Abbildung 34: Standardisierte Wachstumskinetik von H7N7 über drei Tage.

Dargestellt sind auf der x-Achse die Mittelwerte der verschiedenen Tage nach Adsorption. Auf der y-Achse ist logarithmisch Virusgenom-RNA aufgetragen. Auf der x-Achse sind die Mittelwerte mit Standardabweichung für den jeweiligen Tag nach Adsorption dargestellt.

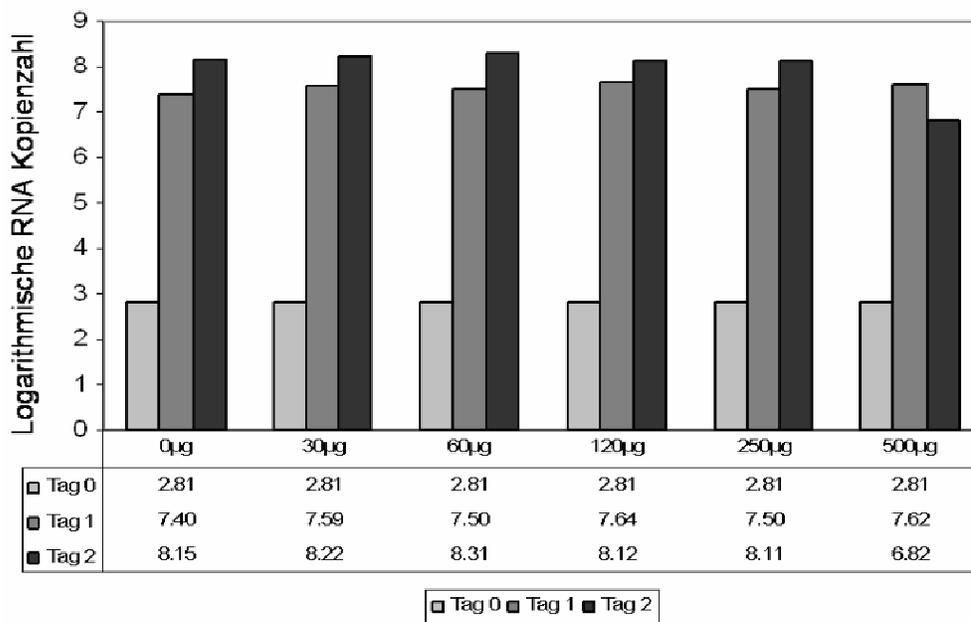
Den größten Zuwachs an Virus-RNA um ~fünf Logstufen fand sich am ersten Tag nach Adsorption von H7N7. An den weiteren Tagen fand kaum noch ein Viruswachstum statt. Für die Folgeversuche wurde somit der Tag drei nicht mehr mitbestimmt.

3.5.3 Virusinfektion von H7N7 nach Präinkubation mit rekombinantem H5

Das rekombinante H5 wurde hinsichtlich einer inhibitorischen Wirkung auf das Viruswachstum von Influenza A H7N7 untersucht. Dies erfolgte in einem ersten Schritt durch Präinkubation der Zellen mit rekombinantem H5 und anschließender Infektion mit H7N7. Der

Versuchsaufbau entsprach dabei der Wachstumskinetik von H5N1 mit Präinkubation von H5 wie in 3.4.3 dargestellt.

Dafür wurden MDCK Zellen für zwei Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen an rekombinantem H5 inkubiert. Die Konzentrationen wurden dabei wie folgt gewählt: Im ersten Loch kein Protein, im zweiten 30 µg, im dritten 60 µg, im vierten 120 µg, im fünften 250 µg und im sechsten Loch 500 µg H5. Eine zweistündige Virusadsorption von H7N7 schloss sich an. Dabei wurde das rekombinante H5-Protein auf den Zellen belassen. Nach der Adsorption wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit je 500 µl Infektionsmedium pro Loch überschichtet und für zwei Tage infiziert. Proben des infektiösen Überstandes wurden nach null, 24 und 48h entnommen, die RNA wie in 2.4.11 extrahiert und die Proben mittels Real-Time RT PCR wie in 2.4.12 quantifiziert. Die Auswertung wurde in Abbildung 35 dargestellt.



Eingesetzte Konzentration an rekombinantem H5

Abbildung 35: Wachstumskinetik von H7N7 nach Präinkubation mit verschiedenen Konzentrationen an H5 über zwei Tage. Auf der y-Achse ist logarithmisch die Virusgenom-RNA aufgetragen. Auf der x-Achse sind die verschiedenen Reaktionsansätze mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen (0-500 µg) an H5 zu den Zeitpunkten Tag 0 (hellgrau), Tag 1(dunkelgrau) und Tag 2 (schwarz) dargestellt.

Die Präinkubation mit H5 hat keinen Effekt auf das Viruswachstum von H7N7. In allen Reaktionsansätzen mit sowie ohne Protein fand sich ein Viruswachstum um ~ fünf Logstufen am ersten Tag nach Adsorption. Das Viruswachstum war zu diesem Zeitpunkt nahezu gesättigt, ein weiterer Zuwachs fand lediglich um ~ eine Logstufe an Tag zwei statt. Bei der

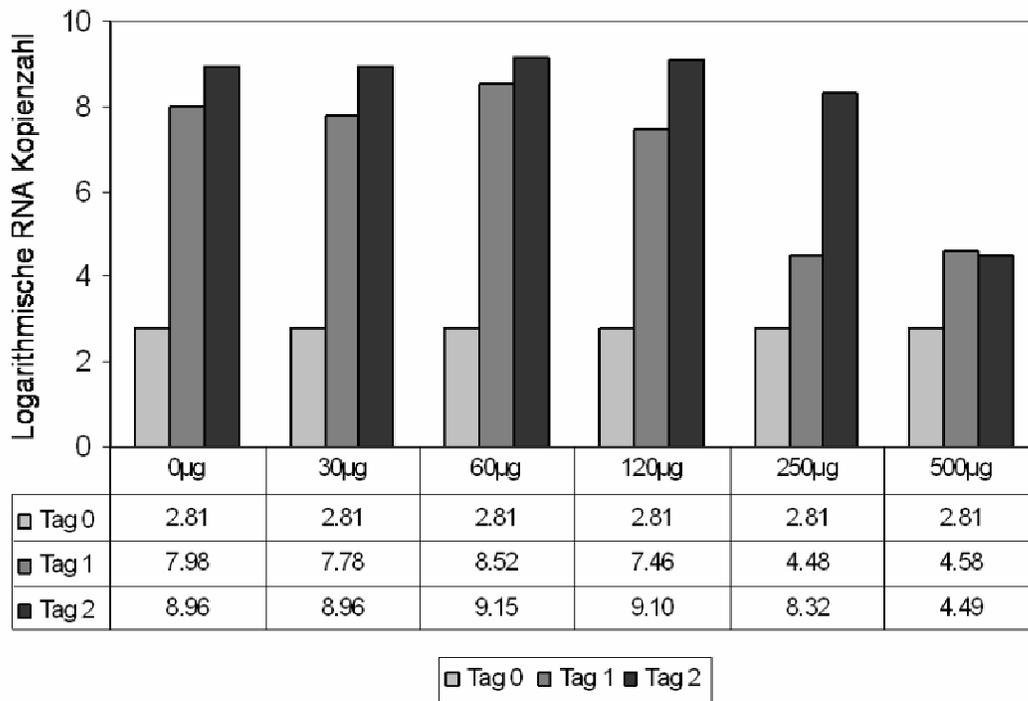
Präinkubation mit 500 µg H5 zeigte sich an Tag zwei eine geringe Verminderung um ~ eine Logstufe der nachgewiesenen Virusgenom-RNA im Vergleich zu den anderen Ansätzen. Dies wurde allerdings als unspezifischer Effekt bei Zugabe an großen Mengen von rekombinantem Protein gewertet.

3.5.4 Virusinfektion von H7N7 in permanenter Anwesenheit von rekombinantem H5

Es ließ sich keine Inhibition des Viruswachstums von H7N7 durch eine Präinkubation mit rekombinantem H5 nachweisen. Im Folgeversuch wurde deshalb die Wachstumskinetik von H7N7 bei dauerhaft zugegebenem H5 untersucht. Der Versuch wurde dem Inhibitionsversuch von H5N1 mit H5 in 3.4.4 angepasst.

Dafür wurde auf 80%ig konfluenten MDCK Zellen für zwei Stunden eine Virusadsorption mit H7N7 10^{-4} durchgeführt. Das Infektionsmedium enthielt zusätzlich rekombinantes H5 in folgenden Konzentrationen: Im ersten Loch kein Protein, im zweiten 30 µg, im dritten 60 µg, im vierten 120 µg, im fünften 250 µg und im sechsten Loch 500 µg H5. Nach zwei Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Infektionsmedium überschichtet. Zu diesem wurde erneut rekombinantes H5 Protein in oben angegebenen Konzentrationen zugefügt. Eine Infektion wurde über zwei Tage durchgeführt. Zum Zeitpunkt null, 24 und 48h wurden Proben des infektiösen Zellkulturüberstandes entnommen, die RNA wie in 2.4.11 extrahiert und mittels Real-Time RT PCR wie in 2.4.12 quantifiziert.

Die Auswertung wurde in Abbildung 36 dargestellt.



Eingesetzte Konzentration an rekombinarem H5

Abbildung 36: Wachstumskinetik von H7N7 in permanenter Anwesenheit verschiedener Proteinkonzentrationen von rekombinarem H5.

Auf der y-Achse ist die Virusgenom-RNA logarithmisch aufgetragen. Auf der x-Achse sind die Reaktionsansätze mit unterschiedlichen Konzentrationen (0-500 µg) an H5 aufgetragen. Für jeden Ansatz wurde Tag 0 (hellgrau), Tag 1 (dunkelgrau) und Tag 2 (schwarz) dargestellt.

Im Bereich bis zu 120 µg zugegebenes H5 zeigte sich kein Unterschied im Viruswachstum zu dem Ansatz ohne Protein. Es kam einen Tag nach Adsorption zu einer Zunahme an Virus-RNA um ~ 5 Logstufen. An Tag zwei ließ sich nur noch ein geringes Viruswachstum um ~ eine Logstufe nachweisen. Durch rekombinantes H5 ließ sich das Wachstum von H7N7 nicht kompetitiv hemmen.

Ab einer Konzentration von 250 µg H5 kam es zu einer Verminderung der nachweisbaren Virusgenom-RNA. Makroskopisch sah man in diesen Proben einen deutlichen zytotoxischen Effekt, welcher bereits ab dem ersten Tag zum Absterben des gesamten Zellrasens führte. Mikroskopisch stellten sich die Zellen als Zelltrümmer dar. Dieser Effekt wurde als unspezifischer Effekt durch Zugabe von hohen Proteinkonzentrationen zur Viruszellkultur gewertet, da dieser bei allen vorangegangenen Versuchen beobachtet wurde.

4 Diskussion

Durch die rasante kontinentübergreifende Verbreitung des H5N1 Influenza A Virus und das Vorkommen von spezieübergreifenden hochletalen Infektionen wurde die Weltaufmerksamkeit auf eine mögliche Influenzapandemie durch dieses Virus gelenkt. Hoch pathogenes H5N1 Influenza A Virus zeichnet sich dabei durch hohe Letalitätsraten aus, die bei humanen Infektionen bei bis zu 60% liegen. [3] Diese Zahlen beziehen sich auf gemeldete erkrankte Patienten. In wieweit allerdings asymptomatische oder untypische Erkrankungen vorlagen konnte noch nicht abschließend geklärt werden. [17,18]

Dabei stellt sich die Frage nach serologischen Nachweissystemen, mit denen man spezifisch abgelaufene Infektionen nachweisen kann. Für Influenzanascheweise ist dafür im Moment der Virusneutralisationstest der Goldstandard. [33] Allerdings erfordert dieser Test die Arbeit mit Vollvirus. Dafür würden bei größer angelegten epidemiologischen Studien eine große Menge an Vollvirus benötigt werden. Zusätzlich erfordert der Test bei hoch pathogenen Influenzaviren die Arbeit im Sicherheitslabor sowie damit verbunden einen hohen personellen sowie finanziellen Aufwand.

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag im Bereich der technischen Durchführung ein virales Protein in einem bakteriellen Vektor zu exprimieren und dieses in seiner natürlichen Konformation aufzureinigen. Dafür wurde ein Teil des Hämagglutinins 5 des Influenza A Virus H5N1 nach Analyse der Rezeptorstruktur ausgewählt, kloniert, exprimiert und aufgereinigt. Anschließend wurde in der Viruszellkultur untersucht, ob sich durch eine Kompetition des hergestellten Proteins mit aviären Influenzaviren eine Hemmung des Viruswachstums erzielen ließ. Dieses wurde ebenfalls hinsichtlich der spezifischen Hemmung der Subtypen im Zellkulturversuch getestet.

Im ersten Teilabschnitt der Arbeit wurde die globuläre Domäne des Hämagglutininmonomers mittels einer computerbasierten 3-D-Analyse auf den hauptantigenen Bereich hin untersucht. Dabei stellte eine Schwierigkeit die ausgeprägte Variabilität dieser Region dar, welche nicht nur zwischen den einzelnen Subtypen variiert sondern auch zwischen einzelnen Stämmen des gleichen Subtyps. [6]

Es sollte nur ein Teil der globulären Domäne des Hämagglutinins exprimiert werden, da ein kleineres Protein eine bessere Handhabung sowohl für die Klonierung als auch für die

anschließenden Zellkulturversuche ermöglichte. Trotz alledem sollte die Funktion der Rezeptorbindenden Domäne erhalten bleiben.

Eine weitere Frage war nach der antigenen Wirkung und damit Funktion dieses Teilfragmentes. Da Hämagglutinin an Rezeptorbindende Struktur fungiert war zu erwarten, dass die globuläre Domäne mit der Rezeptorbindenden Stelle einen kompetitiven Faktor darstellte. Allerdings liegt natives Hämagglutinin als Trimer vor, diese Zusammenlagerung konnte bei dem ausgewählten Hämagglutininabschnitt nicht gewährleistet werden. In anderen Arbeiten wurde allerdings gezeigt, dass dieser Bereich als Monomer zu einer nur geringfügig reduzierten Antikörperproduktion führt als das Hämagglutinin als Ganzes. [73] Die Funktionalität war dadurch auch als Monomer anzunehmen.

Wie in dem zweiten Molekular- und Proteinbiochemischen Teil der Arbeit gezeigt werden konnte, ließ sich die Rezeptorbindungsstelle des Hämagglutinins H5 in bakteriellen Vektoren klonieren und exprimieren.

Dabei wurde ein T7 Promotor gesteuertes *E. coli* System gewählt. Dadurch konnten größere Mengen an exprimiertem Protein, wie für die anschließenden Zellkulturarbeiten benötigt, in einem in der Handhabung einfachen Vektorsystem hergestellt werden.

Die Hauptschwierigkeit lag dabei in der ausgeprägten Aggregatbildung des rekombinanten Proteins, welche eine primär native Aufreinigung unmöglich machte. Diese Tendenz ließ sich auch durch die Verwendung von Thioredoxin im Vektorbereich nicht verhindern. Somit erfolgte die Umklonierung in einen kleineren Vektor, um den exprimierten Vektoranteil so gering wie möglich und somit einen möglichst nativen Hämagglutininanteil zu erhalten. Verschiedene Aufreinigungsstrategien wurden miteinander verglichen um das rekombinante Protein aus den Bakterienzellen zu lösen und sauber aufzureinigen. Eine denaturierende Aufreinigung zeigte in den Versuchen gute und saubere Ergebnisse. Dadurch wurde allerdings die natürliche Konformation des Proteins zerstört. Da dieses allerdings für funktionelle Untersuchungen in der Zellkultur benutzt werden sollte, war diese Methode ungeeignet. Im Verlauf ließen sich die besten Ergebnisse durch eine denaturierende Zellyse mit GuanidinHCl und anschließend renaturierender Proteinaufreinigung durch Salzzug erreichen. Dieser wurde durch einen absteigenden Harnstoffgradienten geführt. Die renaturierende Proteinaufreinigung nach Lyse mit GuanidinHCl als geeignete Methode nach Expression in bakteriellen Vektoren wurde auch von anderen Gruppen gefunden. [74]

Nachteiliger Nebeneffekt war dabei eine Proteinfragmentbildung, welche sich durch einen Western Blot nachweisen ließ. Dadurch konnte nur eine eingeschränkte Reinheit des

rekombinant hergestellten Hämagglutinins erreicht werden. Die Nebenprodukte unterlagen allerdings quantitativ dem reinen Protein, weshalb dieses eingesetzt wurde.

Eine weitere Schwierigkeit lag in der Komplexität des natürlich vorkommenden Hämagglutinins. Dieses besteht aus einem Homotrimer, die Funktionsweise wird durch eine Konformationsänderung wesentlich beeinflusst. Das Trimer wird durch Disulfidbrücken im Bereich des HA2 stabilisiert, dieser wurde in dem ausgewählten Teil des rekombinanten Proteins allerdings nicht exprimiert. Das in der Arbeit hergestellte Protein H5 lag als Monomer vor, die errechnete Proteingröße bezog sich ebenfalls auf die monomere Form. Mit einem Western Blot ließ sich das Protein als antigene Domäne des Hämagglutinins H5 bestätigen. Dieser wurde mit einem polyklonalen Antikörper gegen die Hämagglutinin 5 Domäne durchgeführt.

Die sich bei der Proteinaufreinigung darstellenden Banden im Bereich möglicher Di- und Trimere ließen sich im Western Blot nicht bestätigen. Die fehlende Zusammenlagerung von polymeren Proteinen ist als Schwierigkeit bei rekombinant hergestellten Proteinen bekannt, dabei konnte bisher nur in Ausnahmefällen eine Trimerisierung nachgewiesen werden. [75]

Eine zusätzliche Ursache der fehlenden Trimerisierung lag in der Verwendung bakterieller Klonierungssysteme. In Bakterienzellen findet keine posttranslationale Modifikation statt, welche allerdings für die Ausbildung von Tertiär- und Quartärstrukturen von Proteinen und deren korrekte Faltung notwendig ist.

Die fehlende Glykosylierung spielte möglicherweise ebenfalls eine Rolle im Bereich der rezeptorbindenden Domäne. Dort sind nativ zwei Zuckerketten vorhanden. Dabei ist die Bedeutung dieser Zuckerreste für den Prozess der Rezeptorbindung des Hämagglutinins noch nicht vollständig verstanden [76, 77].

Im dritten Teil der Arbeit wurde eine mögliche kompetitive Hemmung des hergestellten Hämagglutininproteins auf die Virusreplikation in der Viruszellkultur untersucht.

Dafür wurde ein Influenzazellkultursystem für die hoch pathogenen Influenzaviren H5N1 und H7N7 aufgebaut, da dieses zu dem Zeitpunkt der Arbeit nicht im Labor etabliert war. Die initial verwendete MDCK-Zellreihe wies im Verlauf eine zu hohe Passagezahl auf, welche sich durch Schwierigkeiten beim Wachstum und einer Änderung im Verhalten bei Infektion bemerkbar machte. Dadurch musste auf eine neue MDCK-Zellreihe umgestellt werden.

Für Viruswachstumskinetiken eignen sich zwei unterschiedliche Methoden. Dies ist einerseits der Plaque Assay und andererseits eine quantitative Real-Time RT PCR.

Da sich bei dem verwendeten H5N1-Stamm keine sicher reproduzierbare Plaquebildung induzieren ließ, wurde das Viruswachstum durch den Nachweis der Virus-RNA mit einer Real-Time RT PCR geführt. Diese wurde so gewählt, dass die spezifischen Primer an konservierte Areale von Influenza A Viren banden, so dass das gleiche PCR Protokoll für H5N1 und H7N7 verwendet werden konnte. Dies bot den Vorteil der besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Durch die Auswertung mittels Real-Time RT PCR ließen sich auch geringe Änderungen des Viruswachstums nachvollziehen, da dies die sensitivste Methode des Virusnachweises ist. Nachteilig ist, dass der Nachweis von RNA keine Aussage über die Infektiosität der Viruspartikel zulässt. Da es sich in den Versuchen allerdings hauptsächlich um Wachstumskinetiken handelte, war dies von eingeschränkter Bedeutung.

In der Viruszellkultur konnte gezeigt werden, dass sich das Wachstum dieses H5N1 Stammes durch die exprimierte Hämagglutinin-domäne bereits bei niedrigen Konzentrationen an zugegebenem Protein hemmen ließ. Wurden die Zellen mit rekombinantem Protein vorbehandelt und die Infektion ohne Protein durchgeführt, erniedrigte sich dadurch initial die Infektionsrate. Dieser Effekt hob sich allerdings nach einiger Zeit wieder auf. Zu erklären ist dies in der Konkurrenz des Proteins mit dem Influenzavirus um die Rezeptoren der Zellen. Dabei wurde die initiale Infektionsrate durch das Protein herabgesetzt. Da dieses im weiteren Verlauf nicht mehr vorhanden war, konnte eine ungestörte Virusreplikation stattfinden.

Der hemmende Effekt von rekombinantem H5 auf H5N1 Virus zeigte sich sehr deutlich bei der permanenten Zugabe von H5 zur Viruszellkultur. Dabei kam es bereits ab einer Proteinkonzentration von 1µg H5 zu einer sehr deutlichen Inhibition des Viruswachstums von H5N1. Für die rezeptorbindende Wirkung scheint die Quartärstruktur des Hämagglutinins somit nur eine eingeschränkte Funktion zu haben. Die hemmende Wirkung trat auch ohne Trimerisierung des Hämagglutinins auf.

Im Vergleich dazu ließ sich die Replikation von H7N7 nicht mit rekombinanten H5 hemmen. Es konnte sowohl durch Präinkubation der Zellen mit H5 als auch durch permanente Anwesenheit von H5 keine Reduktion des Viruswachstums von H7N7 erzielt werden.

Die exprimierte Hämagglutinin-domäne H5 hemmte somit selektiv die Replikation von H5N1, eine Kreuzreaktivität zu anderen Influenza A Viren konnte nicht nachgewiesen werden.

Bei allen Versuchen wurde bei sehr hohen Proteinkonzentrationen eine Abnahme des Viruswachstums beobachtet. Dabei fiel allerdings makroskopisch ein zytotoxischer Effekt

auf, bei dem sich der Zellrasen vom Boden der Kulturschalen ablöste und die Zellen abstarben. Dieser Effekt wurde auch ohne Virus bei Proteinkonzentrationen ab 100 µg auf den verwendeten MDCK Zellen beobachtet. Dies lässt auf eine unspezifische Zelltoxizität durch hohe Konzentrationen an zugegebenem Protein schließen. Möglich ist diese Wirkung auch durch Pufferreste der renaturierenden Proteinaufreinigung. Dies ließ sich in dieser Arbeit nicht abschließend klären.

Zusätzlich wurde eine Wachstumskinetik von H5N1 in Anwesenheit eines anderen rekombinanten Proteins durchgeführt. Dadurch sollte eine generelle Wachstumshemmung bei Zugabe eines beliebigen Proteins ausgeschlossen werden. In diesem Falle wurde ein rekombinanter Spikeproteinanteil des SARS Coronavirus verwendet. Am Tag eins ließ sich kein Effekt auf das Viruswachstum nachweisen. Am Tag zwei nach der Absorption zeigte sich allerdings im höheren Proteinbereich eine geringe Abnahme des Viruswachstums von H5N1. Da initial keine Hemmung des Viruswachstums stattfand, war der Effekt möglicherweise nicht auf eine echte Rezeptorbindung zurück zu führen. Dabei ist zu diskutieren, ob dieser Effekt durch einen zytotoxischen Effekt des Proteins hervorgerufen wird oder ob es sich hierbei um eine echte Hemmung der Virusreplikation handeln könnte. Aufgrund der Versuche mit H7N7, wo kein Effekt durch das rekombinante Protein hervorgerufen werden konnte, ist dies allerdings eher unwahrscheinlich.

Vergleicht man die beiden in der Arbeit benutzten Viren, so ist bei dem verwendeten H5N1 Stamm von einer geringeren Virulenz auszugehen als bei dem verwendeten H7N7 Stamm. Am deutlichsten zeigte sich dies im Plaque-Assay, wo bei H7N7 bis zu einer hohen Verdünnungsstufe auszählbare Plaques nachweisbar waren. Dahingegen ließ sich bereits bei niedriger Verdünnungsstufe des H5N1 Stammes keine Infektiosität mehr nachweisen. Dadurch ist die quantitative Aussage der gefundenen Hemmung eingeschränkt zu werten. Nichtsdestotrotz lassen sich die oben genannten Aussagen über die selektive Hemmung des rekombinanten Proteins benutzen.

Die zugrundeliegende Frage, ob das rekombinant hergestellte Protein eine receptorspezifische Hemmung auf das Virusentry hat, ist abschließend nicht eindeutig zu klären gewesen. Ein Großteil der Ergebnisse deutete aber stark auf eine selektive virusspezifische Hemmung hin. Es kam zu einer starken kompetitiven Hemmung von H5N1 Influenza A durch die Zugabe von exprimiertem H5 Protein. Dabei war ein deutlicher Unterschied zu den Inhibitionsversuchen von H7N7 Influenza A Virus mit H5 festzustellen. Das rekombinante

Protein zeigte dort keine Wirkung auf das Wachstumsverhalten. Diese Ergebnisse wurden zumindest teilweise durch die Testung des Viruswachstums mit SARS-Spikeprotein in Frage gestellt.

Zur Verifizierung der spezifischen Hemmung durch rekombinantes H5 können einerseits weitere Influenza A Subtypen in der Viruszellkultur verwendet werden. Andererseits können weitere Wachstumskinetiken mit H5N1 und Nichtinfluenzaproteinen durchgeführt werden. Des Weiteren sollte die Wirkung von SARS-Spikeprotein auf eine Infektion mit H7N7 untersucht werden.

Die Proteinlokalisierung kann durch eine Immunfluoreszenzmarkierung oder einen V5 Antikörper erfolgen. Dadurch kann geklärt werden ob das Protein nur an den Rezeptor bindet oder ob es auch zu einer intrazellulären Aufnahme kommt.

Zusätzlich kann die globuläre Domäne von H7N7 exprimiert werden und zu Inhibitionsstudien bezüglich des Viruswachstums von H5N1 und H7N7 herangezogen werden. Diese können als Kreuzexperimente zu den in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnissen fungieren.

Die Verwendung von Antiseren gegen H5 und H7 dient dem Nachweis der Spezifität des virusfreien Neutralisationstests. Die Sensitivität eines solchen Testes lässt sich durch den Vergleich der Titerhöhen von Vollvirus und rekombinantem Hämagglutinin bestimmen.

5 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war die Charakterisierung und Expression der rezeptorbindenden Domäne der Influenza A H5N1 Virus sowie der Einsatz als kompetitiver Hemmstoff in der Influenzazellkultur.

Die Charakterisierung erfolgte mit Hilfe von computerbasierten 3 D Rekonstruktionen des Virus. Anhand dieser wurde die Rezeptorstruktur des Hämagglutins HA 5 ermittelt und eine Strategie für das zu exprimierende Protein festgelegt. Nach Klonierung in einen bakteriellen Vektor erfolgte die Proteinexpression durch ein T-7 Promotor gesteuertes *E.coli* System. Nach Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen wurden verschiedene Vektoren verwendet sowie unterschiedliche Aufreinigungsverfahren für Proteine angewendet. Die Schwierigkeit lag dabei an der Bildung von intrazellulären Proteinaggregaten, wodurch sich dieses nicht auf nativem Wege aufreinigen ließ. Im Verlauf wurde eine Zellyse mit Guanidinhydrochlorid mit anschließend renaturierender Proteinaufreinigung als vorteilhafteste Methode ermittelt. Das exprimierte Protein wurde quantifiziert und anhand von Western Blots als antigene Domäne des Hämagglutinins nachgewiesen.

In einem zweiten Teil wurde ein Viruszellkultursystem für aviäre Influenzaviren aufgebaut.

Ziel dessen war die Untersuchung des rekombinant hergestellten Hämagglutinins hinsichtlich einer kompetitiven Hemmung auf die Influenza-Virusreplikation. Zusätzlich wurde die Spezifität der Hemmung auf Influenza-A Subtypen untersucht.

Eine MDCK-Zellkultur und die Standardisierung der Viruszellkultur für die beiden hochpathogenen Influenzaviren H5N1 und H7N7 wurden etabliert. Eine Quantifizierung mittels Plaque-Assay und Real-Time PCR gegen Influenza A Viren wurden angeschlossen.

Eine kompetitive Hemmung des Viruswachstums von H5N1 durch Zugabe von rekombinant hergestelltem H5 konnte gezeigt werden. Dieser Effekt lies sich bereits durch eine Präinkubation mit H5 zeigen, welcher sich allerdings nach einem Tag aufhob. Beließ man rekombinantes H5 im Infektionsmedium, ließ sich das Viruswachstum bereits ab einer Konzentration von 1 µg H5 dauerhaft hemmen. Auf das Viruswachstum von H7N7 hatte die Zugabe von rekombinantem H5 keinen wesentlichen Effekt. Die Inhibition des Viruswachstums des hergestellten H5 Proteins war somit spezifisch für H5N1.

6 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mycroliter
a.d	Aqua dest.
AVL	Viral Lysis Puffer
Bp	Basenpaare
Carb	Carbenicillin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinacid
dNTP	desoxy Nucleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fetales Kälberserum (fetal calf serum)
h	Stunden
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	Molar
MDCK-Zellen	Madin-Darby Canine Kidney Zellen
min	Minute/n
ml	Milliliter
mM	Millimolarl
N ₂	Stickstoff
OD 600	optic density (Wellenlänge 600nm)
PBS	Phosphate buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction
PMSF	Phenylmethylsulfonylfourid
rpm	Rounds per minute
S.O.C	Super optimal broth medium with catabolic repression
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
sec	Sekunde/n
V	Volt
W	Watt

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verbreitung von H5N1 auf der Welt	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines genetischen Reassortment (antigenic shift)	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Influenza A Virus	6
Abbildung 4: 3-D Rekonstruktion des Homotrimeres Hämagglutinin des Influenza A Virus	7
Abbildung 5: Militärnotfallkrankenhaus in Kansas, USA; während der Influenzapandemie 1918/1919	11
Abbildung 6: Zugvögel am See Qianguai, Nordchina	16
Abbildung 7: 3-D Rekonstruktion eines Hämagglutininmonomer von H5	44
Abbildung 8: Ausschnitt aus dem Vektor pET 102/D-TOPO	45
Abbildung 9: Gelelektrophorese zur Detektion des blunt-end PCR Produktes	46
Abbildung 10: Restriktionsverdau von fünf verschiedenen H5 Klonen	47
Abbildung 11: Gelelektrophorese der Plasmid-PCR	47
Abbildung 12: Testexpression der drei Klone H5 in pET 102	49
Abbildung 13: Native Proteinaufreinigung des rekombinanten H5 in pET 102	50
Abbildung 14: Denaturierende Proteinaufreinigung von H5k in pET102	52
Abbildung 15: Western Blot zum Nachweis von H5k in pET 102	53
Abbildung 16: Vektorausschnitt von pET 151/D-TOPO mit der Klonierungsstelle für H5k	54
Abbildung 17: Amplifikation von H5k (1) zur Klonierung in Vektor pET 151	54
Abbildung 18: Klonscreening H5 in pET 151	55
Abbildung 19: Ausschnitt aus der Sequenzanalyse des Klons Nr. 3 von H5 in pET 151	56
Abbildung 20: Testexpression von 3 verschiedenen Klonen H5k in pET 151	56
Abbildung 21: Native Proteinaufreinigung von H5 in pET 151	57
Abbildung 22: Renaturierende Proteinaufreinigung von H5 in pET 151 mit Harnstoff als Lysepuffer	58
Abbildung 23: Renaturierende Proteinaufreinigung von H5 in pET 151 mit GuanidinHCl als Lysepuffer	59
Abbildung 24: Renaturierende Proteinaufreinigung nach Lyse mit GuanidinHCl	60
Abbildung 25: Western Blot zum Nachweis von rekombinanten H5 in pET 151	61
Abbildung 26: Plaque Assay von H5N1	62
Abbildung 27: Viruswachstumskinetik von H5N1	64
Abbildung 28: Standardisierung des Viruswachstums von H5N1	65
Abbildung 29: Wachstumskinetik für H5N1 nach Präinkubation von H5	67
Abbildung 30: Inhibitionsversuch von H5N1 in permanenter Anwesenheit von H5	68
Abbildung 31: Inhibitionsversuch von H5N1 mit niedrigen Konzentrationen von H5.	70
Abbildung 32: Wachstumskinetik von H5N1 mit rekombinant hergestelltem SARS-Spikeprotein	72
Abbildung 33: Plaqueassay H7N7	73
Abbildung 34: Wachstumskinetik von H7N7	74
Abbildung 35: Wachstumskinetik von H7N7 nach Präinkubation mit H5	75
Abbildung 36: Inhibitionsversuch von H7N7 in permanenter Anwesenheit von H5	77

8 Literaturverzeichnis

1. The Writing Committee of the World Health Organization (WHO) Consultation on Avian Influenza A/H5: **Avian Influenza A (H5N1) Infection in Humans** *N Engl J Med* **2005**, 353:1374-1385.
2. De Jong JC, Claas EC, Osterhaus AD, Webster RG, Lim WL: **A pandemic warning?** *Nature* **1997**, 389: 554.
3. WHO: **Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO** (19.11.2010)
http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2010_11_19/en/index.html.
4. WHO **H5N1 Avian Influenza Timeline** (20.10.2010)
http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/2010_10_20_h5n1_avian_influenza_timeline_updates.pdf.
5. Robert-Koch-Institut (RKI): **Merkblätter für Ärzte: Influenza.**
http://www.rki.de/cln_169/nn_200120/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber__Mbl__Influenza.html (November 2010)
6. Wright P.F, Webster RG: **Orthomyxoviruses** (Kap 47) In Fields Virology (Hrg) Lippincott Williams&Wilkins: Philadelphia 2001.
7. Fraser C: **Factors that make an infectious disease outbreak controllable** *Proc Natl Acad Sci USA* **2004**, 101:6146-6151.
8. Drosten C, Guenther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, Rabenau H, Panning M, Kolesnikova L, Fouchier R, Berger A, Burguiere AM, Cinatl J, Eickmann M, Escriou N, Grywna K, Kramme S, Manuguerra JC, Muller S, Rickerts V, Sturmer M, Vieth S, Klenk HD, Osterhaus AD; Schmitz H, Doerr HW: **Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome** *N Engl J Med* **2003**, 348:1967-1976.
9. Tashiro M, Ciborowski P, Reinacher M, Pulverer G, Klenk HD, Rott R: **Synergistic role of staphylococcal proteases in the induction of influenza virus pathogenicity** *Virology* **1987**, 157:421-430.
10. Tashiro M, Ciborowski P, Klenk HD, Pulverer G, Rott R: **Role of Staphylococcus protease in the development of influenza pneumonia** *Nature* **1987**, 325:536-537.
11. Starko KM, Ray CG, Dominguez LB, Stromberg WL, Woodall DF: **Reye's syndrome and salicylate use** *Pediatrics* **1980**, 66:859-864.

12. Moscona A: **Neuraminidase inhibitors for influenza** *N Engl J Med* **2005**, 353: 1363-1373.
13. Uprasertkul M, Puthavathana P, Sangsiriwut K, Pooruk P, Srisook K, Peiris M, Nicolls JM et al: **Influenza A H5N1 replication sites in humans** *Emerg Infect Dis* **2005**, 11:1036-1041.
14. Wong SS, Yuen KY: **Avian influenza virus infections in humans** *Chest* **2006**, 129:156-168.
15. Tran TH, Nguyen TL, Nguyen TD, Luong TS, Pham PM, Nguyen VC, Pham TS, Vo CD, Le TQ, Ngo TT, Dao BK, Lee PP, Nguyen TT, Hoang TL, Cao VT, Le TG, Nguyen DT: **Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam.** *N Engl J Med* **2004**, 350:1179-88.
16. Yu H, Gao Z, Feng Z, Shu Y, Xiang N, Zhou L, Huai Y, Feng L, Peng Z, Li Z, Xu C, Li Z, Xu C, Li J, Hu C, Li Q, Xu X, Lui X, Lui Z, Xu L, Chen Y, Luo H, Wei L, Zhang X, Xin J, Guo J, Wang Q et al: **Clinical characteristics of 26 human cases of highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus infection in China** *PLoS One* **2008**, 3:e2985.
17. Gambotto A, Barratt-Boyes SM, de Jong MD, Neumann G, Kawaoka Y: **Human infection with highly pathogenic H5N1 influenza virus** *Lancet* **2008**, 371:1464-1475.
18. Writing Committee of the Second World Health Organization Consultation on Clinical Aspects of Human Infection with Avian Influenza A (H5N1) Virus: **Update on Avian Influenza A (H5N1) Virus Infection in Humans** *N Engl J Med* **2008**, 358:261-273.
19. Hahn F, Kaufmann, Ullmann: **Orthomyxoviren.** In: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. **2004**, Springer-Verlag:535-543.
20. Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus AD: **Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls** *J Virol* **2005**, 79:2814-2822.
21. Acherson NH: **Orthomyxoviruses.** In: Fundamentals of molecular Virology (Hrg.) Wiley&Sons **2006**:248-260.
22. Lamb RA., Krug RM: **Orthomyxoviridae (Kap 46)** In Fields Virology (Hrg) Lippincott Williams&Wilkins: Philadelphia 2001.
23. Steinhauer DA: **Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus** *Virology* **1999**, 258:1-20.

24. Senne DA, Panigrahy B, Kawaoka Y, Pearson JE, Suss J, Lipkind M, Kida H, Webster RG: **Survey of the hemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential** *Avian Dis* **1996**, 40:425-437.
25. Stevens J, Blixt O, Tumpey TM, Taubenberger JK, Paulson JC, Wilson IA: **Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus** *Science* **2006**, 312:404-410.
26. Skehel JJ, Wiley DC: **Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin** *Annu Rev Biochem* **2000**, 69:531-569.
27. Horimoto T, Kawaoka Y: **Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents** *Nat Rev Microbiol* **2005**, 3:591-600.
28. Rogers GN, D'Souza BL: **Receptor binding properties of human and animal H1 influenza virus isolates** *Virology* **1989**, 173:317-322.
29. Ito T, Courceiro JN, Kelm S, Baum LG, Krauss S, Castrucci MR, Donatelli I, Kida H, Paulson JC, Webster RG, Kawaoka: **Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential** *J Virol* **1998**, 72:7367-7373.
30. Russell RJ, Stevens DJ, Haire LF, Gamblin SJ, Skehel JJ: **Avian and human receptor binding by hemagglutinins of influenza A viruses** *Glycoconj J* **2006**, 23:85-92.
31. Yang ZY, Wei CJ, Kong WP, Wu L, Xu L, Smith DF, Nabel GJ: **Immunization by avian H5 influenza hemagglutinin mutants with altered receptor binding specificity** *Science* **2007**, 317:825-828.
32. World Health Organization (WHO): **Recommendations for influenza vaccines** <http://www.who.int/csr/disease/influenza/vaccinerecommendations/en/index.html> jährlich, letzter Stand 2011.
33. WHO: **Recommendations and laboratory procedures for detection of avian influenza A(H5N1) virus in specimens from suspected human cases** http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/labtests/en/index.html (August 2007):1-28.
34. OIE (World Organization for Animal Health): **OIE Terrestrial Manual 2008**, Chapter 2.3.4. Avian Influenza **2008**: 465-481.
35. WHO: **WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance**. WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5 Rev. 1 **2005**:1- 99.
36. Petric M, Comanor L, Petti CA, **Role of the laboratory in diagnosis of influenza during seasonal epidemics and potential pandemics** *J Infect Dis* **2006**, 194 Suppl

- 2:S98-110.
37. Martin PM, Martin-Granel E: **2,500-year evolution of the term epidemic** *Emerg Infect Dis* **2006**, 12:976-980.
 38. Kilbourne ED: **Influenza Pandemics of the 20th Century** *Emerg Infect Dis* **2006**, 12:9-14.
 39. Taubenberger JK, Morens DM: **1918 Influenza: the mother of all pandemics** *Emerg Infect Dis* **2006**, 12:15-22.
 40. Taubenberger JK, Reid AH, Krafft AE, Bijwaard KE, Fanning TG: **Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus** *Science* **1997**, 275:1793-1796.
 41. Russell CJ, Webster RG: **The genesis of a pandemic influenza virus** *Cell* **2005** 123:368-371.
 42. Gamblin SJ, Haire LF, Russell RJ, Stevens DJ, Xiao B, Ha Y, Vasisht N, Steinhauer DA, Daniels RS, Elliot A, Wiley DC, Skehel JJ: **The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin** *Science* **2004**, 303:1838-1842.
 43. Schulman JL, Kilbourne ED: **Independent variation in nature of hemagglutinin and neuraminidase antigens of influenza virus: distinctiveness of hemagglutinin antigen of Hong Kong-68 virus** *Proc Natl Acad Sci U S A* **1969**, 63:326-333.
 44. Kawaoka Y, Krauss, Webster RG: **Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics** *J Virol* **1989**, 63:4603-4608.
 45. Bautista E, Chotpitayasunondh T, Gao Z, Harper SA, Shaw M, Uyeki TM, Zaki SR, Hayden FG, Hui DS, Kettner JD, Kumar A, Lim M, Shindo N, Penn C, Nicholson KG: **Clinical aspects of pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus infection** *N Engl J Med* **2010**, 362:1708-1719.
 46. Neumann G, Noda T, Kawaoka Y: **Emergence and pandemic potential of swine origin H1N1 influenza virus** *Nature* **2009**, 459:931-939.
 47. Wilson N, Baker MG: **The emerging influenza pandemic: estimating the case fatality ratio** *Euro Surveill* **2009**, 14(26).
 48. Fraser C, Donnelly CA, Chauchemez S, Hanage WP, Van Kerkhove MD, Hollingsworth TD, Griffin J, Baggaley RF, Jenkins HE, Lyons EJ, Jombart T, Hinsley WR, Grassly NC, Balloux F, Ghani AC, Ferguson NM, Rambaut A, Pybus OG, Lopez-Gatell H, Alpuche-Aranda CM, Chapeli IP, Zavala EP, Guevara DM, Checchi F, Garcia E, Huguenot S, Roth S: **Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early findings** *Science* **2009**, 324:1557-1561.

49. World Health Organization (WHO): **H1N1 in post-pandemic period**
http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2010/h1n1_vpc_20100810/en/index.html (10-08-2010).
50. Capua I, Alexander DJ: **Avian influenza: recent developments** *Avian Pathol* **2004**, 33:393-404.
51. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y: **Evolution and ecology of influenza A viruses** *Microbiol Rev* **1992**, 56:152-179.
52. Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, Waldenstrom J, Osterhaus AD, Fouchier RA: **Global patterns of influenza a virus in wild birds** *Science* **2006**, 312:384-388.
53. Clark LH, Jeffrey: **Avian Influenza in Wild Birds: Status as Reservoir, and Risks to Humans and Agriculture, in Current Topics in Avian Disease Research (2006)** *American Ornithologists Union*, Hrg: R.K. Barraclough,3-29.
54. Lin YP, Shaw M, Gregory V, Cameron K, Lim W, Klimov A, Subbarao K, Guan Y, Krauss S, Shortridge K, Webster R, Cox N, Hay A: **Avian-to-human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses: relationship between H9N2 and H5N1 human isolates** *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, 97:9654-9658.
55. Fouchier RA, Schneeberger PM, Rozendaal FW, Broekman JM, Kemink SA, Munster V, Kuiken T, Rimmelzwaan GF, Schutten M, Van Doornum GJ, Koch G, Bosman A, Koopmans M, Osterhaus AD: **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* **2004**, 101:1356-1361.
56. Chen H, Deng G, Li Z, Tian G, Li Y, Jiao P, Zhang L, Liu Z, Webster RG, Yu K: **The evolution of H5N1 influenza viruses in ducks in southern China** *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, 101:10452-10457.
57. Li KS, Guan Y, Wang J, Smith GJ, Xu KM, Duan L, Rahardjo AP, Puthavathana P, Buranathai C, Nyuyen TD, Estoepangestie AT, Chaisingh A, Auewarakul P, Long HT, Hanh NT, Webby RJ, Poon LL, Chen H, Shortridge KF, Yuen KY, Webster RG, Peiris JS: **Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia** *Nature* **2004**, 430:209-213.
58. Sims LD, Ellis TM, Liu KK, Dyrting K, Wong H, Peiris M, Guan Y, Shortridge KF: **Avian influenza in Hong Kong 1997-2002.** *Avian Dis* **2003**, 47:832-838.
59. Keawcharoen J, Oraveerakul K, Kuiken T, Fouchier RA, Amonsin A, Payungporn S, Noppornpanth S, Wattanodorn S et al: **Avian influenza H5N1 in tigers and leopards** *Emerg Infect Dis* **2004**, 10:2189-2191.

60. Kuiken T, Rimmelzwaan G, van Riel D, van Amerongen G, Baars M, Fouchier RA, Osterhaus AD: **Avian H5N1 influenza in cats** *Science* **2004**, 306:241.
61. Liu J, Xiao H, Lei F, Zhu Q, Qin K, Zhang XW, Zhang XL, Zhao D, Wang G, Feng Y, Ma J, Liu W, Wang J, Gao GF: **Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds** *Science* **2005**, 309:1206.
62. Chen H, Smith GJ, Zhang SY, Qin K, Wang J, Li KS, Webster RG, Peiris JS, Guan Y: **Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl** *Nature* **2005**, 436:191-192.
63. Claas EC, Osterhaus AD, van Beek R, deJong JC, Rimmelzwaan GF, Senne DA, Kraus S, Shortridge KF, Webster RG: **Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus** *Lancet* **1998**, 351:472-477.
64. de Jong MD, Bach VC, Phan TQ, Vo MH, Tran TT, Nguyen BH, Beld M, Le TP, Troung HK, Nguyen VV, Tran TH, Do QH, Farrar J: **Fatal avian influenza A (H5N1) in a child presenting with diarrhea followed by coma** *N Engl J Med* **2005**, 352:686-691.
65. Hawkins TL, O'Connor-Morin T, Roy A, Sanntillan C: **DNA purification and isolation using a solid-phase** *Nucleic Acids Res* **1994**, 22:4543-4544.
66. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors** *Proc Natl Acad Sci U S A* **1977**, 74:5463-5467.
67. Bradford MM: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding** *Anal Biochem* **1976**, 72:248-254.
68. Appleyard G, Maber HB: **Plaque formation by influenza viruses in the presence of trypsin** *J Gen Virol* **1974**, 25:351-357.
69. Gauth CR, Smith TF: **Replication and plaque assay of influenza virus in an established line of canine kidney cells** *Appl Microbiol* **1968**, 16:588-594.
70. LaVallie ER, DiBlasio EA, Kovacic S, Grant KL, Schendel PF, McCoy JM: **A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the E. coli cytoplasm** *Biotechnology (N Y)* **1993** 11:187-193.
71. Marston FA: **The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in Escherichia coli** *Biochem J* **1986**, 240:1-12.
72. Palmer I, Wingfield PT: **Preparation and extraction of insoluble (inclusion-body) proteins from Escherichia coli** *Curr Protoc Protein Sci* **2004**, Chapter 6:6 3.
73. Shen S, Mahadevappa G, Oh HL, Wee BY, Choi YW, Hwang LA, Lim SG, Hong W,

- Lal SK, Tan JY: **Comparing the antibody responses against recombinant hemagglutinin proteins of avian influenza A (H5N1) virus expressed in insect cells and bacteria** *J Med Virol* **2008**, 80:1972-1983.
74. Chiu FF, Venkatesan N, Wu CR, Chou AH, Chen HW, Lian SP, Liu SJ, Huang CC, Lian WC, Chong P, Leng CH: **Immunological study of HA1 domain of hemagglutinin of influenza H5N1 virus** *Biochem Biophys Res Commun* **2009**, 383:27-31.
75. Khurana S, Verma S, Verma N, Crevar CJ, Carter DM, Manischewitz J, King LR, Ross TM, Golding H: **Properly folded bacterially expressed H1N1 hemagglutinin globular head and ectodomain vaccines protect ferrets against H1N1 pandemic influenza virus** *PLoS One* **2010**, 5:e11548.
76. Wang CC, Chen JR, Tseng YC, Hsu CH, Hung YF, Chen SW, Chen CM, Khoo KH, Cheng TJ, Cheng YS, Jan JT, Wu CY, Ma C, Wong CH: **Glycans on influenza hemagglutinin affect receptor binding and immune response** *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, 106:18137-18142.
77. Schwarzer J, Rapp E, Hennig R, Genzel Y, Jordan I, Sandig V, Reichl U: **Glycan analysis in cell culture-based influenza vaccine production: influence of host cell line and virus strain on the glycosylation pattern of viral hemagglutinin** *Vaccine* **2009**, 27:4325-4336.

9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Horstmann sowie Herrn Prof. Dr. Fleischer danke ich für die Möglichkeit am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin zu promovieren.

Herrn Prof. Dr. Fleischer danke ich insbesondere für die Bereitschaft die Arbeit als Doktorvater zu betreuen.

Bei Herrn Prof. Dr. Christian Drost bedanke ich mich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, mich in die virologische Molekularbiologie einarbeiten zu können, sowie Rat, Tat und Geduld bei der Entstehung der Arbeit.

Dr. Baumgarte des Hygieneinstituts Hamburg und S.Linke aus dem RKI danke ich für die Beantwortung von Fragen zur Zellkulturarbeit mit Influenzaviren.

Dr. R. Fouchier des Erasmus Medical Centre, Rotterdam danke ich für die Überlassung des verwendeten Hämagglutinins von H5N1.

Besonderer Dank gilt den Kollegen der Virologie, die mich freundlich aufgenommen haben und mich während der Entstehung der Arbeit begleitet und unterstützt haben. Insbesondere bedanke ich mich bei Susanne, Petra, Klaus, Markus, Marcel, Evelyn und Britta für Unterstützung und Hilfestellung bei der vielfältigen Laborarbeit und darüber hinaus vieles mehr. Danke auch an Florian für den letzten Motivationsschub.

Allen Voran gilt mein Dank meinen Eltern, dafür dass ihr mir den Weg ermöglicht habt, den ich gegangen bin, sowie meiner Wahlfamilie, dafür, dass es euch gibt.

10 Lebenslauf

Name Brit Häcker

Geboren am 14.07.1979
in Chemnitz (Karl-Marx-Stadt), Deutschland

Beruflicher Werdegang

seit 07.2009 Assistenzärztin in der Zentralen Notaufnahme
Asklepiosklinik Wandsbek, Hamburg

2008-2009 Nachwuchsförderprogramm des DED in Mtwara, Tanzania

Studium

2000-2008 Medizinstudium Universität Hamburg
Abschlussnote 2,0

Praktisches Jahr

Rechtsmedizin UKE Hamburg

Chirurgie Asklepiosklinik Harburg, Hamburg

Innere Medizin NUS, Singapur
Schön-Klinik Eilbek, Hamburg

Schulbildung

1986-1990 Ernst-Thälmann Schule Herold

1990-1992 Polytechnische Oberschule Herold

1992-1996 Greifensteingymnasium Thum

1997-2000 Emil-Krause-Gymnasium Hamburg, Abschluss: Abitur

Hamburg, den 15.02.11

Brit Häcker

11 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion bemüht habe.

Brit Häcker

12 Verwendete Virusgenomsequenz Hämagglutinin 5

pRT 611 Vietnam (A/Viet Nam/1194/2004(H5N1)) Plasmidanteil gekürzt

ctagcagttaaccggagtactggtcgacctccgaagttgggggggAGCAAAAGCAGGGGTTCATCTGTCAAAATGGAGAAAATAGTGCTTCTTTTTGCAATAGTCAGTCTTGTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTACCATGCAAACAACCTCGACAGAGCAGGTTGACACAATAATGGAAAAGAACGTTACTGTTACACATGCCCAAGACATACTGGAAAAGACACACAATGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTGAGAGATTGTAGTGTAGCTGGATGGCTCTCGGAAACCCAATGTGTGACGAATTCATCAATGTGCCGGAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAGTCAATGACCTCTGTTACCCAGGGGATTTCAATGACTATGAAGAATTGAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCATTTTGAGAAAATTCAGATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCAGTCATGAAGCCTCATTGGGGGTGAGCTCAGCATGTCCATACCAGGGGAAAGTCCTCCTTTTTCAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAACAGTACATACCCACAATAAAGAGGAGCTACAATAATACCAACCAAGAAGATCTTTTGGTACTGTGGGGGATTACCCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAAAAGCTCTATCAAAACCCAACCACCTATATTTCCGTTGGGACATCAACACTAAACAGAGATTGGTACCAAGAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAAGTGAAGGATGGAGTTCTTCTGGACAATTTTAAAACCGAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTAATGGAAATTTCAATTGCTCCAGAATATGCATACA AATTGTCAAGAAAGGGGACTCAACAATTATGAAAAGTGAATTGGAATATGGTAACTGCAACACCAAGTGTCAAACCTCCAATGGGGGCGATAAACTCTAGCATGCCATTCCACAATATACACCCTCTACCATCGGGGAATGCCCAAATATGTGAAATCAAACAGATTAGTCCTTGCAGACTGGGCTCAGAAATAGCCCTCAAAGAGAGAGAAGAAGAAAAAGAGAGGATTATTTGGAGCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACCACCATAGCAACGAGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCA GACAAAGAATCCACTCAAAGGCAATAGATGGAGTCACCAATAAGGTC AACTCGATTATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAATTTAACAACCTTAGAAAGGAGAATAGAGAATTTAAACAAGAAGATGGAAGACGGGTTCTTAGATGTCTGGACTTATAATGCTGAACTTCTAGTTCTCATGGAAAACGAGAGAACTCTAGACTTTCATGACTCAAATGTCAAGAACCTTTACGACAAGGTCCGACTACAGCTTAGGGATAATGCAAAGGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCATAAATGTGATAATGAATGTA TGGAAAGTGTAAGAAACGGAACGTATGACTACCCGCAGTATTCAGAAG AAGCAAGACTAAAAAGAGAGGAAATAAGTGGAGTAAAATTGGAATCAATAGGAATTTACCAAATATTGTCAATTTATTCTACAGTGGCGAGCTCCCTAGCACTGGCAATCATGGTAGCTGGTCTATCCTTATGGATGTGCTCCAA TGGGTGCTTACAATGCAGAATTTGCATTTAAATTTGTGAGTTCAGATTGTAGTTAAAAACACCCTTGTTTCTACTaataaccggcgcccaaatgcc