

Korrigierte Fassung

Untersuchungen zur Pathogenese und Transmission eines
frettchenadaptierten H7N7 Influenza A Virus

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

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

vorgelegt von

Carola Christiane Catharina Dreier

aus Ulm

Hamburg, 2016

Alle Versuche und Auswertungen der vorliegenden Arbeit wurden im Zeitraum von September 2012 bis Dezember 2016 am Heinrich-Pette-Institut, Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie (Direktor: Prof. Dr. Thomas Dobner, Fachbereich Biologie der Universität Hamburg) unter Betreuung von Prof. Dr. Gülşah Gabriel durchgeführt.

Angenommen vom Fachbereich Biologie der Universität Hamburg am: 13.02.2017

Erstgutachterin: Prof. Dr. Gülşah Gabriel

Zweitgutachterin: Dr. Annika Herwig

Tag der mündlichen Prüfung am: 24.02.2017

Mitglieder der Prüfungskommission: Prof. Dr. Jörg Ganzhorn

Prof. Dr. Julia Kehr

Prof. Dr. Gülşah Gabriel

Dr. Annika Herwig

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Influenza A Viren	1
1.1.1. Taxonomie von Influenza A Viren	1
1.1.2. Virionstruktur	2
1.1.3. Aufbau des viralen Genoms	2
1.1.4. Rezeptorspezifität von Influenza A Viren	5
1.1.5. Replikationszyklus von Influenza A Viren.....	6
1.1.5.1. Adsorption und rezeptorvermittelte Endozytose	7
1.1.5.2. Entpacken des Virus und Kernimport der vRNP Komplexe	8
1.1.5.3. Transkription und Replikation des viralen Genoms.....	9
1.1.5.4. Zusammensetzung des Virus und Abknospung neugebildeter Viruspartikel	11
1.1.6. Wirtsspektrum und Evolution von Influenza A Viren	12
1.1.7. Hoch- und niedrigpathogene Influenzaviren.....	14
1.1.8. Aviäre Influenzaviren im Menschen	16
1.1.9. Epidemiologie der Influenzaviren im Menschen.....	17
1.1.9.1. Influenza A Virus Epidemien	17
1.1.9.2. Influenza A Virus Pandemien	18
1.1.9.2.1. Die Pandemie von 1918 – Die Spanische Grippe (H1N1)	18
1.1.9.2.2. Die Influenzavirus Pandemie im Jahr 1957 – Die Asiatische Grippe (H2N2)	19
1.1.9.2.3. Die Influenzavirus Pandemie im Jahr 1968 – Die Hong Kong Grippe (H3N2).....	19
1.1.9.2.4. Die Influenzavirus Pandemie im Jahr 2009 – Die Schweinegrippe/Neue Grippe (H1N1)	19
1.1.9.3. Das Influenza A Virus – Eine Zoonose.....	20
1.1.10. Pathogenese im Menschen.....	21
1.1.11. Prävention und Therapie von Influenza A Virusinfektionen	23
1.1.12. Adaptive Mutationen und virale Pathogenitätsdeterminanten in Säugetieren	24
1.1.12.1. Das Hämagglutinin des Influenza A Virus	25
1.1.12.2. Die Polymerase des Influenza A Virus	27
1.1.12.3. Die Neuraminidase des Influenza A Virus.....	28
1.2. Tiermodelle in der Influenza A Virus Forschung	28
1.2.1. Das Mausmodell.....	29
1.2.2. Das Meerschweinchenmodell.....	30
1.2.3. Das Frettchenmodell	31
1.3. Das SC35 Virus und seine frettchenadaptierte Variante SC35F – Ein Modellsystem zur Untersuchung der Mensch-zu-Mensch Transmission.....	32
1.4. Zielsetzung der Arbeit.....	34
2. Material	36
2.1. Chemikalien	36
2.2. Desinfektionsmittel	37
2.3. Puffer und Lösungen	37
2.4. Kits.....	38
2.5. Enzyme und Zusätze	39
2.6. Materialien für eukaryotische Zellkulturmedien	39

Inhaltsverzeichnis

2.7. Eukaryotische Zellkulturmedien	40
2.8. Materialien für prokaryotische Zellkulturmedien.....	40
2.9. Prokaryotische Zellkulturmedien	41
2.10. Primer	41
2.10.1. Sequenzierungs- und Genotypisierungsprimer	41
2.10.2. Primer für die zielgerichtete Mutagenese	43
2.11. Plasmide	43
2.12. Virusstämme.....	44
2.13. Antikörper und Seren.....	45
2.14. Pro- und Eukaryotische Zellen	45
2.15. Geräte und Werkzeug	45
2.16. Verbrauchsmaterialien.....	47
2.17. Programme	48
2.18. Schutzausrüstung.....	48
2.19. Zubehör für Tiere.....	49
2.20. Tiere und tierische Produkte	49
2.20.1. Blut.....	49
2.20.2 Embryonierte Hühnereier	50
2.20.3 Tiere.....	50
2.21. Analgetika und Zusätze	50
3. Methoden.....	51
3.1. Molekularbiologische Methoden.....	51
3.1.1. Isolierung viraler RNA.....	51
3.1.2. Entwurf von Primern zur Sequenzierung und zur zielgerichteten Mutagenese	51
3.1.3. Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion.....	51
3.1.4. DNA-Gelelektrophorese	53
3.1.5. Zielgerichtete Mutagenese mittels PCR	54
3.2. Mikrobiologische Methoden.....	55
3.2.1. Transformation von Plasmiden in kompetente <i>E. coli</i> Bakterien.....	55
3.2.2. Plasmid-DNA Amplifikation in <i>E.coli</i> Bakterien.....	55
3.2.3. Plasmid-DNA-Präparation	56
3.2.4. Restriktion von Plasmid-DNA	56
3.3. Zellkulturmethoden	56
3.3.1. Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen.....	56
3.3.2. Kultivierung eukaryotischer Zellen nach Kryokonservierung	57
3.3.3. Transfektion von Zellen	57
3.4. Biochemische Methoden	58
3.4.1. Dualer Luciferase Test	58
3.5. Virologische Methoden	59
3.5.1. Reverse Genetik.....	59
3.5.2. Aufreinigung von Virus mittels Plaquesisolierung	60
3.5.3. Virusanzucht.....	61
3.5.3.1. Virusanzucht im embryonierten Hühnerei	61

Inhaltsverzeichnis

3.5.3.2. Virusanzucht in eukaryotischen Zellen	62
3.5.4. Virustiterbestimmung von Virusstocks oder Organhomogenisat Proben aus Tieren mittels Plaquetest	63
3.5.5. Gewinnung von Erythrozyten aus Hühner- und Putenvollblut.....	63
3.5.6. Bestimmung der hämagglutinierenden Einheiten einer virushaltigen Probe mittels HA Test.....	64
3.5.7. Genotypisierung der generierten Viren	65
3.5.8. Untersuchung der Bindespezifität von Viren	65
3.5.9. Neuraminidaseaktivitäts Tests.....	66
3.5.9.1. Erythrozyten Elutions Test.....	66
3.5.9.2. 4-MUNANA Test.....	66
3.6. Tierversuche.....	67
3.6.1. <i>In vivo</i> Versuche in Mäusen zur Bestimmung der Virulenz und Pathogenität von H7N7 HPAIV	67
3.6.1.1. Narkotisierung von Mäusen.....	67
3.6.1.2. Euthanasie von Mäusen	67
3.6.1.3. Intrasale Infektion von Mäusen	68
3.6.1.4. Kontrolle des Gewichtsverlustes und des Überlebens der Mäuse mit MLD ₅₀ Bestimmung.....	68
3.6.1.5. Blut- und Organentnahmen	68
3.6.1.6. Homogenisierung von Organen mit Glaskügelchen.....	69
3.6.2. <i>In vivo</i> Versuche in Meerschweinchen zur Untersuchung der Intraspezietransmission von H7N7 HPAIV	69
3.6.2.1. Narkotisierung von Meerschweinchen	69
3.6.2.2. Euthanasie von Meerschweinchen.....	70
3.6.2.3. Intrasale Infektion von Meerschweinchen	70
3.6.2.4. Versuche zur Virus-Intraspezietransmission im Meerschweinchen	71
3.6.2.4.1. Untersuchung der Aerogentransmission	71
3.6.2.4.2. Untersuchung der Transmission über direkten Kontakt	71
3.6.2.5. Nasenspülungen.....	73
3.6.2.6. Blut- und Organentnahme	73
3.6.2.7. Homogenisierung von Meerschweinchenorganen	74
3.7. Histologie.....	74
3.7.3. Aufbereitung der Proben für Histologie	74
3.8.2. Hämatoxylin-Eosin Färbung	75
3.8.3. Immunhistochemische Färbung von FFPE-Gewebeschnitten (IHC-P).....	76
4. Ergebnisse.....	78
4.1. <i>In vitro</i> Charakterisierung der SC35F-spezifischen Mutationen.....	78
4.1.1. Detektion von SC35F-spezifischen Mutationen auf Nukleotid- und Aminosäuresequenzebene im Vergleich zum parentalen Virus SC35.....	78
4.1.2. Vergleich von SC35, SC35F und der mausadaptierten Variante SC35M.....	79
4.1.3. Generierung rekombinanter SC35F Viren im SC35 Hintergrund	80
4.1.4. Untersuchungen der Polymeraseaktivität der SC35F Mutationen im PB1 und PB2 Protein	82
4.1.5. Charakterisierung der SC35F NA Mutation.....	84

Inhaltsverzeichnis

4.1.5.1. Untersuchung der Auswirkung der NA _{328S} Mutation auf die Neuraminidaseaktivität mittels Erythrozytenelution	84
4.1.5.2. Untersuchung der Mutation NA _{328S} auf die Neuraminidaseaktivität mittels 4-MUNANA Test.....	85
4.1.6. Untersuchungen der Mutationen der SC35F-spezifischen Mutationen im HA.....	86
4.1.6.1. <i>In silico</i> Untersuchung der SC35F-spezifischen Mutation im HA auf Strukturebene des Proteins.....	87
4.1.6.2. Untersuchung der Bindspezifität der SC35F-spezifischen Mutation im HA	88
4.2. Einfluß der SC35F-spezifischen Mutationen auf die Pathogenität und den Organtropismus im Mausmodell.....	91
4.1.7. Untersuchung von Gewichtsverlust und Überleben nach Infektion mit SC35 und SC35F rekombinanten Viren	91
4.1.8. MLD ₅₀ von SC35 und SC35F rekombinanten Viren	95
4.2.2. Organtropismus der SC35 und SC35F rekombinanten Viren	97
4.2.3. Untersuchung des Zelltropismus im murinen Respirationstrakts mittels Immunohistologie.....	101
4.3. Einfluß der SC35F-spezifischen Mutationen auf die Transmission im Meerschweinchenmodell	105
4.3.1. Transmission von SC35 und SC35F rekombinanten Viren im Meerschweinchen.....	106
4.3.1.1. Transmission der Einzelgenreassortanten und des WT SC35 Virus im Meerschweinchen.....	106
4.3.1.2. Transmission der Einzelpunktmutanten und des SC35F-HA _{monobasisch} Virus im Meerschweinchen.....	111
4.3.2. Untersuchungen der Viruslast in Homogenisaten der Trachea und Lunge von Meerschweinchen infiziert mit SC35 und SC35F rekombinanten Viren.....	114
5. Diskussion	116
5.1. Charakterisierung der rekombinanten SC35 und SC35F Viren	116
5.2. PB2 _{H357N} führt zur erhöhten Polymeraseaktivität in humanen Zellen.....	117
5.3. Die SC35F-spezifische NA _{A328S} Mutation beeinflusst nicht die Neuraminidaseaktivität	118
5.4. Die SC35F-spezifischen HA Mutationen beeinflussen nicht die Rezeptorbindung.....	119
5.5. Die SC35F-spezifischen HA Mutationen erhöhen die Pathogenität im Mausmodell	121
5.6. Die SC35F-spezifischen HA Mutationen erhöhen die viralen Titer in den Lungen infizierter BALB/c Mäuse	122
5.7. Die SC35F-spezifischen Mutationen in PB2 und HA tragen zu einer systemischen Infektion im Mausmodell bei.....	124
5.8. Infektion mit SC35 und SC35F rekombinanten Viren resultiert in einer erhöhten Lungeninfiltration durch Immunzellen.....	124
5.9. Erhöhte Kontakttransmission im Meerschweinchen durch SC35F-spezifische Mutationen PB1 _{L13P} und HA _{I111T/A146S/G340R}	125
5.10. SC35 und SC35F rekombinanten Viren replizieren präferenziell im oberen Respirationstrakt des Meerschweinchens.....	127
6. Zusammenfassung	129
7. Summary	131
8. Literaturverzeichnis	133
9. Verzeichnisse der Abbildungen und Tabellen	144
9.1. Abbildungsverzeichnis.....	144
9.2. Tabellenverzeichnis.....	145

Inhaltsverzeichnis

10. Abkürzungsverzeichnis.....	146
11. Veröffentlichungen, Vorträge und Posterpräsentationen	150
Veröffentlichungen.....	150
Weitere Veröffentlichungen während der Dissertation:	150
Vorträge auf Fachtagungen und Institutsseminaren	151
Posterpräsentationen	152
12. Eidesstattliche Versicherung	154
Wissenschaftlicher Werdegang	155
Stipendien.....	156
Danksagung.....	157

1. Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene, rekombinante, hochpathogene aviäre Influenza A Viren (IAV) *in vitro*, sowie *in vivo*, in der Maus und im Meerschweinchen hinsichtlich ihrer molekularen Charakteristika, ihrer Pathogenität und ihrer Transmissibilität im Säuger untersucht. In diesem Kapitel werden die Biologie der IAV, ihr Wirtsspektrum, die Epidemiologie sowie geeignete Tiermodelle zur Untersuchung der IAV Pathogenese vorgestellt.

1.1. Influenza A Viren

1.1.1. Taxonomie von Influenza A Viren

IAV gehören phylogenetisch zur Familie der *Orthomyxoviridae* und besitzen ein einzelsträngiges, negativ orientiertes und segmentiertes RNA Genom. Zu der Familie der *Orthomyxoviridae* gehören außerdem sechs weitere Genera, welche die Influenza B Viren, Influenza C Viren, Influenza D Viren, Thogotoviren, Quarjaviren und Isaviren umfassen (1, 2). In der vorliegenden Arbeit wird jedoch nur auf die IAV im Detail eingegangen.

IAV werden aufgrund molekularbiologischer sowie serologischer Charakteristika des Nukleoproteins (NP), des Matrixproteins 1 (M1) und des Matrixproteins 2 (M2) unterteilt. Durch die Oberflächenproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA), welche sich hinsichtlich ihrer antigenen Eigenschaften stark unterscheiden, werden IAV in weitere Subtypen klassifiziert. Bis heute sind 18 HA (H1-18) und 11 NA Subtypen (N1-11) identifiziert worden, wobei H17 und H18, sowie N10 und N11 bisher nur mittels Sequenzierung in Fledermausproben detektiert wurden (3-5). Allerdings konnte das komplette Virus aus Fledermäusen bislang nicht isoliert werden. Bisher konnten alle HA und NA Subtypen (außer H17N10 und H18N11) aus wildlebenden Wasservögeln isoliert werden, weshalb davon ausgegangen wird, dass es sich bei diesen Tieren um das natürliche Reservoir von IAV handelt. Die Bezeichnung eines IAV Stammes wird aus dem Virus Genus/dem Wirt des Isolats (bei einem menschlichen Isolat wird keine Angabe bezüglich der Spezies gemacht)/des Ortes der ersten Isolation/der Nummer des Isolats/dem Jahr der Isolation sowie des Virussubtypen in Klammern zusammengesetzt. Ein Beispiel hierfür stellt das humane Isolat A/Puerto Rico/03/34 (H1N1) dar.

1.1.2. Virionstruktur

IAV besitzen als Hülle eine Lipiddoppelschicht, die sich von der Zellmembran der Wirtszelle herleitet, und können einen Durchmesser von 80-120 nm erreichen. Die Viren sind pleomorph und liegen im Normalfall in einer sphärischen Form vor (3). In die Virushülle sind die Oberflächenproteine HA, NA und M2 integriert, wobei das Verhältnis von HA:NA in etwa 4:1 ist (6). Die Innenseite der Virushülle wird vom M1 Protein ausgekleidet. Im Virusinneren befindet sich das virale RNA (vRNA) Genom bestehend aus acht Genomsegmenten, die als virale Ribonukleoproteinkomplexe (vRNP) vorliegen. Ein vRNP besteht jeweils aus einem RNA-Segment welches von Nukleoproteinmonomeren (NP) enkapsidiert ist und an welchem die Polymerase, bestehend aus dem basischen Polymeraseprotein 1 (PB1), dem basischen Polymeraseprotein 2 (PB2) und dem sauren Polymeraseprotein (PA) an den 5'- und 3'-Enden assoziiert ist (Abbildung 1; (7)).

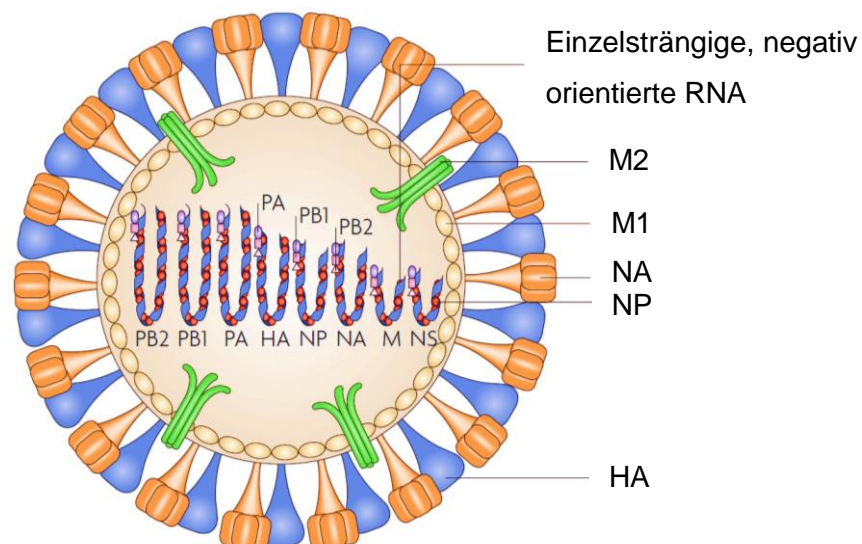


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Influenzaviruspartikels.

Das segmentierte negativ orientierte RNA Genom liegt im Inneren des IAV Partikels vor. In der Abbildung dargestellt ist die vRNA (blau), das NP (rot), sowie die drei assoziierten Polymeraseuntereinheiten (lila). Die Hülle des Virus besteht aus einer Lipiddoppelschicht, wobei diese im Inneren mit dem M1 Protein ausgekleidet ist. In die Hülle integriert sind das Ionenkanalprotein M2 (grün), sowie auf der Virionoberfläche die Glykoproteine HA (blau) und NA (orange), die hier allerdings nur repräsentativ und nicht im korrekten Verhältnis dargestellt sind (Modifiziert nach Nelson und Holmes 2007 (7)).

1.1.3. Aufbau des viralen Genoms

Das Genom von IAV besteht aus acht negativ orientierten, segmentierten vRNAs unterschiedlicher Länge. Insgesamt beträgt die Genomgröße des IAV 13,6 kb, wobei das Genom für mindestens 18 Proteine kodiert (8, 9). Alle bisher identifizierten Proteine des IAV sind in folgender Tabelle (Tabelle 1) zusammengestellt.

Tabelle 1: Die Proteine des IAV mit Nummerierung der Gensegmente, der Proteingrößen und den Funktionen der Proteine.

Segment	Größe [bp]	Protein	Molekulargewicht [kDa]	Funktion des Proteins
1	2341	PB2	80	Basisches Polymeraseprotein 2: -Bestandteil des vRNP- und Polymerasekomplexes -Erkennung und Bindung der 5'- Cap-Bindestruktur zellulärer mRNA
		PB2-S1	55	Basisches Polymeraseprotein 2, Splicingvariante: -Inhibitorischer Faktor von RIG-I abhängiger IFN Signalübertragung während einer IAV Infektion -nicht in Mäusen aktiv
2	2341	PB1	90	Basisches Polymeraseprotein 1: -Bestandteil des vRNP- und Polymerasekomplexes -RNA-abhängige RNA Polymerase -Elongation
		PB1-F2	10	-Regulator der Apoptose -Regulator der viralen Polymeraseaktivität
		PB1-N40	82	-bisher unbekannte Funktion
3	2233	PA	83	Saures Polymeraseprotein: -Bestandteil des vRNP- und Polymerasekomplexes -Endonukleaseaktivität -Serinproteaseaktivität
		PA-X	29	-beinhaltet Endonukleasedomäne von PA -Fusion mit Domäne des X-ORF -Modulation der Immunantwort des Wirtes
		PA-N155	62	-bisher unbekannte Funktion
		PA-N182	60	-bisher unbekannte Funktion
4	1778	HA	77	Hämagglutinin: -Oberflächenglykoprotein -Rezeptorbindung -Fusion -Hauptantigen für neutralisierende Antikörper
5	1565	NP	55	Nukleoprotein:

Einleitung

				<ul style="list-style-type: none"> -Bestandteil des vRNP Komplexes -Bindung von RNA -Synthese von RNA -Kernimport von RNA
6	1413	NA	56	Neuraminidase: <ul style="list-style-type: none"> -Oberflächenglykoprotein -Sialidaseaktivität -Antigen für Antikörper
7	1027	M1	28	Matrixprotein 1: <ul style="list-style-type: none"> -vRNP-Interaktion -vRNP-Kernexport -Abknospung -Virusfreisetzung
		M2	15	Matrixprotein 2: <ul style="list-style-type: none"> -Ionenkanal -Membranprotein -Vermittlung der Freisetzung von vRNPs ins Zytoplasma -Vermittlung des Viruszusammenbaus
		M42	11,4	-Unterstützung der effizienten Virusreplikation
8	890	NS1	26	Nichtstrukturprotein 1: <ul style="list-style-type: none"> -Protein mit multiplen Funktionen -Interferonantagonist -Regulator der zellulären Genexpression
		NEP (NS2)	11	Kernexportprotein (Nichtstrukturprotein 2): <ul style="list-style-type: none"> -Regulatorisches Protein -Rolle in vRNP-Export
		NS3	22,1	Nichtstrukturprotein 3: <ul style="list-style-type: none"> -vermittelt <i>replicative gain-of-function</i>

Dargestellt sind die Größe der Segmente in Basenpaaren (bp), die Proteine sowie deren Molekulargewicht in kDa und die Funktionen der IAV Proteine.

Einige Genomsegmente kodieren nicht nur für ein gleichnamiges Protein, sondern können mittels alternativen Spleißens oder alternative Leserahmen für bis zu vier Proteine, wie bei PA, kodieren (Modifiziert nach (6, 8-19)).

Die dargestellten Genomsegmente liegen als vRNP vor, wobei die vRNA mit NP im stöchiometrischen Verhältnis assoziiert und so gewunden ist, dass die Form einem Korkenzieher oder einer doppelhelikalen Haarnadel gleicht. Es konnte gezeigt werden, dass die 3'- und die 5'-Enden der vRNA stark konserviert sind. Diese hochkonservierten Regionen sind nichtkodierend, enthalten allerdings regulatorische Sequenzen für Replikations- sowie

Transkriptionspromotoren (20, 21). Außerdem enthalten diese Regionen Signale für die virale *messenger* RNA (mRNA)-Polyadenylierung sowie für den Viruszusammenbau (22, 23). Die Form der Genomsegmente als doppelhelikale Haarnadelstruktur lässt sich dadurch erklären, dass die 3'- und 5'-Enden der vRNA teilweise komplementär sind und so einen Duplex-vRNA-Bereich bilden. Mit diesem Bereich ist die vRNA-abhängige Polymerase assoziiert (24, 25). Die Polymerase des IAV besteht aus den basischen Polymeraseproteinen PB1 und PB2 sowie dem sauren Polymeraseprotein PA (3), deren Funktion die Transkription und Replikation des Virusgenoms darstellt (21). Die gewundenen vRNPs sind über Bindungen an das M1 Protein mit der Innenseite des Virions verbunden. Das M1 Protein kleidet die Virusmembran von innen aus und formt eine schützende Hülle um das virale Genom.

Die Genomsegmente für HA, NP und NA kodieren jeweils nur für ein Protein. Die anderen Genomsegmente können durch alternatives Spleißen oder überlappende Leserahmen für bis zu vier Proteine kodieren (Tabelle 1) (10, 26).

1.1.4. Rezeptorspezifität von Influenza A Viren

Im ersten Schritt der IAV Replikation erfolgt die Bindung des Viruspartikels an die Zielzelle über Rezeptormoleküle. Diese Rezeptorbindung des IAV an Wirtszellrezeptoren wird durch das Oberflächenglykoprotein HA vermittelt. Das HA spielt somit eine entscheidende Rolle bei der Infektion des Wirts und bestimmt ebenso das Wirtsspektrum mit. In der Regel bevorzugen säugeradaptierte, sowie humanadaptierte IAV die Rezeptorbindung an α 2,6-verknüpfte Sialinsäuren. Diese Wirtszellrezeptoren sind sogenannte Sialyl-Oligosaccharide mit endständigen N-Acetyl-Neuraminsäuren (Sialinsäuren) mit Galaktose durch α 2,6-Verknüpfung verbunden (11, 27). IAV aviären Ursprungs hingegen präferieren die Rezeptorbindung an α 2,3-verknüpfte Sialinsäuren. Entscheidend für die Verbreitung der IAV, sowie des Infektionsverlaufs, ist die Rezeptorexpression im Wirt. Die Verteilung der Rezeptoren im Frettchen ähnelt stark der des Menschen. In Menschen und Frettchen werden hauptsächlich α 2,6-verknüpfte Sialinsäuren im oberen Respirationstrakt und hauptsächlich α 2,3-verknüpfte Sialinsäuren im unteren Respirationstrakt exprimiert (27, 28). In Vögeln hingegen sind im Gastrointestinaltrakt, dem Hauptreplikationsort von IAV im aviären Wirt, vorwiegend α 2,3-verknüpfte Sialinsäuren vorzufinden. Zu einem geringen Teil werden im Respiration- und Intestinaltrakt von Vögeln auch α 2,6-verknüpfte Sialinsäuren exprimiert (28). Interessanterweise werden im oberen Respirationstrakt des Schweins α 2,3- sowie α 2,6-verknüpfte Sialinsäuren exprimiert, was eine Erklärung für die breite Empfänglichkeit dieser Tiere für sowohl humane wie auch aviäre IAV darstellt (27).

1.1.5. Replikationszyklus von Influenza A Viren

Der Replikationszyklus von IAV beschreibt die Vermehrung von Viruspartikeln in einer Wirtszelle. Diese Vermehrung läuft in verschiedenen Schritten ab, welche numerisch in Abbildung 2 markiert sind. Zuerst (Abbildung 2; Markierung 1) interagiert das Virus über sein HA an Rezeptoren auf der Wirtszelle und wird im Folgenden über eine rezeptorvermittelte Endozytose in das Zellinnere aufgenommen. Es folgt die Membranfusion und das (Abbildung 2; Markierung 2) Entpacken und der Kernimport der vRNPs. Anschließend (Abbildung 2; Markierung 3) wird das virale Genom transkribiert, repliziert und Virusproteine werden synthetisiert. Der letzte Teil des Replikationszyklus besteht aus der (Abbildung 2; Markierung 4) Zusammensetzung des Virus sowie der Abknospung neugebildeter Viruspartikel (6, 29). Der Replikationszyklus des Virus ist nur durch diverse Interaktionen mit zellulären Prozessen und Wirtsproteinen möglich, welche auch zunehmend erforscht werden, um neuartige Therapieansätze zu entwickeln (30-32). In den folgenden Abschnitten werden die wichtigsten Prozesse während des Replikationszyklus von IAV dargestellt.

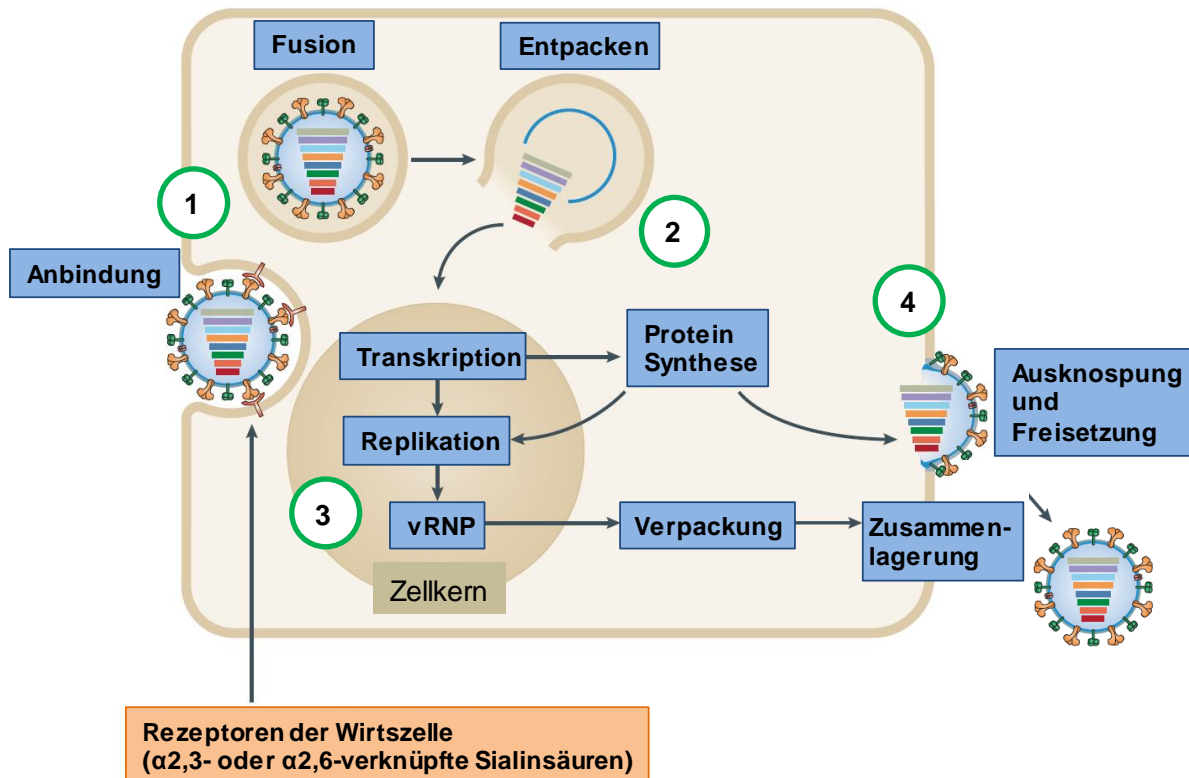


Abbildung 2: Replikationszyklus von IAV.

Der Replikationszyklus des IAV läuft in mehreren Schritten ab. Der erste Schritt besteht in der Adsorption [1] sowie der rezeptorvermittelten Endozytose zur Aufnahme des Virus in die Wirtszelle. Anschließend wird das Virus entpackt [2] und die vRNPs werden in den Zellkern transportiert. Es folgen die Transkription [3], Translation, Replikation sowie Proteinsynthese der viralen Proteine und der Zusammenbau von Nachkommenviren [4] und deren Abknospung von der Wirtszelle (Modifiziert nach Shi *et al.*, 2014 (33)).

1.1.5.1. Adsorption und rezeptorvermittelte Endozytose

Der initiale Schritt des Replikationszykluses des IAV besteht in der Anheftung des Virus an die Wirtszelloberfläche. Die Anheftung des Virus an die Wirtszelle wird durch das virale Oberflächenglykoprotein HA vermittelt, wobei es sich bei den Rezeptoren der Wirtszelle um glykosidisch verknüpfte Sialinsäuren handelt, welche überwiegend auf Epithelzellen exprimiert werden. In der Regel präferieren aviäre IAV bei der Bindung α2,3-verknüpfte Sialinsäuren, wohingegen säugeradaptierte wie z.B. humane IAV präferenziell α2,6-verknüpfte Sialinsäuren binden. Allerdings wurde auch beschrieben, dass die Rezeptorbindung von IAV auch von anderen exprimierten Sialylglykanen vermittelt werden kann. Diese sind ebenfalls in der Lage an das HA zu binden. Die Sialylglykane können beispielsweise O- oder N-verknüpfte Glykoproteine oder Glykolipide auf der Wirtszelle darstellen (6, 34-36). Im Anschluss an die Rezeptorbindung wird der Viruspartikel mittels

rezeptorvermittelter Endozytose in die Wirtszelle aufgenommen, wobei die Zellmembran das Virus umhüllt und so ein Endosom im Zytoplasma entsteht, in welchem das Virion vorliegt.

1.1.5.2. Entpacken des Virus und Kernimport der vRNP Komplexe

Nachdem das IAV in die Zelle endozytiert wurde, wandert es während der Reifung der Endosome durch das endosomale Netzwerk in Richtung Zellkern (37-39). Nach der Aufnahme wird das endozytierte Virus innerhalb von 5 min in frühen Endosomen zuerst einem pH von 6,0 bis 6,5 ausgesetzt. Es folgt eine langsame Ansäuerung über 30 bis 40 min bis zu einem pH von 5,5 bis 5,9 in reifenden, späten Endosomen. Das Endosom reift weiter zu einem Lysosom, wobei das Endosomeninnere einem pH von 5,0 bis 4,6 ausgesetzt ist (39-42). Die stetige Ansäuerung erfolgt über zelluläre Protonenpumpen, die in der endosomalen Membran lokalisiert sind (43). Durch die Ansäuerung des Endosoms wird eine Konformationsänderung des viralen HA Proteins ausgelöst. Diese Konformationsänderung führt zur Freilegung des Fusionspeptids am C-terminalen Ende des HA Proteins, welches in die Vesikelmembran inseriert und die Fusion der endosomalen Membran mit der Virusmembran vermittelt. Um die Fusion durchführen zu können, muss das Vorläuferprotein HA₀ bereits durch Wirtszellproteasen in die beiden funktionellen Untereinheiten HA₁ und HA₂ gespalten worden sein (44). Der nächste Schritt im Replikationszyklus zeichnet sich durch das Einströmen von Protonen durch den viralen M2-Ionenkanal in die viralen Partikel aus. Dadurch werden die Interaktionen der vRNPs mit der des M1 Protein reduziert und die vRNPs werden ins Zytoplasma freigesetzt (45, 46). Nachdem die vRNPs in das Zytoplasma abgesondert wurden, können diese in den Zellkern des Wirtsorganismus transportiert werden. Dieser Schritt ist essenziell für die Replikation und Transkription von IAV, da beide Prozesse im Zellkern stattfinden. Der Kerntransport von Molekülen ~ > 40 kDa erfolgt durch aktive, energieabhängige Kernimportprozesse der Wirtszelle. Der Transport der vRNPs durch die Kernpore wird hierbei durch Kernlokalisationssequenzen (*Nuclear localization signal*, NLS) vermittelt, die in allen vier vRNP Untereinheiten vorhanden sind. Hier spielen hauptsächlich die NLSs von NP und PB2 eine wichtige Rolle (25, 47, 48). Im klassischen Kernimportweg wird das NLS des Cargoproteins von Importin- α Adaptorproteinen erkannt. Anschließend erfolgt die Bindung dieser an den Transportrezeptor Importin- β 1, wodurch der Kernimport des ternären Komplexes vermittelt wird (49).

1.1.5.3. Transkription und Replikation des viralen Genoms

Initiator der viralen mRNA Synthese ist der sogenannte *cap snatching* Mechanismus der viralen Polymerase. *Cap snatching* bezeichnet die Bindung des viralen PB2 Proteins an die 5'-Capstrukturen zellulärer prä-mRNAs. Die Capstrukturen werden dann mit der Endonukleaseaktivität des viralen PA Proteins von den zellulären mRNAs abgetrennt und anschließend als Primer für die virale mRNA Synthese genutzt (50, 51). Nach der Synthese der viralen mRNA wird diese ins Zytoplasma befördert. Mit der vorhandenen 5'-Capstruktur kann die virale mRNA an den Ribosomen der Wirtszelle in virale Proteine translatiert werden. Durch die Nutzung der 5'-Cap von zellulären prä-mRNAs durch das IAV wird gleichzeitig die Translation zellulärer Proteine inhibiert. Eine Modellierung der Replikation des viralen Genoms, sowie der Transkription initiiert durch *cap snatching* ist in der folgenden Abbildung (Abbildung 3) dargestellt.

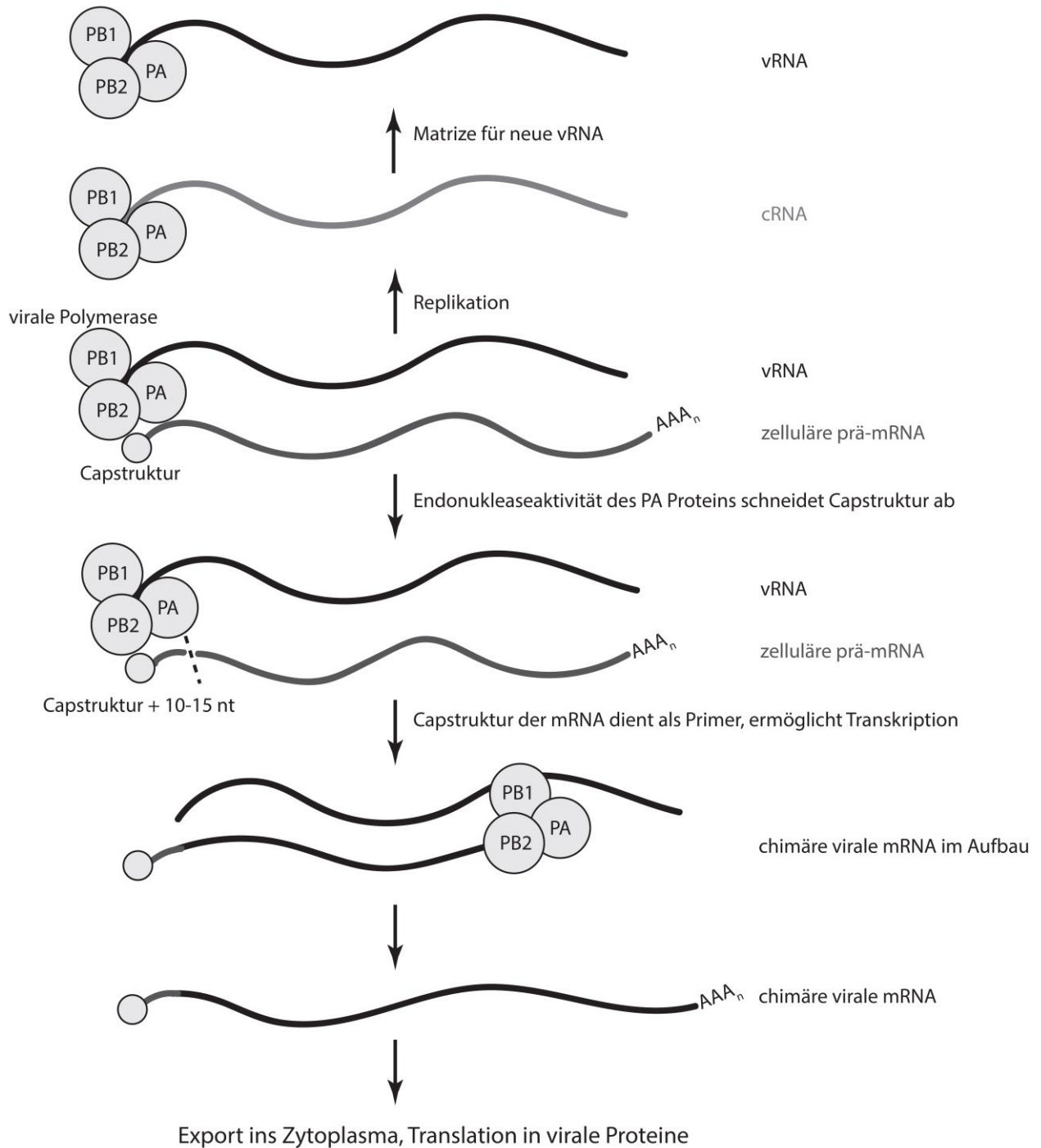


Abbildung 3: Replikation, *cap snatching*, Transkription und Translation des viralen Genoms.

Das PB2 Protein des viralen Polymerasekomplexes bindet an die Capstruktur der zellulären prä-mRNA, die Endonukleaseaktivität des PA Proteins trennt die Capstruktur mit zusätzlichen 10-15 nt von der mRNA ab. Diese Capstruktur dient der viralen mRNA als Primer, es entsteht eine chimäre virale mRNA, die im Zytoplasma in virale Proteine translatiert wird. Des Weiteren dient die vRNA für die Replikation des viralen Genoms. Hierzu wird zuerst primerunabhängig cRNA generiert, die im weiteren Verlauf als Matrize für weitere vRNA verwendet wird (illustriert von C. Dreier, 2016; nach Boivin *et al.*, 2010; Resa-Infante *et al.*, 2011; Naffakh *et al.*, 2008) (21, 51, 52).

Nach Translation der viralen Proteine im Zytoplasma werden die neugebildete Polymeraseproteine anschließend für erneute Replikations- und Translationsvorgänge in den Zellkern importiert. Nach aktuellem Kenntnisstand wird angenommen, dass der nukleäre Transport des Heterodimers PB1/PA durch das β -importin Ran-Bindeprotein 5 (RanBP5) vermittelt wird (53-55). PB2 sowie NP werden hingegen auch einzeln durch den Importin- α /Importin- β 1-Signalweg in den Zellkern transportiert, in welchem PB1/PA und PB2 sich zusammenlagern und das Polymerasentriemer bilden. Das Polymerasentriemer wird für die Virusreplikation und -transkription benötigt und liegt im Weiteren mit der von NP Proteine ummantelten vRNA assoziiert vor (56, 57). Nachdem virale mRNAs in großen Mengen transkribiert wurden, beginnt die Replikation der vRNA in positiv orientierte, komplementäre RNA (cRNA), welche später im Replikationszyklus als Vorlage zur Synthese von vRNA genutzt wird (6). Die Synthese von vRNA und cRNA wird Primer-unabhängig von Promotoren in hochkonservierten, nichtkodierenden Bereichen der viralen Genomsegmente vermittelt. Interessanterweise findet die Translation der viralen Proteine PB1, PB2, PA, NS, NP und M1 an freien Ribosomen im Zytoplasma der Wirtszelle statt (6). Die Oberflächenproteine HA, NA und M2 hingegen werden an den membrangebundenen Ribosomen des rauen endoplasmatischen Retikulums translatiert und als Polymere gelagert. Es folgt eine posttranslationale Modifikation durch den Golgi-Apparat und der Transport in Richtung der Wirtszellmembran (6). Anschließend werden die viralen Proteinen zur Zytoplasmamembran transportiert, welche sich dort in großen Mengen ansammeln (6).

1.1.5.4. Zusammensetzung des Virus und Abknospung neugebildeter Viruspartikel

Durch die Akkumulation von viralen Oberflächenproteinen an der Innenseite der Zellmembran stülpt sich diese aus und es kommt zu einer Ausknospung von entstehenden Nachkommenvirionen. Neugebildete vRNPs werden zur Zellmembran transportiert, um in die sich bildenden Virionen integriert zu werden. Die Membranausknospung wird noch mehr erweitert, es bildet sich ein neues Viruspartikel, welches noch mit der Wirtszelle verbunden ist (58). Die Virushülle des Nachkommenvirions besteht bei Viren stets aus der Doppellipidmembran der Wirtszelle. Die enzymatische Aktivität der NA des Nachkommenvirions trennt die gebundenen Sialinsäuren ab und setzt somit das Virus frei (59). Diese Abtrennung der Sialinsäuren verhindert Vernetzung, Aggregatbildung und eine Anbindung der Nachkommenviren an die bereits infizierte Wirtszelle. Der Replikationszyklus ist mit diesem Schritt beendet, das neugebildete Virus kann nun neue Wirtszellen infizieren (60).

1.1.6. Wirtsspektrum und Evolution von Influenza A Viren

Das natürliche Reservoir von IAV sind wildlebende Wasservögel. Alle bisher isolierten und replikationsfähigen Subtypen von IAV konnten aus diesem Reservoir isoliert werden und wurden vor allem in den Ordnungen der *Anseriformes* (Gänsevögeln), *Charadriiformes* (Regenpfeiferartige) und *Laridae* (Möwen) gefunden (3, 27, 61). In wilden Wasservögeln ist das IAV im Normalfall asymptomatisch, in anderen Wirten hingegen können eine Vielzahl von milden bis schweren Symptomen nach einer Infektion mit IAV beobachtet werden (3). Es wird vermutet, dass das IAV bereits optimal an Wasservögel adaptiert ist, da die viralen Proteine in aviären IAV hochkonserviert sind (3). Wie bereits oben erwähnt (Kapitel 1.1.1) wurden bisher 16 HA (H1-16) und 9 NA (N1-9) Subtypen in Wasservögeln detektiert (27). Die Verbreitung von IAV erfolgt über Fäkalien infizierter Wasservögel (3). Es konnte gezeigt werden, dass Enten im Fall einer IAV Infektion 7-21 Tage IAV in hohen Konzentration über Fäkalien ausscheiden können (62, 63). Gründelnde Wasservögel nehmen so viruskontaminiertes Futter und Wasser über die fäkal-orale Route auf. In stehendem Gewässer mit großen Ansammlungen wilder Enten konnten Viruskonzentrationen bis zu $10^{2,8}$ Ei-infektiöse Dosis 50 pro Milliliter (EID_{50}/ml) gemessen werden (64, 65). Des Weiteren wurden Virusabsonderungen über die Trachea infizierter Mallard-Enten beschrieben, welche aber vermutlich eine untergeordnete Rolle in der Transmission von IAV spielen (66). Zudem sind IAV auch in der Lage, Spezies außerhalb ihres natürlichen Reservoirs zu infizieren (Abbildung 4). In einem solchen Fall spricht man von einer Interspezies-Transmission.

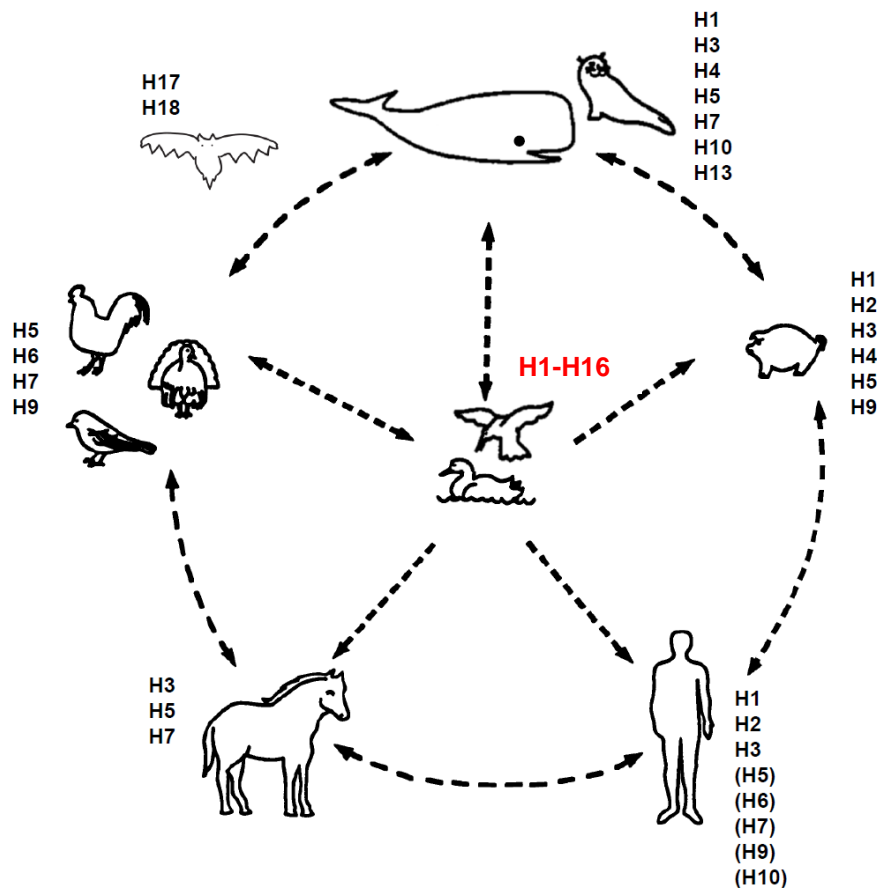


Abbildung 4: Wirtsspektrum von Influenza A Viren.

Hier dargestellt ist das Wirtsspektrum von IAV mit den Wasservögeln als natürliches Reservoir im Zentrum des Kreises (Virusreservoir, Subtypen des HAs in rot (H1-H16)). Wilde Wasservogel sind in der Lage verschiedene Spezies zu infizieren. Es wird allerdings davon ausgegangen, dass IAV auch durch Zwischenwirte auf andere Spezies übergehen können. IAV konnte unter anderem bereits aus Meeressäugern, Geflügel, Haustieren wie beispielsweise Pferden, sowie aus Schweinen isoliert werden. Zudem konnten Influenza-ähnliche HA und NA Subtypen in Fledermäusen detektiert werden. Da der Mensch ebenfalls einen Wirt der IAV darstellt, handelt es sich bei Influenza um eine Zoonose. IAV Subtypen im Menschen, welche Auslöser einer Pandemie waren, sind in der Abbildung ohne Klammer dargestellt. Sporadische humane IAV Infektionen hingegen sind mit einer Klammer um den HA Subtyp dargestellt. Die Pfeile zeigen mögliche interspeziesübergreifende Transmissionen des Virus zwischen den Wirten an. Die verschiedenen Gruppen des dargestellten Wirtsspektrums beruhen auf Untersuchungen des NP Proteins verschiedenster IAV (Modifiziert nach Webster *et al.*, 1992 (3, 67-74)).

Unter anderem konnten IAV aus Hausgeflügel, anderen Vogelarten, Schweinen, Katzen, Hunden, Pferden, Meeressäugern sowie Menschen isoliert werden (3, 75, 76). Bei einer Infektion außerhalb des natürlichen Reservoirs kann es aufgrund von immunologischer Naivität des neuen Wirtes zu unterschiedlichen Krankheitssymptomen und Ausprägung der Krankheit kommen. In einem neuen Wirt wirkt ein anderer Selektionsdruck auf das Virus ein, wodurch Mutationen im viralen Genom entstehen. Diese Mutationen können, wenn sie der Fitness des Virus zuträglich sind, zu einer Adaptation an den neuen Wirt führen (3). Aufgrund fehlender Korrekturmechanismen kommt es zu etwa 1 Fehler in 10^4 Basen durch die virale

RNA Polymerase (3, 77, 78), was das Auftreten von Mutationen im viralen Genom und eine Adaptation an neue Wirte fördert (79). Ganz besonders anfällig für solche Punktmutationen (*Antigendrift*) sind die beiden viralen Oberflächenproteine HA und NA, da diese dem höchsten Selektionsdruck durch Antikörper unterliegen (3). Der *Antigendrift* beschreibt die natürliche Evolution eines IAV durch den Einbau von Fehlern in das virale Genom durch die IAV Polymerase, welche als RNA-abhängige RNA-Polymerase keine *proofreading* Aktivität besitzt (39). Diese Evolution der IAV kann zur Entstehung neuer IAV-Stämme beitragen (80). Durch diesen *Antigendrift* des Virus können die jährlichen Impfstoffe unwirksam werden und IAV Epidemien ausgelöst werden (39). Eine weitere Möglichkeit zur Variabilität des viralen Genoms mit einer Veränderung der Antigenität kann durch den sogenannten *Antigen shift* erfolgen. IAV werden während des *Antigen shifts* durch Reassortierung oder Punktmutationen so stark verändert, dass die Bevölkerung gegen das neuartige IAV immunologisch naiv ist (3). Ist eine Wirtszelle mit mindestens zwei IAV Subtypen infiziert, kann ein Gensegmentaustausch der IAV stattfinden (Reassortierung) (3, 39). Diese neuartigen IAV können im Fall einer ausreichenden Fitness und nach dem Erwerb der Bindspezifität an die humanen $\alpha 2,6$ -verknüpften Sialinsäuren eine IAV Pandemie auslösen (80). Eine entscheidende Rolle bei der Reassortierung von Influenza A Viren spielt das Schwein, welches aufgrund seiner Rezeptorexpression (Kapitel 1.1.4) auch als Mischgefäß (*mixing vessel*) verschiedener IAV bezeichnet wird (3, 39). Im Schwein können Reassortanen aus aviären und humanen und porcinen IAV entstehen (3, 6, 27, 81). Trotz der begrenzten Möglichkeit eines solchen reassortierten Virus auf den Menschen überzugehen, kann dies in seltenen Fällen stattfinden und dann zur Pandemie in einer immunologisch naiven Bevölkerung führen (3).

1.1.7. Hoch- und niedrigpathogene Influenzaviren

Die Fähigkeit eines HA Proteins die Fusion zwischen der endosomalen und der Virusmembran zu vermitteln, ist von der Spaltung des Vorläuferproteins HA₀ in die Untereinheiten HA₁ und HA₂ durch Wirtsproteasen abhängig (39). Hierbei werden IAV in zwei Gruppen unterteilt. Hochpathogene aviäre Influenzaviren (*highly pathogenic avian influenza virus*, HPAIV) besitzen eine multibasische Spaltstelle (*multibasic cleavage site*, multi-BCS), wohingegen niedrigpathogene multi-BCSaviäre Influenzaviren (*low pathogenic avian influenza virus*, LPAIV) und IAV aus dem Säugetier (Kapitel 1.1.8) eine monobasische Spaltstelle aufweisen (mono-BCS) (39). Die Klassifizierung der Viren in LPAIV oder HPAIV leitet sich von der Virulenz des Virusstamms in Hühnern (*Gallus gallus domesticus*) ab (39). Die Virulenz ist von der Spaltstelle im HA abhängig (39). Die Spaltstelle ist zwischen den HA

Einleitung

Untereinheiten HA₁ und HA₂ lokalisiert (27, 39). Nach heutigem Wissensstand können alle HA Subtypen in der niedrigpathogenen Form vorliegen, wobei von dieser Klassifizierung die Fledermausvarianten H17 und H18 ausgenommen sind. Die mono-BCS kann durch im Respirations- und Intestinaltrakt vorkommende trypsinähnliche Proteasen gespalten werden, wodurch LPAIVs im Geflügel auch nur dort aktiv replizieren. Die lokale Begrenzung der Infektion mit LPAIVs führt nicht zu einer systemischen Infektion in Geflügel. Somit sind die Morbiditäts- sowie Mortalitätsraten in Geflügel deutlich geringer als bei Infektionen mit HPAIV Subtypen (3, 6, 27). Nach Infektion mit LPAIV kann Hausgeflügel klinische Symptome wie Kauern, Depression, verminderte Nahrungs- und Wasseraufnahme, Gewichtsabnahme, struppiges Gefieder sowie grünliche oder gelbliche Diarrhö zeigen. Zudem wurde Husten, Niesen, Lungengeräusche und Absonderungen durch die Augen beschrieben. Weitere Symptome in Hausgeflügel sind verminderte Qualität der Eier, ein genereller Rückgang der Eiproduktion in infizierten Tieren sowie vermindertes Schlüpfen der Küken (39, 82, 83).

Nach dem heutigen Wissensstand können nur H5 oder H7 Subtypen hochpathogen in Geflügel sein. Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass in Geflügel aus einem LPAIV Vorläufervirus durch die Akquirierung einer multi-BCS im HA ein HPAIV entsteht. Bisher wurden drei Mechanismen zur Generierung einer multi-BCS beschrieben. Zum einen kann in einem sogenannten LPAIV Vorläufervirus durch nicht homologe Rekombination des HA mit ribosomalen RNAs oder zum anderen auch durch nicht homologe Rekombination des HA mit anderen Gensegmenten von IAV eine multi-BCS entstehen (84-89). Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch Verzögerungen der viralen Polymerase an Purin-reichen Arginin oder Lysin Codons aufeinanderfolgende aa eingefügt werden (90-92). Des Weiteren existieren bisher unbekannte Mechanismen, die die Akquirierung einer multi-BCS einleiten können (39, 93). Die multi-BCS kann durch ubiquitäre exprimierte Proteasen gespalten werden. Ein prominentes Beispiel dieser ubiquitären Proteasen ist das Furin, sowie *proprotein convertase 6* (PC6), vorkommend in diversen Wirtszellen (3, 27). Durch die vermehrten Spaltungsmöglichkeiten des HA₀ Vorläuferproteins durch diverse ubiquitäre Proteasen kann so eine systemische Infektion in Geflügel im Falle einer Infektion mit HPAIVs hervorgerufen werden. Die Bezeichnungen Vogelgrippe oder Geflügelpest beschreiben in beiden Fällen Infektionen durch HPAIVs der Subtypen H5 und H7 (27, 39, 94). Wenn Geflügel mit einem HPAIV Stamm infiziert wird, sterben die infizierten Tiere innerhalb weniger Tage (3, 95). Da IAV leicht auf verschiedenen Transmissionswegen auf andere Geflügelfarmen übertragen werden können, resultieren durch einen solchen IAV Ausbruch oft massive wirtschaftliche Schäden (6).

1.1.8. Aviäre Influenzaviren im Menschen

Gelegentlich können aviäre IAV durch Interspeziesübertragungen direkt von wildlebenden Wasservögeln oder meist über Zwischenwirte wie Geflügel oder Schweine auf den Menschen übergehen (27, 96). So wurden Fälle von H5 und H7 HPAIV Übertragungen auf Menschen registriert, welche mit einer erhöhten Letalität einhergehen (94, 97-99). Allerdings handelt es sich bei humanen IAV Erkrankungen mit HPAIVs bisher um Einzelfälle mit unterschiedlichen Krankheitsverläufen (27, 74, 80, 100). Die meisten Fälle humaner Infektionen mit HPAIV wurden durch H5N1 HPAIV gemeldet. Seit der ersten dokumentierten H5N1 HPAIV Infektion in Menschen im Jahre 1997 ist die Zahl der humanen H5N1 HPAIV Fälle massiv angestiegen (101). Im Juli 2016 waren 854 humane H5N1 HPAIV Infektionen mit 450 daraus resultierenden Todesfällen seit dem Jahr 2003 registriert worden (102). Seit 2002 werden auch zunehmend humane Infektionen mit H7 LPAIV und HPAIV gemeldet (94). Es wird befürchtet, dass HPAIV während einer humanen Infektion bestimmte Determinanten erwerben, die zu einer Adaptation an den Menschen führen könnten. Im Falle einer humanen Adaptation könnten diese Viren, die bisher sehr limitiert von Mensch-zu-Mensch transmittieren, dann über Aerogene von Mensch-zu-Mensch übertragbar werden. In diesem Szenario wäre die humane Bevölkerung vollständig immunologisch naiv gegenüber diesen Viren und eine neue IAV Pandemie mit ungeahnten Auswirkungen wäre zu befürchten (27, 28, 94, 103). Die immunologische Naivität sowie die Möglichkeit der Übertragung durch Aerogene werden als Merkmal eines pandemischen Virusstammes gesehen (27). Um die Transmission von HPAIVs besser untersuchen zu können, wurden in der virologischen Forschung diverse geeignete Tiermodelle zum Studium der Übertragbarkeit von Viren entwickelt. Diese Tiermodelle sind in Bezug auf Empfänglichkeit, Rezeptorverteilung und Symptomatik dem Menschen teilweise sehr ähnlich, was eine Modellierung der Transmission von IAV im Menschen ermöglicht (104). Nähere Erläuterungen zu Untersuchungen der verschiedenen Arten der Transmission in Tiermodellen werden in den Kapiteln 1.2.1, 1.2.2 und 1.2.3 gegeben.

Neben den Übertragungen von HPAIV auf den Menschen konnten vor wenigen Jahren nun auch Infektionen mit LPAIV registriert werden. Ein IAV mit mono-BCS (LPAIV in Hühnern) ist das H7N9 Virus, welches seit 2013 Infektionen vorrangig in China auslöst (105). Nach den humanen H5N1 Infektionen gilt der H7N9 Ausbruch bislang als größter Ausbruch aviärer IAV im Menschen (106). Seit Beginn des Ausbruchs in 2013 wurden 766 H7N9 Infektionen im Menschen gemeldet, wobei die Mortalitätsrate bei etwa 40 % liegt (107). In der Vergangenheit konnten LPAIV Infektionen im Menschen bereits mehrfach mit milden bis mittelschweren Symptomen im Respirationstrakt beschrieben werden. Für H5N1 Infektionen hingegen wurden, wie bereits oben beschrieben, schwere IAV Infektionen beschrieben.

Ähnlich massive Infektionen wie mit H5N1 konnten zum ersten Mal für H7N9 (LPAIV in Hühnern) im Menschen beobachtet werden (108). Wie bereits vorhin beschrieben, können LPAIV in Hühnern eine multi-BCS erwerben und zu HPAIV mutieren, wobei die Folgen eines H7N9 HPAIV für die Bevölkerung nicht absehbar wären. Aufgrund dessen besteht Meldepflicht für alle H7 IAV in Geflügel, um die Ausbreitung von LPAIV frühzeitig einzudämmen und den Erwerb einer multi-BCS zu verhindern (109).

1.1.9. Epidemiologie der Influenzaviren im Menschen

1.1.9.1. Influenza A Virus Epidemien

Durch den (in Kapitel 1.1.6 beschriebenen) *Antigendrift* treten jährlich IAV Epidemien in der humanen Bevölkerung auf. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) schätzt, dass jedes Jahr 3-5 Millionen schwere IAV Infektionen auftreten, die 250 000 bis 500 000 Todesfälle zur Folge haben (110). Speziell die von der WHO definierten Risikogruppen sind empfänglich für schwere IAV Erkrankungen. Zu den Risikogruppen gehören schwangere Frauen, junge Menschen unter 2 Jahren, ältere Menschen über 65 Jahren und Personen mit chronischen Erkrankungen und Immunsupprimierte (111). Daher empfiehlt die WHO Impfungen für schwangere Frauen jedes Trimesters, für Kinder zwischen 6 Monaten und 5 Jahren, für Personen ab 65 Jahren, für Personen mit chronischen Erkrankungen und medizinisches Personal (111). In der nördlichen Hemisphäre treten IAV Epidemien meist saisonal in der kälteren Jahreszeit auf. Dies kann durch die bessere Aerogentransmission von IAV bei tieferen Temperaturen erklärt werden, da in Transmissionsversuchen in Meerschweinchen gezeigt werden konnte, dass niedrige Temperaturen, sowie eine niedrige relative Luftfeuchtigkeit eine Aerogentransmission von IAV erhöhen (112). Unter diesen Umständen zeigen die IAV eine erhöhte Stabilität und es wird vermutet, dass die influenzahaltigen Aerogene stabiler sind. Des Weiteren wird vermutet, dass soziale Faktoren und das menschliche Verhalten und zum Beispiel die niedrige relative Luftfeuchtigkeit in geheizten Räumen während der kälteren Jahreszeiten eine Rolle spielen (6, 113, 114). Dahingegen wird die Saisonalität in tropischen und subtropischen Teilen der Erde mit der Regenzeit in Verbindung gebracht, allerdings fehlt bisher das detaillierte Verständnis zur Saisonalität in diesen Klimazonen (6, 115-117).

Durch die hohe Inzidenzrate und die relativ lange Krankheitsdauer von durchschnittlich 14 Tagen nach einer Infektion mit einem saisonalen Influenzastamm (Influenza Epidemie) verliert die deutsche Wirtschaft laut Medienberichten jährlich Summen im Milliardenbereich (118). Um Menschen vor IAV Infektionen zu schützen, werden jährlich Impfungen gegen die jeweils zirkulierenden Virusstämme angeboten (Kapitel 1.1.10).

1.1.9.2. Influenza A Virus Pandemien

Durch massive Änderungen der Oberflächenproteine während eines *Antigendriffs* oder durch einen *Antigenshift* können IAV Pandemien ausgelöst werden. Grundvoraussetzung für eine Pandemie ist eine immunologische Naivität der humanen Bevölkerung sowie eine Bindepräferenz der Viren für α 2,6-verknüpfte Sialinsäuren. Wie bereits beschrieben (Kapitel 1.1.4) werden α 2,6-verknüpfte Sialinsäuren prädominant im oberen Respirationstrakt des Menschen exprimiert. Durch eine IAV Infektion von Zellen im oberen Respirationstrakt können sich die Viren leicht durch Niesen, Husten oder über Schmierinfektionen verbreiten. Als eine weitere wichtige Grundvoraussetzung für eine Pandemie gilt zudem eine ausreichende Infektiosität des Virus damit sich das pandemische IAV weltweit ausbreiten und zu hohen Morbiditäts- sowie Mortalitätsraten führen kann (3, 39). In den folgenden Kapiteln sind alle IAV Pandemien seit 1918 aufgelistet.

1.1.9.2.1. Die Pandemie von 1918 – Die Spanische Grippe (H1N1)

Auslöser der Pandemie von 1918 war ein H1N1 IAV. Infektionen dieses IAV führten zum Tod von mindestens 20-40 Millionen Menschen in den Jahren von 1918 – 1919 (27, 119). Besonders ungewöhnlich war bei dieser Pandemie die hohe Mortalitätsrate von 50 % in IAV Infizierten zwischen 20 und 40 Jahren. Diese Altersgruppe stellt im Normalfall keine Risikogruppe während IAV Erkrankungen dar (120). Soweit beschrieben, beschränkten sich die pathologischen Befunde der 1918 H1N1 Infizierten auf den Respirationstrakt, wobei der Tod der Patienten durch primär virale Pneumonien mit Atemversagen ausgelöst wurde (121). In den Jahren 1918 und 1919, die durch den 1. Weltkrieg geprägt waren, starben viele IAV Erkrankte an einer sekundären, bakteriellen Pneumonie. Zu dieser Zeit waren bereits einzelne Antibiotika entdeckt, diese wurden jedoch noch nicht generell zur Behandlung von bakteriellen Erkrankungen eingesetzt (122, 123). Während der Pandemie wurden in einigen Fällen massive intrapulmonale Blutungen sowie Lungenödeme beschrieben, die auf eine extrem hohe Virulenz dieses pandemischen Virus hinweisen (6). Es wird vermutet, dass das 1918 Virus durch eine Reassortierung von humanen und porcinen IAV Stämmen sowie weiteren Reassortierungen mit aviären IAV entstand (124, 125). Jahrzehnte nach der Pandemie konnte virale RNA aus Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Proben isoliert und sequenziert werden. Diese RNA Isolate sind als A/South Carolina/1/18 (H1N1) und A/New York/1/18 (H1N1) beschrieben (126). Ein weiteres RNA Isolat konnte aus einer Ureinwohnerin Alaskas, die an den Folgen der 1918 Influenza gestorben und bis 1997 in Permafrost konserviert war, gewonnen werden (A/Brevig Mission/1/18 (H1N1)) (126, 127).

1.1.9.2.2. Die Influenzavirus Pandemie im Jahr 1957 – Die Asiatische Grippe (H2N2)

Die nächste Pandemie im 20. Jahrhundert war die sogenannte Asiatische Grippe, die durch ein H2N2 IAV ausgelöst wurde, wobei diese Pandemie in Bezug auf die 1918 Pandemie eine geringere Morbidität und Mortalität aufwies (27). Es wird vermutet, dass die Pandemie in der südchinesischen Provinz Guizhou Anfang 1957 entstand. Von dort breitete sich das 1957 Virus zuerst bis Japan, dem Ort der Isolation, und dann in die ganze Welt aus (6). Das 1957 pandemische Virus entstand aus dem 1918 Virus, wobei die Oberflächenproteine HA und NA sowie das Polymeraseprotein PB1 durch aviär-ähnliche Segmente ausgetauscht wurden (6, 128). Untersuchungen zufolge wird vermutet, dass diese eingefügten aviären-ähnlichen Segmente bereits einige Jahre vor dem Ausbruch der 1957 Pandemie in das später pandemische Virus eingebracht, und dieses bereits für längere Zeit in der Bevölkerung zirkulierte (124). Es wurde beschrieben, dass die Infektionsrate dieses H2N2 Virus in Menschen zwischen 5 und 19 Jahren am höchsten war (6). Insgesamt forderte diese Pandemie etwa 1 Mio. Todesopfer weltweit (6).

1.1.9.2.3. Die Influenzavirus Pandemie im Jahr 1968 – Die Hong Kong Grippe (H3N2)

Eine weitere Pandemie im 20. Jahrhundert war die sogenannte Hong Kong Grippe im Jahr 1968, welche durch ein H3N2 IAV ausgelöst wurde. Die Ursprünge dieser Pandemie lagen wahrscheinlich im Süden Asiens, von wo es sich nach Hong Kong ausbreitete und dort auch 1968 isoliert werden konnte (6). Wie bereits in der vorhergehenden Pandemie beobachtet, waren die meisten Patienten junge Menschen, während der H3N2 Pandemie zwischen 10 und 14 Jahren (6). Die Zahl der durch dieses pandemische Virus ausgelösten Todesfälle betrug in etwa 1 Mio. weltweit (129). Es konnte gezeigt werden, dass das PB1 sowie das HA Protein des 1968 H3N2 Virus aviären Ursprungs waren, wobei das HA nur zu <30 % sequenzhomolog zum 1957 H2N2 Virus war (6).

1.1.9.2.4. Die Influenzavirus Pandemie im Jahr 2009 – Die Schweinegrippe/Neue Grippe (H1N1)

Die erste IAV Pandemie des 21. Jahrhunderts wurde im Juni des Jahres 2009 erklärt, nachdem im selben Jahr aus Mexiko die ersten Fälle gemeldet wurden (130). Als im April 2009 die Pandemie offiziell von der WHO erklärt wurde, konnten bereits aus 124 Ländern laborbestätigte 2009 H1N1 IAV Infektionen gemeldet werden (131). Entgegen der saisonalen Influenza sind während dieser Pandemie vor allem antizyklische IAV Infektionen in der nördlichen Hemisphäre verzeichnet worden. Die höchste Mortalität trat in infizierten

Personen zwischen 20 und 49 Jahren auf, wobei dies nur für die laborbestätigten Proben von Patienten der Studie gilt und länderabhängig sein könnte (132). Es gibt verschiedene Zahlen zur Mortalität der 2009 H1N1, wobei der WHO ~18 500 Fälle gemeldet wurden (133). Schätzungen zufolge verstarben zusätzlich ~201 000 Patienten mit zugrundeliegenden, respiratorischen Erkrankungen, sowie ~83 000 Patienten mit zugrundeliegenden Herzkreislaufkrankungen nach einer Infektion mit dem 2009 H1N1 Virus (134). Im August des Jahres 2010 wurde die 2009 Pandemie von der WHO für beendet erklärt, da neue Infektionen in Verhalten und Infektionsverlauf saisonalen Influenza Infektionen ähnelten (135). Seitdem zirkuliert das 2009 H1N1 Virus zusammen mit dem H3N2 IAV Subtyp in der humanen Bevölkerung (136).

1.1.9.3. Das Influenza A Virus – Eine Zoonose

Immer wieder kommt es zu Übertragungen von IAV vom Tier auf den Menschen. Die seit 2013 in China zirkulierenden H7N9 Viren (Kapitel 1.1.7) sind LPAIV Vertreter, die bei Infektionen für eine hohe Morbiditäts- sowie Mortalitätsrate in der humanen Bevölkerung sorgen (105). Deutlich besorgniserregender sind allerdings humane Infektionen verursacht durch HPAIV. Im Jahre 1997 wurden das erste Mal humane H5N1 HPAIV Infektionen in Hong Kong verzeichnet (101). Humane H5N1 HPAIV Infektionen werden seit 2003 von der WHO dokumentiert, wobei seit 2010 die meisten humanen Infektionen in Ägypten gemeldet wurden. Weltweit wurden 851 H5N1 HPAIV Infektionen mit 450 Todesfällen verzeichnet (137). Es wird vermutet, dass die hauptsächlich von den asiatischen und nordafrikanischen Kontinenten gemeldeten H5N1 HPAIV Infektionen im Menschen aufgrund des engen Zusammenlebens mit Hausgeflügel und Schweinen dort vermehrt auftreten. Zudem können mangelnde Aufklärung und mangelnde persönliche Schutzmaßnahmen während der Haltung, des Transports oder der Schlachtung der Tiere eine Rolle spielen (68, 94, 138, 139). Allerdings stellen nicht nur H5 HPAIV eine Gefahr für den Menschen dar. Seit 1996 wurden ebenfalls mehrere humane Infektionen mit H7 HPAIV dokumentiert. Der größte durch H7 HPAIV verursachte Ausbruch fand 2003 in den Niederlanden statt. Es wurden insgesamt 89 humane H7N7 Infektionsfälle verzeichnet, wobei einer der Infizierten, ein Veterinär, der direkten Kontakt zu infiziertem Geflügel gehabt hatte, an den Folgen der Infektion verstarb (99). 86 der infizierten Personen hatten während dieses H7N7 Ausbruchs in den Niederlanden Kontakt zu infiziertem Geflügel, weitere drei Personen infizierten sich durch Kontakt mit Arbeitern der Geflügelfarm (99). In den meisten Fällen beschränken sich H7 HPAIV Infektionen auf eine Konjunktivitis, in wenigen Fällen begleitet von grippeähnlichen Symptomen (99). Bisher ist allerdings keines der H7 HPAIVs in der Lage

effizient von Mensch-zu-Mensch zu transmittieren (94). Es wird allerdings befürchtet, dass H5 oder H7 HPAIV ihre Rezeptorbindespezifität ändern könnten und sich so an Säugetiere adaptieren könnten. Diese Eigenschaft der Mensch-zu-Mensch-Übertragbarkeit wird als eine der Grundvoraussetzungen für eine Pandemie angesehen (27). Zudem ist die humane Bevölkerung gegenüber H5 und H7 HPAIV vollständig immunologisch naiv. In Kombination mit der hohen Mortalität eines HPAIV, hätte eine solche Pandemie verheerende Folgen für die humane Bevölkerung (27). Um diese HPAIV besser verstehen zu können, haben zwei unabhängige Gruppen 2012 gezeigt, dass H5N1 HPAIV, die an Frettchen adaptiert wurden, in der Lage waren 4-5 Mutationen im HA zu erwerben, die diesem H5 HPAIV eine Transmissibilität durch Aerogene verliehen (28, 103). Frettchen werden seit den 1930er Jahren in der IAV Forschung verwendet und gelten als Goldstandard zur Untersuchung der humanen Influenza. Gründe dafür sind die große Ähnlichkeit in der Rezeptorverteilung im Respirationstrakt bei Menschen und Frettchen, sowie die auftretenden Symptome (Kapitel 1.2.3) während einer IAV Infektion in beiden Wirten (104). Diese beiden Studien, unter der Leitung von Yoshihiro Kawaoka und Ron Fouchier (28, 103), zur experimentellen Adaptation eines HPAIV an Frettchen wurden in der Fachwelt kontrovers diskutiert. Ein Grund dafür ist, dass H5 HPAIV bisher nicht die Fähigkeit besaßen über die Luft zu transmittieren und durch die experimentelle Adaptation an Frettchen solche Viren generiert wurden (28, 103). Da vermutet wird, dass der Respirationstrakt des Frettchens in Bezug auf die Expression von verknüpften Sialinsäuren dem des Menschen sehr ähnlich ist, wird davon ausgegangen, dass ein solches Aerogentransmittierbares H5 HPAIV im Falle einer Infektion in der humanen Bevölkerung eine verheerende Pandemie auslösen könnte (28, 94, 103). Zudem wird in solchen Viren stets eine Bedrohung durch die Möglichkeit des *dual use* gesehen, also dem potenziellen Gebrauch der Viren für bioterroristische Zwecke neben den eigentlichen Verwendungen in der Forschung (140-146). Dennoch ist eine Untersuchung säugetieradaptiver Mutationen in HPAIV von großer Bedeutung zur frühzeitigen Erkennung von Gefahren durch zirkulierende HPAIV. Des Weiteren dient der Erkenntnisgewinn der Vorbereitung auf eine HPAIV Pandemie, insbesondere in Bezug auf Vakzine und antivirale Medikamente (28, 80, 94, 103, 142, 146).

1.1.10. Pathogenese im Menschen

IAV sind hochinfektiös und können durch Aerosol- und Tröpfcheninfektion (Aerogentransmission), Kontakttransmission oder Schmierinfektion übertragen werden. Durch eine Anbindung des HA Proteins infizieren IAV meist zuerst Epithelzellen im oberen Respirationstrakt (Mund, Nase, Rachen), allerdings ist auch eine Infektion über die okuläre

Einleitung

Route möglich. Von dort können sich die Viren, je nach Virussubtyp, vor allem in den unteren Respirationstrakt ausbreiten, wobei die durchschnittlichen Inkubationszeiten zwischen 24 und 96 Stunden liegen (147-149). Eine IAV Infektion löst im Menschen die sogenannte Grippe aus. Typische Symptome dieser echten, viralen Grippe sind ein plötzlich eintretender Krankheitsbeginn mit Kopfschmerzen, starken Muskel- und Gliederschmerzen, hohem Fieber und Schüttelfrost. Diese Symptome werden durch die zelluläre Infiltration proinflammatorischer Zytokine ausgelöst. Im weiteren Verlauf der Infektion werden Schwächegefühl, Appetitlosigkeit sowie Körpertemperaturen bis 41 °C beobachtet (11). Es wurde auch das Auftreten von Diarrhö, Übelkeit und Erbrechen während IAV Infektionen dokumentiert. Durch diese Entzündungsreaktionen und die darauffolgende Lyse der Epithelzellen in den Atemwegen und der Trachea werden Schleimbildung sowie Ödeme, Halsschmerzen und ein für die Influenza typischer trockener Husten beschrieben (150). In Kindern wurden im Zusammenhang mit IAV Infektionen oft Mittelohrentzündungen beobachtet (150). Im Normalfall klingen IAV Infektionen im Menschen nach 7 bis 10 Tagen ab, wobei die vollständige Genesung in gesunden Individuen noch Tage oder Wochen andauern kann (11, 150). In seltenen Fällen kann sich während einer IAV Infektion eine primär virale, interstitielle und partiell hämorrhagische Pneumonie ausbilden. Solche schweren Krankheitsverläufe werden meist in vorerkrankten Personen, Menschen mit Erkrankungen oder Schwächungen des Immunsystems oder anderen den IAV Risikogruppen zugehörigen Personen (Kapitel 1.1.9.1) durch Infektion mit einem HPAIV oder einem epidemischen oder pandemischen IAV ausgelöst (6, 11). Die Permeabilität der Kapillaren nimmt durch die Zerstörung des Lungenepithels zu. Dies hat Hämorrhagien und Ödeme in den Kapillarzywischenräumen zur Folge (100). Daraus folgt oft eine Hypoxie des Patienten, welche unbehandelt nach wenigen Tagen lethal enden kann. Wenn das IAV in den Blutkreislauf eindringen kann, besteht zudem die Gefahr einer Virämie (134, 151, 152). Während Infektionen mit pandemischen H1N1 Viren sowie HPAIV des Subtyps H5 wurden sogenannte Zytokinstürme (*cytokine storm*) in Patienten beobachtet, die vermutlich für den tödlichen Ausgang der Infektion verantwortlich waren (29, 153). Ein Zytokinsturm bezeichnet eine Überreaktion des Immunsystems, die potenziell tödlich ist. Es kommt hierbei zu einer massiven, proinflammatorischen Immunantwort, die aufgrund von Kettenreaktionen nicht mehr vom Immunsystem eingegrenzt werden kann. Dabei gelangen Zytokine und Chemokine in den Blutkreislauf und verursachen einen systemischen Zytokinsturm, der meist von multiplem Organversagen begleitet wird (154, 155).

Eine weitere Gefahr während einer IAV Infektion sind bakterielle Koinfektionen, welche maßgeblich zu der Entwicklung einer Pneumonie beitragen können. Durch eine Minderung der Reaktivität des Immunsystems und einer bereits vorhandenen Entzündung der

Schleimhäute können *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* und auch *Haemophilus influenzae* den bereits Virusinfizierten Organismus koinfizieren (6, 156). Zudem sind HPAIV in der Lage den Körper systemisch zu infizieren (Kapitel 1.1.12). Im Fall einer Infektion des zentralen Nervensystems können Enzephalopathien auftreten (157, 158). Während einiger schwerer Krankheitsverläufe von IAV traten zudem Konjunktivitis, Myositis, Myokarditis sowie das Reye-Syndrom auf (6, 150, 159-161). Nur mittels Labordiagnose lässt sich eine Infektion mit IAV sicher durch den Nachweis von IAV Antigen, Virusisolation oder Isolation viraler RNA bestätigen (162). Oft werden der plötzliche Krankheitsbeginn, die Jahreszeit sowie Symptome der erkrankten Personen zur Diagnose genutzt, wobei dann die Diagnose der Influenza-ähnlichen Erkrankung gestellt wird (*influenza like illness*; ILI) (163).

1.1.11. Prävention und Therapie von Influenza A Virusinfektionen

Impfstoffe bieten die Möglichkeit eine IAV Infektion bereits in der Anfangsphase vom Immunsystem abwenden zu können. Es existieren verschiedene Impfstoffe gegen das Virus, wobei die Vakzine in embryonierten Hühnereiern oder Zellkulturen generiert werden und in Deutschland aus inaktivierten Influenza A und B Viren bestehen (29). Die momentan saisonal zirkulierenden IAV gehören zu den Subtypen H1N1 und H3N2. Die Impfstoffe der Grippesaison 2015/2016 enthielten daher Bestandteile folgender Virusstämme: A/California/7/2009 (H1N1) pdm09-ähnlich, A/Switzerland/ 9715293/2013 (H3N2)-ähnlich und B/Phuket/3073/2013 (164, 165). Um diese Impfstoffe zu entwickeln, werden weltweit in Referenzlaboren, wie beispielsweise in Deutschland im Robert Koch-Institut in Berlin, aktuell zirkulierende IAV genotypisiert. Global werden diese Genotypisierungsdaten von der WHO zusammengetragen. Mithilfe der gesammelten Daten über zirkulierende IAV werden zu Beginn jedes Jahres die jeweiligen Stämme für die Impfstoffherstellung von der WHO benannt (166). Im Gegensatz dazu wird im Falle einer Pandemie schnellstmöglich ein neuer passender Impfstoff basierend auf den aktuellen IAV Sequenzen generiert (11). Laut CDC ist die Vakzinierung gegen Influenza die beste Möglichkeit eine Infektion zu verhindern. Zudem sind antivirale Medikamente gegen IAV verfügbar, die nach einer IAV Infektion verabreicht werden können (167). Momentan gibt es nur wenige Medikamente zur Therapie und Prophylaxe von IAV Infektionen. Eine Klasse der Medikamente sind die M2 Ionenkanalhemmer der Adamantanderivate namens Amantadin und Rimantadin (168). Amantadin und Rimantadin gehören zu den Substanzen der trizyklischen, primären Amine (11). Diese beiden Substanzen hemmen die Freisetzung des Virusgenoms in einer Zelle und unterbrechen so den Replikationszyklus des IAV (46, 169). Allerdings entwickeln IAV sehr schnell während einer Therapie mit diesen Adamantanderivaten Mutationen im M2 Protein

Einleitung

als Ausweichmechanismus, weshalb diese Substanzen in der Regel nur sehr selektiv eingesetzt werden (11).

Eine weitere Klasse der gegen das IAV wirksamen Medikamente stellen die beiden Neuraminidasehemmer Oseltamivir und Zanamivir dar. Oseltamivir und Zanamivir sollten innerhalb der ersten 48 Stunden nach der Infektion verabreicht werden. Ihr Wirkmechanismus beruht auf der Hemmung der Neuraminidaseaktivität, die für die Ablösung der Nachkommenviren von der infizierten Wirtszelle essenziell ist (46, 169).

Beide oben beschriebenen Medikamentengruppen sind allerdings nur in der Lage eine vorhandene IAV Infektion einzudämmen, nicht aber vollständig zu bekämpfen. Daher wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl von weiteren neuen Medikamenten gegen IAV Infektionen entwickelt, wobei die klinischen Phasen dieser Medikamente größtenteils noch für mehrere Jahre andauern werden. Ein Medikament, das bisher in Deutschland nicht verkäuflich ist, sondern bisher nur in Japan lizenziert wurde, ist Peramivir, welches in Japan unter dem Handelsnamen Rapiacta bekannt ist. Es handelt sich hierbei um einen NA Inhibitor, der gegen IAV und Influenza B Viren wirksam ist (170). Ein weiteres Medikament mit einem neuen Wirkmechanismus ist das Favipiravir, auch genannt T-705. Der Wirkmechanismus dieses Medikaments ist noch nicht vollständig bekannt, wobei vermutet wird, dass die Polymerase des IAV durch T-705 gehemmt wird (171). Die erfolgreiche Entwicklung weiterer Medikamentenklassen gerichtet gegen IAV Infektionen, wäre einen großen Schritt im Kampf gegen die Influenza.

Trotz vorhandener Impfstoffe und Medikamente werden in einem interpandemischen Jahr 3-5 Mio. schwere Krankheitsverläufe in Patienten mit IAV Infektionen gemeldet, wovon zwischen 250 000 und 500 000 Patienten versterben (111). Aufgrund dieser hohen Infektions- und Mortalitätszahlen von Menschen nach Infektion mit IAV ist es dringend notwendig die Vakzine und Medikamentente weiterhin zu verbessern und neue wirksamere Impfungen und Medikamente zu generieren.

1.1.12. Adaptive Mutationen und virale Pathogenitätsdeterminanten in Säugetieren

Wie bereits in Kapitel 1.1.6 beschrieben, wird davon ausgegangen, dass IAV ihr natürliches Reservoir in wildlebenden Wasservögeln haben. IAV sind an diese Wirte ideal angepasst und zirkulieren in diesen (27). Da IAV auch andere Spezies infizieren (Kapitel 1.1.6), konnte gezeigt werden, dass durch den zugrundeliegenden Selektionsdruck in neuen Wirten eine Anpassung des Virus, sogenannte adaptive Mutationen im Virusgenom entstehen. Neue Mutationen ermöglichen dem Virus eine Adaptation an einen neuen Wirt und somit die

Generierung einer stabilen Viruslinie (3). Hierbei dient nicht nur das IAV Reservoir als Überträger für IAV, sondern auch sogenannte Zwischenwirte, wie beispielsweise das Schwein (81, 172). Komponenten im Virus sowie im Wirt können Pathogenitätsdeterminanten darstellen. Solche Determinanten konnten durch die Charakterisierung aviärer und humaner IAV detektiert und beschrieben werden (21, 173). Es wurden neben den Pathogenitätsdeterminanten auch Determinanten der Wirtsadaptation, sowie Transmissionsdeterminanten untersucht. In den nachfolgenden Absätzen sind die wichtigsten viralen Determinanten der Pathogenität und Transmission beschrieben.

1.1.12.1. Das Hämagglutinin des Influenza A Virus

Es konnte gezeigt werden, dass das HA Protein eine der wichtigsten Determinanten der Pathogenität darstellt (174). Neben seiner Rolle in der Pathogenität zeigt das HA Protein allerdings auch eine wichtige Rolle in der Transmission (28, 103).

Das HA Protein ist verantwortlich für die Rezeptorbindung an die Wirtszelle wobei sich die Bindspezifität der aviären und humanen IAV unterscheidet (Kapitel 1.1.4). Das HA spielt somit eine Rolle bei der Infektion der Zellen, die je nach Ort der Infektion die Transmissionseigenschaften des Virus beeinflussen kann (3, 28, 103). Mutationen in den Rezeptorbindestellen des HA Proteins stellen wichtige Virusdeterminanten dar, da diese Mutationen die Infektion im Wirt in Bezug auf Organ- und Gewebetropismus verändern können. Eine Änderung des Organtropismus eines Virus kann die Transmissioneffizienz modifizieren. Im Fall einer Änderung der Bindepräferenz von α 2,6-verknüpften zu α 2,3-verknüpften Sialinsäuren repliziert das Virus nicht mehr im oberen Respirationstrakt, sondern im Lungengewebe. Somit wird die Abgabe von Viren über Husten und Niesen erschwert, das Virus ist nicht mehr so transmissibel wie ein Virus das an α 2,6- verknüpften Sialinsäuren bindet und im oberen Respirationstrakt repliziert (6, 27). Eine solche Änderung der Bindepräferenz konnte durch die Mutationen HA_{Q222L} und HA_{G224S} gezeigt werden. Diese Mutationen sind in der Lage, die Bindepräferenz von α 2,3- an α 2,6- verknüpfte Sialinsäuren zu ändern (28, 175-178). Die Doppelmutation HA_{H103Y} und HA_{T156A} verstärkt die Bindung an α 2,3-verknüpfte Sialinsäuren. Im Fall einer Kombination von HA_{H103Y} und HA_{T156A} mit den Mutationen an Position 222 und 224 wird jedoch die Bindepräferenz an α 2,6-verknüpfte Sialinsäuren erhöht (28). Ebenfalls eine Änderung der Bindepräferenz konnte für die Kombination der beiden Mutationen HA_{N224K} und HA_{Q226L} (H3 Nummerierung) beschrieben werden. Auch hier erfolgt eine Veränderung der Bindepräferenz von α 2,3- zu α 2,6-verknüpften Sialinsäuren, sodass das Virus in der Lage ist an Epithelzellen der humanen Trachea zu binden (103).

Einleitung

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass der Austausch HA_{T156A} die N-Glykosylierung an dieser Stelle entfernt (28). Zur selben Zeit konnte eine andere Studie die Mutation HA_{N158D} für die Entfernung derselben potenziellen N-Glykosylierung in Zusammenhang bringen (28, 103). In vorhergehenden Studien konnte gezeigt werden, dass die Entfernung einer N-Glykosylierung die Rezeptorbindung und die Virulenz beeinflussen kann (28, 179-181).

Des Weiteren vermittelt das HA die Fusion der endosomalen Membran mit der Virusmembran und ermöglicht so ein Freisetzen der vRNPs in das Zytoplasma der Wirtszelle. Für Viren mit den Mutationen $HA_{N224K/Q226L}$ und $HA_{N158D/N224K/Q226L}$ konnte gezeigt werden, dass für eine Membranfusion ein höherer pH-Wert notwendig ist (103). Die Gruppe um Kawaoka vermutet in diesem Fall, dass eine Erhöhung des benötigten pH-Werts die Stabilität des HA Proteins verringern kann (103).

Der Austausch HA_{T318I} beschreibt eine weitere Mutation, die im Zuge der Adaptation eines H5N1 Virus an Frettchen beschrieben wurde (103). Die Position 318 befindet sich in der Nähe des HA Fusionspeptids, wobei gezeigt werden konnte, dass die HA_{T318I} Mutation den pH-Wert für die Fusion auf pH 5,5 reduzierte und somit die HA Stabilität erhöhte (103). Die Mutation HA_{T318I} mit der oben beschriebenen Mutation HA_{N158D} konnte das HA eines Virus mit HA_{N224K} und HA_{Q226L} weiterhin stabilisieren (103). Die erhöhte Stabilität eines Virus mit $HA_{N158D/N224K/Q226L/T318I}$ wurde hier mit einer Rezeptorbindepräferenz an $\alpha 2,6$ -verknüpfte Sialinsäuren und gleichzeitig einer Erhöhung der Aerogentransmission in Frettchen beschrieben (103). Es wird vermutet, dass die Transmission in Frettchen sehr stark von einer Ausgewogenheit der Funktionalität der Mutationen abhängig ist (103).

Um die Fusion durchführen zu können, muss das HA zuvor jedoch von Wirtszellproteasen aktiviert werden (6, 182). Wie bereits in Kapitel 1.1.7 beschrieben, kann das HA_0 -Vorläuferprotein entweder eine Mono- oder multi-BCS besitzen und so von unterschiedlichen Wirtszellproteasen gespalten werden (3, 27).

Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass das HA des IAV auch durch Wirtszellproteasen des humanen Atemwegsepitheliums sowie von bakteriellen Proteasen im Falle einer bakteriellen Koinfektion aktiviert werden kann (183). Die Spaltbarkeit des HA von IAV, verändert durch Mutationen in der Spaltstelle, ist eine der wichtigsten Determinanten des Organtropismus, da die erhöhte Pathogenität von HPAIVs in Geflügel diesen Pathogenitätsdeterminaten zugeschrieben wird (27). Durch Mutationen in der Spaltstelle konnte das ursprünglich LPAIV H7N3 Virus 2012 in Mexiko in Hühnern eine multi-BCS erwerben, und somit zum HPAIV in Geflügel werden (184).

Nach Adaptation eines H7N7 Virus an die Maus wurde die Mutation HA_{G214R} detektiert, allerdings nicht weiter charakterisiert. Da diese Mutation bisher nicht mit mausadaptierten

Mutationen in Zusammenhang gebracht wurde, wird davon ausgegangen, dass die HA_{G214R} Mutation H7N7-spezifisch ist (185).

1.1.12.2. Die Polymerase des Influenza A Virus

Als weitere wichtige Pathogenitäts- und Transmissionsdeterminanten wurden unter anderem der Polymerasen Komplex von IAV beschrieben (186, 187). Nach der Zellmembran gilt die Kernmembran der Wirtszelle als weiteres Hindernis. Wie im Replikationszyklus (Kapitel 1.1.5) beschrieben, findet die Replikation und Transkription von IAV im Zellkern der Wirtszelle statt. Beides ist somit von der Funktion der Kernimportmaschinerie der Wirtszelle abhängig (25). Eine wichtige Rolle spielen hierbei die verschiedenen Importin- α Proteine der Wirtszelle, die als Adaptorproteine zu transportierende Cargoproteine binden und den Kernimport vermitteln (25). Durch Mutationen in der viralen Polymerase und im NP erfolgt eine Anpassung dieser viralen Cargoproteine an verschiedene Importin- α Isoformen (21, 25, 188). Um effizient replizieren zu können, benötigen aviäre IAV Importin- α 3, wohingegen Importin- α 7 für säugeradaptierte IAV erforderlich ist (189, 190). Interessanterweise benötigen alle IAV zur effizienten Replikation Importin- α 1 (189). Es wird vermutet, dass die adaptiven Mutationen in viralen Proteinen, PB2_{E627K} und PB2_{D701N} in Kombination mit NP_{N319K}, an den Änderung der Importin- α Isoform Präferenz beteiligt sind (21, 25, 188).

Im PB2 Protein konnten weitere Pathogenitätsdeterminanten sowie Determinanten der Wirtsspezifität detektiert werden (191, 192). Eine der wichtigsten Mutationen in IAV ist hier die E627K Signatur (193). Diese Mutation an Position 627 wurde im Zusammenhang mit der Wirtsspezifität nach Adaptation an Säugetiere in Verbindung gebracht. Außerdem wurde PB2_{E627K} im Zusammenhang mit einer erhöhten Replikation im oberen Respirationstrakt im Säuger und einer somit resultierenden effizienteren Transmission im Meerschweinchenmodell beschrieben sowie einer erhöhten Pathogenität im Säuger (193-197). Eine weitere wichtige Mutation im PB2 Protein von IAV ist an Position 701. An dieser Stelle wird während der Adaptation eines aviären IAV an den Säuger die Asparaginsäure (D) in ein Asparagin (N) mutiert. Interessanterweise konnten bisher in keinem Isolat die PB2_{D701N} und PB2_{E627K} Mutation gleichzeitig festgestellt werden. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass beide Signaturen eine ähnliche Rolle spielen und ein gleichzeitiges Vorkommen im Protein ihre Funktion behindern würde (197).

In einem H1N1 Hintergrund konnte die Mutation PB2_{H357N} in Zusammenhang mit einer Erhöhung der Polymeraseaktivität sowie einer Erhöhung der Virulenz in Verbindung gebracht werden (198). Es konnte gezeigt werden, dass diese Mutation an Position 357 im PB2

Protein in der Tasche der Capbindung liegt und somit eine wichtige Rolle in der Anbindung an die 5'-Capstruktur spielt (199).

Das PB1 Protein von IAV kann ebenfalls eine wichtige Pathogenitätsdeterminante darstellen. Es konnte gezeigt werden, dass PB1_{N66S} die Virulenz von IAV in Mäusen erhöhen kann (200, 201). PB1_{N66S} liegt hierbei im viralen Protein PB1-F2, welches die Polymeraseaktivität sowie die Apoptoseantwort reguliert (6). Des Weiteren konnte die Mutation PB1_{R118I} nach einer Adaptation eines H7N7 Virus an die Maus detektiert werden, wobei diese Mutation bisher nicht weiter charakterisiert wurde (185).

1.1.12.3. Die Neuraminidase des Influenza A Virus

Als weitere wichtige Pathogenitäts- und Transmissionsdeterminante wurde zudem das Oberflächenprotein NA beschrieben (186, 187). Für die effiziente Replikation von IAV ist ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Bindeaffinität des HA Proteins und der NA Aktivität notwendig (185, 202, 203). Die Abtrennung der Viren durch die virale NA spielt eine wichtige Rolle in der Virusreplikation und somit der Virulenz (187, 204-206).

Die Mutation NA_{S372N} wurde nach einer Adaptation eines H7N7 Virus an die Maus detektiert, wobei diese Mutation bisher nicht weiter charakterisiert wurde (185). Eine Vielzahl von Mutationen im NA Protein wurden im Zusammenhang mit einer geringeren Sensitivität der Viren gegenüber Neuraminidase Inhibitoren beschrieben (207). Wie beispielsweise die NA_{R292K} Mutation, die bereits mehrfach in humanen H7N9 IAV Isolaten detektiert und mit einer Resistenz gegenüber des NA Inhibitors Oseltamivir in Verbindung gebracht werden konnte (208).

1.2. Tiermodelle in der Influenza A Virus Forschung

Tiermodelle spielen in der Influenzaforschung bereits seit Beginn des 20. Jahrhunderts eine wichtige Rolle. Nachweislich wurden bereits seit 1933 Nerze und Frettchen für Infektionsstudien von IAV verwendet (209). Heutzutage werden diese Labortiere hauptsächlich für die Untersuchung der Krankheitsverläufe, der Transmission, für Untersuchungen von Vakzin-Sicherheit und für die Untersuchung antiviral wirksamer Medikamente im Säugetier verwendet (104).

Tiermodelle zur Erforschung von IAV müssen sorgsam in Bezug auf Empfänglichkeit der Tiere für diese Viren, der Fähigkeit zu transmittieren, sowie der auftretenden Symptome nach einer Infektion ausgewählt werden (104, 210). Die für die vorliegende Arbeit relevanten

Tiermodelle zur Untersuchung der Pathogenität und Transmission von IAV werden im Folgenden kurz vorgestellt.

1.2.1. Das Mausmodell

Die Maus (*Mus musculus*) ist das weitverbreitetste Tiermodell in der IAV Forschung, da diese Tiere sich schnell vermehren, klein, kostengünstig und relativ einfach in der Haltung sind (104). Mäuse werden oft zur Bestimmung der Pathogenität von IAV verwendet. Allerdings sollte bei der Wahl der Mauslinie auf die Suszeptibilität des Virusstamms geachtet werden, da nicht alle Mauslinien mit allen IAV Stämmen infiziert werden können (104). Beispielsweise zeigen DBA/2J und A/J Mäuse eine höhere Suszeptibilität von mausadaptierten als auch nichtadaptierte IAV Stämmen. Im Gegensatz dazu wurde für BALB/c und C57BL/6 Mäuse eine geringere Suszeptibilität von IAV beschrieben (104). Dennoch sind BALB/c und C57BL/6 die am häufigsten verwendeten Mauslinien in der IAV Forschung (211-213). Die Empfänglichkeit der Mäuse für einen IAV Stamm kann durch die Rezeptorverteilung der Sialinsäuren erklärt werden, da im Respirationstrakt der Maus hauptsächlich α 2,3-verknüpfte Sialinsäuren exprimiert werden (214, 215). Wie bereits in Kapitel 1.1.4 beschrieben, präferieren humane IAV die Bindung an α 2,6-verknüpfte Sialinsäuren, weshalb ohne vorherige Adaptation humane IAV nur begrenzt in den meisten Mauslinien replizieren können. Um eine optimale Replikation der IAV im Mausmodell zu erzielen, wurden deshalb in einigen Studien IAV an Mäuse adaptiert (216-219). Nach Infektion zeigen Mäuse speziesspezifische Symptome einer IAV Infektion, wobei der Schweregrad der Symptome dabei von der Virusdosis und dem applizierten Virusstamm abhängig ist (104). Die Symptome einer schweren IAV Infektion in der Maus zeichnen sich durch struppiges Fell, Anorexie, Lethargie, Kauerhaltung und einen rapiden Gewichtsverlust aus (104). Der extreme Gewichtsverlust in Kombination mit Pneumonien, Lungenödemen und Entzündungen durch Infiltrationen von Immunzellen in der Lunge führen zum Tod, beziehungsweise zur Notwendigkeit humaner Endpunkte aufgrund definierter Kriterien (220-224).

Ein weiterer Vorteil des Mausmodells ist, dass die Tiere als Inzuchtstämme verfügbar sind, wodurch eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gewährleistet ist (80). Allerdings ist es in einem Inzucht Tiermodell nicht möglich eine Vielfalt der Genome zu simulieren, die zum Beispiel in Menschen vorhanden ist (80).

Die Maus als mögliches Tiermodell zur Untersuchung der Kontakt- sowie Aerogentransmission von IAV wird zum heutigen Zeitpunkt noch kontrovers diskutiert. Auch wenn in früheren Studien von Jerome Schulmann durchaus Transmission in verschiedenen

Mauslinien gezeigt werden konnte, ist eine Reproduktion dieser Daten bisher nicht gelungen (225-231). Die Ursachen der Diskrepanz der Ergebnisse dieser Studien ist bis heute unklar, wobei Unterschiede in den verwendeten Mauslinien und ihrer damaligen und heutigen Genetik, sowie der spezifisch pathogenfreie Status (*specific pathogen free*; SPF) und die Desinfektionsmaßnahmen bei den Ergebnissen durchaus eine Rolle gespielt haben können (104). Nach heutigem Kenntnisstand ist die Maus somit kein geeignetes Modell, um die Transmission von IAV zu studieren. Geeignete Modelle hierfür werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

Das Mausmodell eignet sich somit zur Beurteilung der Sicherheit und Wirksamkeit von influenzawirksamen Medikamenten sowie von Vakzinen und für Untersuchungen der Pathogenität von IAV (104).

1.2.2. Das Meerschweinchenmodell

Das Meerschweinchen (*Cavia porcellus*) ist als Tiermodell in der IAV Forschung weit verbreitet. Vorteile dieses Tiermodells sind die natürliche Suszeptibilität gegenüber humaner sowie aviärer IAV (112, 197, 231-240), die Fähigkeit zur Intraspezies-Transmission dieser Viren, die wenig anspruchsvolle Haltung und die einfache kommerzielle Erwerbbarkeit dieser Tiere (104). Ein großer Nachteil dieses Tiermodells allerdings sind fehlende Symptome nach einer Infektion mit IAV. Infizierte Meerschweinchen zeigen weder Gewichtsverlust, noch die oben erwähnten Infektionssymptome der Maus, was eine Bestätigung einer erfolgreichen Infektion erschwert. Eine Infektion kann so nur durch Nachweis von Virus in Nasenspülungen oder durch *post mortem* Untersuchungen durch histopathologische Veränderungen im Respirationstrakt nachgewiesen werden (104). In den meisten Fällen wird bis Tag 8 nach Infektion (8 d p.i.) das Virus vom Immunsystem geklärt (112, 197, 231-237, 239, 240).

Meerschweinchen werden in der IAV Forschung vermehrt zur Untersuchung der Transmission von IAV eingesetzt. Hierbei wird untersucht, ob Virus von infizierten Meerschweinchen auf nicht infizierte Meerschweinchen übertragen werden kann. Nicht infizierte Meerschweinchen werden als Sentineltiere bezeichnet, wobei diese Meerschweinchen intranasal mit PBS statt mit Virus behandelt wurden. Die Arten der Transmission werden im Modellorganismus in Transmission durch direkten Kontakt und Transmission durch Aerogene unterschieden. Die Transmission durch direkten Kontakt wird durch die gemeinsame Haltung von Sentinel-Meerschweinchen mit infizierten Meerschweinchen untersucht. Eine Transmission über Aerogene bezeichnet eine Transmission, bei der infizierte Tiere keinen direkten, sondern nur Luftkontakt zu einem Sentineltier haben. Das Sentineltier wird mit dem Virus über Luftkontakt eines infizierten

Tieres konfrontiert. Dieser Viruskontakt wird hergestellt, indem ein Luftstrom durch den luftdurchlässigen Käfig der infizierten Tiere in den luftdurchlässigen Käfig der Sentineltiere eingeleitet wird. Die Aerogentransmission kann durch große Tröpfchen als auch Aerosole vermittelt werden, wobei in einem Transmissionsversuch in der Regel keine Möglichkeit zur Bestimmung der Aerogengröße durchgeführt werden kann (104).

Das Hartley Meerschweinchen ist ein kommerziell erwerbbarer Auszuchtstamm, der üblicherweise für IAV Transmissionsversuche verwendet wird (104, 231, 232, 234, 241). Bis heute sind keine der Inzucht Meerschweinchenlinien kommerziell erwerbbar. Im Gegensatz zu Mäusen scheint allerdings die Meerschweinchenlinie keine übergeordnete Rolle für den Krankheitsverlauf und die Ergebnisse zu spielen (104).

Das Meerschweinchenmodell eignet sich somit als kostengünstige und pflegeleichte Alternative zu Frettchen, um die Transmission von IAV zu untersuchen (129).

1.2.3. Das Frettchenmodell

Das Frettchen (*Mustela putorius*) gilt in der Influenzaforschung als Goldstandard zur Untersuchung von humanen Infektionen mit IAV. Gründe dafür sind zum einen die ähnliche Rezeptorverteilung in Frettchen und Menschen, die eine ähnliche Suszeptibilität zu IAV hervorruft. Zudem ist der Infektionsverlauf im Frettchen nach einer Infektion mit IAV vergleichbar mit dem Infektionsverlauf im Menschen (28, 104). Aufgrund dessen wird das Frettchen seit den 1930er Jahren zum Studium von IAV verwendet (104). Im Jahre 1933 konnte zum ersten Mal ein IAV isoliert werden und in infizierten Frettchen aufgrund der Entwicklung von grippeähnlichen Symptomen die Anwesenheit eines Pathogens an Tag 3 p.i. nachgewiesen werden (209). Vorteile des Frettchenmodells sind die natürliche Suszeptibilität gegenüber den meisten natürlichen humanen IAV Isolaten ohne vorherige Adaptation. Die Viren replizieren, wie im Menschen, hauptsächlich im oberen Respirationstrakt. Die Symptome im Frettchen nach Infektion mit IAV sind Fieber, Nasale Obstipation sowie Rhinorrhoe, Appetitlosigkeit, Lethargie und Niesen (104, 209, 242). Interessanterweise zeigen Frettchen dem Menschen sehr ähnliche Symptome nach einer Infektion mit IAV, wobei Niesen meist nicht in Zusammenhang mit einer humanen IAV Infektion gebracht wird, für Frettchen ist dieses Symptom allerdings typisch (104, 243-246). Dieser Niesreflex in Frettchen wird sich bei Untersuchungen der viralen Belastungen im oberen Respirationstrakt zunutze gemacht. Der Niesreflex wird im Frettchen durch intranasales Einträufeln von Flüssigkeit ausgelöst (104, 247).

Die Forschungsarbeit mit Frettchen erweist sich aufgrund der Größe der Tiere, der aufwendigen Haltungsanforderungen und der hohen Kosten als schwierig (104). Wie

Meerschweinchen sind Frettchen ebenfalls nur als Auszuchtstämme erwerbbar, sodass Varianzen in den Versuchsergebnissen auftreten können (80). Die Verwendung von Auszuchtstieren hat den Vorteil, dass die genetische Diversität in Menschen besser modelliert werden kann (80).

In zwei unabhängigen Studien in 2012, konnte das Frettchen als Modell zur Transmission von H5N1 HPAIV verwendet werden, um die Gefahr dieser HPAIV Transmission im Menschen zu untersuchen (28, 103). Wie bereits in 1.2.2 für das Meerschweinchenmodell beschrieben, werden auch Frettchen für die Untersuchung der Transmissibilität von IAV eingesetzt (28, 103, 248).

1.3. Das SC35 Virus und seine frettchenadaptierte Variante SC35F – Ein Modellsystem zur Untersuchung der Mensch-zu-Mensch Transmission

Um molekulare Mechanismen der IAV Inter- und Intraspezies-Transmission besser verstehen zu können, wurde in dieser Arbeit ein frettchenadaptiertes H7N7 HPAIV namens SC35F verwendet (249). Das Parentalvirus des SC35F Virus ist das sogenannte SC35 Virus (Abbildung 5). Das SC35 hingegen wurde aus dem LPAIV A/Seal/Massachusetts/1/80 (H7N7) generiert. Dieses IAV Seehundisolat wurde während einer Epidemie von IAV aus dem Gemeinen Seehund (*Phoca vitulina*) isoliert (250). Es wird vermutet, dass die Epidemie in diesen Tieren bereits Ende des Jahres 1979 begann, da zu dieser Zeit in der Nähe von Boston, Massachusetts, USA, bereits eine hohe Mortalitätsrate in diesen Tieren beobachtet werden konnte (250). Das A/Seal/Massachusetts/1/80 (H7N7) Virus wurde aus einer postmortalen Probe eines Seehunds mit primärer, viraler Pneumonie isoliert. Das Organhomogenisat aus dem Seehund wurde dann in embryonierten Hühnereiern propagiert. Nach weiteren Analysen konnte festgestellt werden, dass das Seehundisolat dem A/FPV/Dutch/27 (H7N7) in Bezug auf die Antigen Charakteristika ähnelt. Trotz der antigenen Ähnlichkeit repliziert das A/Seal/Massachusetts/1/80 (H7N7) Virus im Gegensatz zu dem *Fowl Plaque Virus* (FPV) von 1927 bevorzugt in Säugerzellen (250). Des Weiteren konnte eine Homologie aller Gensegmente zu aviären IAV durch kompetitive Hybridisierungsversuche festgestellt werden (249). Das Isolat aus Seehunden repliziert in diesem Wirt im Respirationstrakt, wie durch die Pneumonien der verendeten Seehunde gezeigt wurde (250). Interessanterweise hat das Isolat aus dem Seehund ein Wirtsspektrum, welches den meisten IAV Isolaten aus Säugetieren ähnelt. Das A/Seal/Massachusetts/1/80 (H7N7) Virus kann in den Respirationstrakten von Schweinen, Katzen, Hunden, Meerschweinchen, Frettchen sowie Mäusen replizieren (250). Des Weiteren ist es in der Lage in humanen Konkunktividen (*Tunica conjunctiva*) zu replizieren, allerdings verläuft die

Infektion in experimentell infizierten Hühnern asymptomatisch (250). Trotz einer hohen Homologie des A/Seal/Massachusetts/1/80 Virus scheint dieses Virus besser im Säuger zu replizieren als in seinem ursprünglichen aviären Wirt (250). Das A/Seal/Massachusetts/1/80 Isolat wurde durch mehrere Passagen in Hühnerembryozellen (*chicken embryo cells*; CE Zellen) zurück an die aviäre Spezies adaptiert. Zur Adaptation wurde zuerst sporadisch exogenes Trypsin zu den CE Zellen zugegeben, anschließend wurde das Virus vollständig trypsinfrei passagiert. Dies war möglich, da das Virus während der Passagierung Insertionen von zusätzlich drei Argininen (RRR) in der Spaltstelle im HA erwarb, und somit eine multi-BCS erhielt und folglich auch durch ubiquitär exprimierte Proteasen gespalten werden kann (251). Die Passage 34 aus CE Zellen beschreibt das Virus SC35, das im Gegensatz zum Seehundisolat durch die multi-BCS im HA eine 100 % Mortalität in Hühnern und auch eine systemischen Infektion in diesem aviären Wirt auslöst (251). Im nächsten Schritt wurde dieses Virus wieder an den Säuger adaptiert. Dazu wurde das SC35 Virus durch 11-fache serielle Passagierung von 10 % Lungenhomogenisat an die Maus adaptiert, bis eine 100 % Mortalität in den Mäusen gezeigt wurde (249). Das Resultat der Adaptation an die Maus führte zur Virusvariante SC35M (249). Eine weitere Virusvariante stellt das frettchenadaptierte SC35F Virus dar (249). Das SC35F Virus wurde durch die initiale Infektion eines Frettchens mit SC35 und einer darauffolgenden Passagierung von 10 % Lungenhomogenisat in Frettchen generiert (249). Jedoch ist die Anzahl der Passagen, die SC35 bis zur Entstehung des SC35F Virus durchlaufen hat, unbekannt. Die Passagierung von Lungenhomogenisat im Frettchen wurde so lange durchgeführt, bis die Mortalitätsrate in Frettchen von 0 % (SC35) auf 100 % (SC35F) gesteigert werden konnte (249).

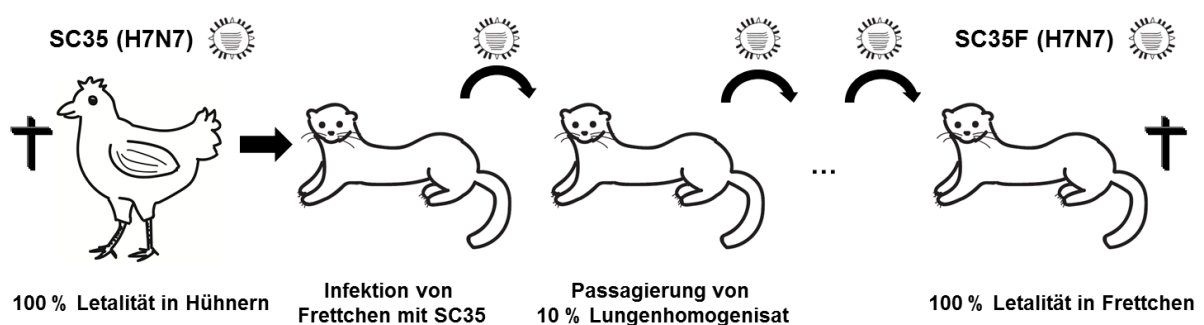


Abbildung 5: Die Geschichte der Generation des SC35F Virus; eine Illustration.

Das Virus SC35 (H7N7) ist hochpathogen in Hühnern. Das SC35 Virus wurde zur initialen Infektion von Frettchen verwendet. Im Anschluß wurde eine serielle Passagierung von 10 % Lungenhomogenisat in Frettchen durchgeführt, bis eine Mortalitätsrate in infizierten Frettchen von 100 % detektiert wurde (illustriert nach Scheiblauber *et al.*, 1995 (249) von C. Dreier, 2016).

Zur Charakterisierung in der Maus wurde das SC35F Virus intranasal (i.n.), intrazerebral (i.c.) oder intravenös (i.v.) mit 10^6 *plaque forming units* (p.f.u.) in Mäuse appliziert. Die Mortalitätsrate lag in infizierten weiblichen, 6 Wochen alten NMRI Mäusen ($n=6-10$) bei ebenfalls 100 % (249). Die Maus lethale Dosis 50 (*mouse lethal dose 50*, MLD_{50}) sowie die Sequenzen von SC35F wurden zu dieser Zeit nicht definiert (249). Detaillierte Sequenzanalysen und Charakterisierungen der SC35F-spezifischen Mutationen *in vivo* werden nachfolgend in dieser Arbeit beschrieben.

Mit der Adaptation eines H7N7 HPAIV an das Frettchen wurde ein experimentelles Modellsystem zur Untersuchung der Transmission von HPAIV im Menschen generiert. Das Frettchen gilt, wie bereits oben beschrieben (Kapitel 1.2.3), als Goldstandard zur Untersuchung der Pathogenität und Transmissibilität von IAV (104). Ein Grund dafür ist, dass die Rezeptorverteilung sowie die Symptomatik nach einer IAV Infektion in Frettchen, der Symptomatik des Menschen sehr ähnlich ist (28).

Das Modellvirus SC35F eignet sich zur Identifizierung adaptiver Mutationen sowie Pathogenitätsdeterminanten im Säuger. Durch die Charakterisierung der SC35F-spezifischen Mutationen erhoffen wir uns die Vorgänge im viralen Genom während der Adaptation von HPAIV an Säugetiere besser verstehen zu können. Dieses bessere Verständnis soll weiterhin dazu beitragen HPAIV mit pandemischem Potenzial frühzeitig erkennen und eindämmen zu können, um eine H7 Virus Pandemien zu verhindern.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Die zunehmende Anzahl humaner H7 IAV Infektionen verdeutlichen die Gefahr welche von aviären IAV ausgehen können. Von großer Bedeutung ist das Verständnis der Pathogenitätsdeterminanten dieser Viren, sowie des pandemischen Potenzials, welche Viren in sich bergen. Durch den Erkenntnisgewinn können die Risiken von neu entdeckten oder in Geflügel zirkulierenden Viren leichter abgeschätzt werden, zudem erleichtern gewonnene Informationen die Entscheidung für präventive Impfungen oder neue Therapieansätze in der humanen Bevölkerung.

Virale Mechanismen während der Adaptation von HPAIV an Säugetiere sind bisher nicht ausreichend erforscht. Daher wurden in dieser Arbeit mithilfe des parentalen SC35 HPAIV (H7N7) und des frettchenadaptierten SC35F HPAIV (H7N7) Virulenz- und Transmissibilitätsdeterminanten bestimmt.

Einleitung

Die folgenden Schlüsselfragen wurden in der vorliegenden Arbeit geklärt:

- 1) In welchen Mutationen unterscheidet sich SC35F von dem parentalen Virus SC35?
- 2) Welche viralen Funktionen werden durch diese SC35F-spezifischen Mutationen beeinflusst?
- 3) Welche adaptiven Mutationen tragen zu einer erhöhten Pathogenität im Mausmodell bei?
- 4) Welche viralen Determinanten tragen zu einer erhöhten Transmission im Meerschweinchenmodell bei?

2. Material

2.1. Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
4-Methylumbelliferyl N-Acetylneuraminsäure (4-MUNANA)	Sigma-Aldrich
Agarose	Serva
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	DAKO
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Thermo Fischer Scientific (Kit SuperScript III)
Ethanol (EtOH)	Merck
Ethidiumbromid	Fluka
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich
Eukitt	Kindler
Glycerol "UltraPure™ Glycerol"	Invitrogen
Glykogen (<i>Mytilus edulis</i>)	Sigma-Aldrich
Glyzin	Geyer Th.
Hämatoxylin	Shandon
Isopropanol (2-Propanol)	Fluka
Jodlösung (I ₂), volumetrisch, 0,5 M I ₂ (1,0 N)	Fluka
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich
Kristallviolett	Merck
Lipofectamin®2000	LifeTechnologies
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck
Methanol (CH ₄ O)	ChemSolute
Natriumchlorid (NaCl)	Geyer Th. GmbH & Co.KG
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich

Material

Paraffin (niedrigschmelzend)	DCS
Paraformaldehyde (PFA; $\text{OH}(\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}_{(n=8-100)}$)	AppliChem
Ottix Plus	DiaPath
Ottix Shaper	DiaPath
Paraformaldehyd (PFA)	4 % PFA (AppliChem) in 1x PBS
PBS-Tween (0,05 %)	0,05 % Tween-20 (Serva) in 1x PBS
Salzsäure (HCl)	Merck
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Geyer Th. GmbH & Co.KG
Tween-20 ($\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$)	Serva
Wasser (H_2O)	Millipore Anlage
Wasserstoffperoxid (H_2O_2)	Merck

2.2. Desinfektionsmittel

Bezeichnung	Hersteller
Ethanol, vergällt	Geyer Th. GmbH & Co.KG
Pursept-A Xpress	SCHÜLKE & MAYR AG
Sterillium	Bode
Virkon S	DuPont

2.3. Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
4 % PFA	4 % PFA in 1x PBS
10 % EDTA	10 % EDTA in H_2O , dd pH 7,4
Blocking-Puffer (IHC-P)	10 % Eseserum in 1x PBS
Citrat Plus Puffer (10x)	DCS
Kalzium TBS Puffer mit 4-MUNANA	6,8 mM CaCl_2 0,85 % NaCl 0,02 M TRIS 40 μM 4-MU-NANA pH 7,3

Material

Kristallviolettlösung	37 % Formaldehyd in H ₂ O, dd 1 g Kristallviolett auf 1 l
PBS (10x)	26,8 mM KCl (Carl Roth) 17,6 mM KH ₂ PO ₄ (Merck) 1,37 M NaCl (Merck) 51,3 mM Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O (Merck) ad. 1 l H ₂ O, dd pH 7,4
PBS-T (1x)	0,1 % Tween-20 in 1x PBS
Stopp Puffer	0,1 M Glyzin Puffer 25 % Ethanol pH 10,7
TBE Puffer (10x)	108 g TRIS 55 g Borsäure 9,3 g EDTA ad 100 ml H ₂ O, dd pH 8,3

2.4. Kits

Bezeichnung	Hersteller
Avidin/Biotin Blocking Kit SP2001	Biozol
Dual Luciferase® Reporter Assay System	Promega
Nucleo Bond Maxi Kit	Macherey Nagel
Phusion HotStart® II	Thermo Fischer Scientific
QIAamp Viral RNA Mini Kit	QIAGEN GmbH
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN GmbH
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH
SuperScript® III	Thermo Fischer Scientific
ZytoChemPlus (HRP) Broad Spectrum (DAB) Kit	Zytomed

2.5. Enzyme und Zusätze

Bezeichnung	Hersteller
6x Mass Ruler Loading Dye Solution	Thermo Fischer Scientific
BsmBI, Restriktionsenzym	Fermentas
cytidine-5'-monophospho-N-acetylneuraminic acid sodium salt (CMP)	Sigma-Aldrich
dNTPs Mix, PCR grade [10mM]	QIAGEN GmbH
<i>DpnI</i> , Restriktionsenzym	Fermentas
<i>EcoRI</i> , Restriktionsenzym	Fermentas
MassRuler DNA Ladder Mix, 80-10 000 bp	Fermentas / Thermo Scientific
Neuraminidase aus <i>Vibrio cholerae</i>	Roche
<i>NheI</i> , Restriktionsenzym	Fermentas
RiboLock RI (RNase Inhibitor)	Thermo Fischer Scientific
<i>SacI</i> , Restriktionsenzym	Fermentas
<i>SmaI</i> , Restriktionsenzym	Fermentas
<i>SSpI</i> , Restriktionsenzym	Fermentas
α 2,3-Sialyltransferase aus <i>Pasteurella multocida</i>	Sigma-Aldrich
α 2,6-sialyltransferase aus <i>Photobacterium damsela</i>	Sigma-Aldrich

2.6. Materialien für eukaryotische Zellkulturmedien

Bezeichnung	Hersteller
Albumin Lösung, bovin (BSA; 35 % in DPBS)	Sigma-Aldrich
Avicel (mikrokristalline Zellulose)	IMCD
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich
Dulbecco's PBS (1x)	Sigma-Aldrich
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA
L-Glutamin 200 mM	Sigma-Aldrich
Minimal Essential Medium (MEM)	Sigma-Aldrich
Modified Eagle Medium 2x (2x MEM)	Sigma-Aldrich
Opti-MEM	Gibco
Penicillin und Streptomycin (P/S, 100x)	Sigma-Aldrich

2.7. Eukaryotische Zellkulturmedien

Bezeichnung	Hersteller
Avicel Lösung	2,5 % Avicel in 1x PBS
Infektionsmedium für MDCK	MEM 0,2 % BSA 1 % L-Glutamin 1 % Penicillin und Streptomycin
Kryokonservierungsmedium für Zellen	FCS 10 % DMSO
Transfektionsmedium für HEK293T	DMEM 10 % FCS 1 % L-Glutamin
Überlagerungsmedium für Plaque Tests	50 % Zweifach Medium für Plaque test 50 % Avicel Lösung
Wachstumsmedium für HEK 293T	DMEM 10 % FCS 1 % L-Glutamin 1 % Penicillin und Streptomycin
Wachstumsmedium für MDCK	MEM 10 % FCS 1 % L-Glutamin 1 % Penicillin und Streptomycin
Zweifach Medium für Plaque test	2x MEM 0,4 % BSA 2 % L-Glutamin 2 % Penicillin und Streptomycin

2.8. Materialien für prokaryotische Zellkulturmedien

Bezeichnung	Hersteller
Ampicillin (100 mg/ml)	Serva
Bakto Agar	BD Biosciences
Glukose	Merck
Hefeextrakt	AppliChem
Pepton	AppliChem
Trypton	Sigma-Aldrich

2.9. Prokaryotische Zellkulturmedien

Bezeichnung	Hersteller
Kryokonservierungsmedium für Bakterien	50 % LB-Amp-Medium 50 % Glycerol
LB Agar Ampicillin 100	LB Medium Ampicillin 100 1,5 % Bakto-Agar
LB Medium Ampicillin 100	10 g/l Pepton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl pH 7,5 0,1 mg/ml Ampicillin
SOC Medium	5 g/l Hefeextrakt 20 g/l Trypton 0,6 g/l NaCl 0,25 g/l KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glukose pH 6,8-7

2.10. Primer

Die nachfolgend dargestellten Oligonukleotide wurden zur Sequenzierung, Genotypisierung des Virusgenoms und zur zielgerichteten Mutagenese von Plasmid-DNA entworfen. Gestaltet wurden die Oligonukleotide mithilfe des Clone Managers (v.9) oder des Agilent Technologies QuikChange Primer Design Programms (Online Version) (252). Die Synthese der Oligonukleotide wurde von Sigma-Aldrich durchgeführt. Hier dargestellt sind die Bezeichnungen der Oligonukleotide (Primer) und deren DNA Sequenzen. Sequenzen der 1918 Primer sowie des universellen Primers in Kapitel 2.10.1 wurden zuvor publiziert (253, 254).

2.10.1. Sequenzierungs- und Genotypisierungsprimer

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'
HA-SC35-1480-fw	GACGACCAATGTATGGAGAG
HA-SC35-263-rev	GGTCCTATTAGGGTTCCTAG
HA-SC35-387-fw	GTCAGGAGGAGTCGATAAAG

Material

HA-SC35-609-fw	GACTACCGAACAGACCAGAC
HA-SC35-722-rev	CCATTCACCTTGTGGCCGTGC
HA-SC35-754-fw	CTCCTTGATCCCAATGACAC
M-SC35-259-rev	GCGTCTACGCTGCAGTCC
M-SC35-601-fw	GGCAGGGTCGAGTGAACAAG
NA-SC35-718-fw	CAATGGAACCTGTGTAGTAG
NA-SC35-866-rev	GCCCATAGCACGAGCATTCC
NP-SC35-360-rev	CATCCATTTCCCATCTCTCCTCC
NP-SC35-988-fw	CTTATCAGACCCAACGAAAATCC
NS-SC35-302-rev	GTCAGTTAGGTAGCGTGAAG
NS-SC35-516-fw	CCTTCTCTTCCAGGACATAC
PA-SC35-1213-rev	CATCGCTGTCATACTGTTTC
PA-SC35-1496-fw	CCAAAGAAGGACGACGGAAG
PA-SC35-1700-rev	CTTGATACTTGGCCTATTGC
PA-SC35-562-fw	CAAGAAATGGCCAGTAGAGG
PA-SC35-696-rev	GGAGAAGTTCGGTGGGAGAC
PA-SC35-969-fw	CGGCTGGAAAGAGCCTAAC
PB1-SC35-1121-fw	CACAGATACCAGCAGAAATG
PB1-SC35-1257-rev	CATGCCCATCATCATTCCAG
PB1-SC35-1657fw	CAAATGGCTCTTCAGCTATTC
PB1-SC35-1787-rev	CCTGCCTTTGAGCGGTTTG
PB1-SC35-491-fw	CGGCTAATGAATCAGGAAGG
PB1-SC35-612-rev	GGTCATGTTGTCCCTTAC
PB2-SC35-1116-fw	CACAATGGTTGGGAGAAGAG
PB2-SC35-1267-rev	CTGCTTTGATCATGCAATCC
PB2-SC35-1691-fw	GGAAGTGGGAAACTGTGAAG
PB2-SC35-1843-rev	CATCTCGCATTTGCTGGAAC
PB2-SC35-556-fw	CTAACATCGGAATCACAAAC
PB2-SC35-724-rev	GCAACACCTCAATATACAC
pHW2000-1918-HA-fw	GAAGTTGGGGGGGAGCAAAAGCAGGGG
pHW2000-1918-HA-rev	CCGCCGGGTTATTAGTAGAAACAAGGGTG
pHW2000-1918-M-fw	GAAGTTGGGGGGGAGCAAAAGCAGGTAG
pHW2000-1918-M-rev	CCGCCGGGTTATTAGTAGAAACAAGGTAG
pHW2000-1918-NA-fw	GAAGTTGGGGGGGAGCGAAAGCAGGAGT
pHW2000-1918-NA-rev	CCGCCGGGTTATTAGTAGAAACAAGGAGT
pHW2000-1918-NP-fw	GAAGTTGGGGGGGAGCAAAAGCAGGGTA
pHW2000-1918-NP-rev	CCGCCGGGTTATTAGTAGAAACAAGGGTATTTTT
pHW2000-1918-NS-fw	GAAGTTGGGGGGGAGCAAAAGCAGGGTG
pHW2000-1918-NS-rev	CCGCCGGGTTATTAGTAGAAACAAGGGTG

Material

pHW2000-1918-PB1-fw	GAAGTTGGGGGGGAGCGAAAGCAGGCAAAC
pHW2000-1918-PB1-rev	CCGCCGGGTTATTAGTAGAAACAAGGCATTT
pHW2000-1918-PB2-fw	GAAGTTGGGGGGGAGCGAAAGCAGGTC
pHW2000-1918-PB2-rev	CCGCCGGGTTATTAGTAGAAACAAGGTCGTTT
pHW2000-2723-fw	GGCGTGGATAGCGGTTTTGAC
pHW2000-443-rev	GACAATGCGATGCAATTTCC
Universeller Primer 12	AGCAAAAGCAGG

rev: Primer für die inverse Verlängerung des Genoms

fw: Primer für die vorwärts Verlängerung des Genoms

2.10.2. Primer für die zielgerichtete Mutagenese

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'
PB2-c1096a	AAACACTGAAAATACGAGTGAATGAGGGGTATGAAGAGTTC
PB2-c1096a-gegenläufig	GAACCTTTCATACCCCTCATTCACTCGTATTTTCAGTGTTT
PB1-t62g	CGACTTTGCTTTTCTTGAAGATTCCAGCGCAAATGCCAT
PB1-t62g-gegenläufig	ATGGCATTTTGCCTGGAATCTTCAAGAAAAGCAAAGTCG
NA-g1004t	ACAGACACAAGCAGACCATCAGACAAATCAATAGGAG
NA-g1004t-gegenläufig	CTCCTATTGATTTGTCTGATGGTCTGCTTGTGTCTGT
HA-t353c	TGCTATCCTGGGAAGTTCACAAATGAAGAATCACTGAGG
HA-t353c-gegenläufig	CCTCAGTGATTCTTCATTTGTGAACCTCCAGGATAGCA
HA-g457t	GGAATAAGAACCAATGGAACAACAAGTTCCTGCAGAAGATCA
HA-g457t-gegenläufig	TGATCTTCTGCAGGAACCTTGTGTTCCATTGGTTCTTATTCC
HA-g1039a	GAATCCAAAGACCAGAAGACGGAGGGGGCTTTT
HA-g1039a-gegenläufig	AAAAGCCCCCTCCGTCTTCTGGTCTTTGGATTCC
HA-Deletion-1036-1044	CAGAGAATCCAAAGACC_AGGGGGCTTTTTGGAGC
HA-Deletion-1036-1044-gegenläufig	GCTCCAAAAGCCCCCT_GGTCTTTGGATTCTCTG

SC35F-spezifische Nukleotidmutationen sind fett markiert; die Deletion von 9 nt ist hier mit _ markiert

2.11. Plasmide

Bezeichnung/Erklärung	Quelle/Generiert mittels
pHW2000-ccdB; Leervektor	Reverse Genetik (255)
pPoll-NP-Luc (human): Luciferase-Reporter (<i>Photinus pyralis</i>) unter humanem Polymerase I-Promotor. Mit 3'- und 5'-Enden nicht-kodierender Regionen von A/WSN/33 (H1N1) Virus.	(188)
pRenilla-TK Luciferase-Reporter	Promega

Material

(*Renilla reniformis*)

pHW2000-SC35-PB1

pHW2000-SC35-PB2

pHW2000-SC35-PA

pHW2000-SC35-HA

pHW2000-SC35-NP

pHW2000-SC35-NA

pHW2000-SC35-M

pHW2000-SC35-NS

pHW2000-SC35F-PB1

pHW2000-SC35F-PB2

pHW2000-SC35F-HA

pHW2000-SC35-HA_{111T}

pHW2000-SC35-HA_{A146S}

pHW2000-SC35-HA_{G340R}

pHW2000-SC35F-HA_{monobasisch}

pHW2000-SC35F-NA

Reverse Genetik/Eukaryotische
Proteinexpression (188)

Reverse Genetik/Eukaryotische
Proteinexpression (188)

Reverse Genetik/Eukaryotische
Proteinexpression (188)

Reverse Genetik/Eukaryotische
Proteinexpression (188)

Reverse Genetik/Eukaryotische
Proteinexpression (188)

Reverse Genetik/Eukaryotische
Proteinexpression (188)

Reverse Genetik/Eukaryotische
Proteinexpression (188)

Reverse Genetik/Eukaryotische
Proteinexpression (188)

Zielgerichtete Mutagenese

Zielgerichtete Mutagenese

Zielgerichtete Mutagenese

Zielgerichtete Mutagenese

Zielgerichtete Mutagenese

Zielgerichtete Mutagenese

Zielgerichtete Mutagenese

Zielgerichtete Mutagenese

2.12. Virusstämme

Bezeichnung (Subtyp)

Quelle/Generiert mittels

SC35 (H7N7)

Phillips Universität Marburg, Marburg
Deutschland, Prof. Dr. Klenk

SC35F (H7N7)

Phillips Universität Marburg, Marburg
Deutschland, Prof. Dr. Klenk

SC35F-HA_{monobasisch} (H7N7)

Reverse Genetik

SC35-PB2_{SC35F} (H7N7)

Reverse Genetik

SC35-PB1_{SC35F} (H7N7)

Reverse Genetik

SC35-HA_{SC35F} (H7N7)

Reverse Genetik

SC35-HA_{111T} (H7N7)

Reverse Genetik

SC35-HA_{146S} (H7N7)

Reverse Genetik

Material

SC35-HA _{340R} (H7N7)	Reverse Genetik
SC35-NA _{SC35F} (H7N7)	Reverse Genetik
A/Netherlands/213/03 (H3N2)	Erasmus University Rotterdam, Rotterdam Niederlande, Dr. Thijs Kuiken
Rekombinantes PR8 Virus: 7 Gensegmente von A/PR/8/34 (H1N1) und das HA _{monobasisch} von A/Vietnam/11/94 (H5N1).	Erasmus University Rotterdam, Rotterdam Niederlande, Dr. Thijs Kuiken

2.13. Antikörper und Seren

Bezeichnung/generiert in	Verdünnung	Anwendung	Quelle
anti-FPV, polyklonal/ Kaninchen	1:2000	Histologie, IHC-P	Prof. Klenk, Institut für Virologie, Marburg, Deutschland
anti-Kaninchen Biotin, (#711-066- 152)/ Esel	1:200	Histologie, IHC-P	Jackson ImmunoResearch
Eselserum	10 %/ 2 %	Histologie, IHC-P	Abcam

2.14. Pro- und Eukaryotische Zellen

Bezeichnung	Quelle
<i>E. coli</i> - XL-10 gold, Kompetente Zellen (Genotyp: Tet ^r $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1lac Hte [F' proAB lacIrZ\Delta M15 Tn10 (Tetr) AmyCamr)$	Heinrich-Pette-Institut
HEK293T	Phillips Universität Marburg, Marburg Deutschland, Prof. Dr. Klenk
MDCK II	Phillips Universität Marburg, Marburg Deutschland, Prof. Dr. Klenk

2.15. Geräte und Werkzeug

Bezeichnung	Hersteller
Autoklav, feststehend	Schlumbohm
Autoklav, mobil	Schlumbohm
Badumwälz-Thermostat Precitherm PFV	Labora Mannheim
Chirurgische Feinpinzette	Fine Science Tools
Chirurgische Feinschere	Fine Science Tools

Material

Chirurgische Standard-Pinzette	Fine Science Tools
CO ₂ Inkubator BBD6220	Thermo Scientific
CO ₂ Inkubator Heracell 150	Thermo Scientific
Digitalkamera SZ-10	Olympus
Durchlichtmikroskop Axioskop 2	Zeiss
Durchlichtmikroskop IM	Zeiss
Eierprüflampe	Fritz Gössner
Eismaschine, Flockeneis	Scotsman
Feinwaage Extend	Sartorius
Geldokumentationssystem Gel Doc XR	Bio-Rad
Gelelektrophoresesystem Sub-Cell GT	Bio-Rad
Gewebeinfiltrationsautomat, Vakuum, ASP300	LEICA
Isofluran Verdampfer "Vaporizer"	UNO
Knochenschere Bone Shears	Fine Science Tools
Luftstromschrank „UniProtect“ -	Zoonlab
Laminarluftstromschrank	
Magnetrührer MR3001	Heidolph
Magnetrührer MR80	Heidolph
Mehrkanalpipette (8 Kanäle, 5-50 µl/20-200 µl)	Brand
Mikrotiterplatten Lesegerät Tecan Safire2	Tecan
Mikrotiterplatten Lesegerät Tristar LB 941	Berthold Technologies
Mikrotom HM325	Microm
Mikrowellenofen R-647	Sharp
Mr. Frosty, Kryokonservierungscontainer	Nalgene
PCR-Gerät GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems
Paraffingießstation, EG1160	Leica
pH-Messgerät 766 Calimatic	Knick
Pipetten Eppendorf Reference (1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Präzisionswaage ED224S	Sartorius
Reinstwassersystem Milli Q Aca	Millipore
Schleusenautoklav, BSL-3 Labor	MMM
Schüttelwasserbad SW-22	Julabo
Schwingmühle MM400	Retsch
Spektralphotometer Nanodrop 1000	Peqlab
Sterilwerkbank Herasafe KS 12	Thermo Scientific
Sterilwerkbank Herasafe KS 18	Thermo Scientific
Thermomixer Comfort	Analytik Jena

Material

Tierwaage	Kern
Trockenschrank	Memmert
Ultrazentrifuge Optima LEV80K	Beckman Coulter
Ultrazentrifuge Rotor SW28	Beckman Coulter
Vortex-Mixer 7-2020	neoLab
Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge Avanti J-E	Beckman Coulter
Zentrifuge Biofuge Pico	Heraeus
Zentrifuge Multifuge 3S-R	Heraeus
Zentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus

2.16. Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
24-Vertiefungsplatte, Zellkultur	Becton Dickinson
6-Vertiefungsplatte, Zellkultur	Becton Dickinson
96-Vertiefungsplatte mit V-Boden	NUNC
96-Vertiefungsplatte, schwarz, flacher Boden	NUNC
Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Unit mit Ultracel-100 Membran (100 kDA MWCO)	Merck Millipore
Applikatoren, steril	Böttger
Bastelkleber, ohne Lösungsmittel	UHU
Bepantene Augensalbe	Bayer Vital GmbH
EDTA Röhrchen 1,5 ml	KABE
EDTA Röhrchen 10 ml	SARSTEDT
EDTA-Kapillarblutentnahme-Röhrchen (200 µl)	KABE Labortechnik
Einbettkassetten für Histologie, Micro und Macro	Microm
Einmalspritzen TERUMO® U-100 Insulin (1 ml / 6 % Luer)	TERUMO Corporation
Glaskügelchen für die RETSCH Labormühle	RETSCH
Kanülen (25G x 1", 0,5 x 25 mm)	BD Microlance
Kanülen (26 G x 3/8", 0,45 x 10 mm)	BD Microlance
Kryokisten aus Pappe	Thermo Fischer Scientific
Kryoröhrchen, 1 ml und 2 ml	SARSTEDT
Lanzetten, steril, ACCU-CHEK Softclix XL (21G, 0,8 mm)	Roche
PCR tubes	SARSTEDT
Petrischalen 60 mm/ 100 mm	Becton Dickinson
Pipettenspitzen, mit Filter	SARSTEDT

Material

Pipettenspitzen, ohne Filter	Brandt
ReagiergefäÙe 1,5 ml/ 2 ml	SARSTEDT
SafeSeal ReagiergefäÙ mit Schraubverschluss und Dichtung	SARSTEDT
Skalpell, chirurgisch; Cutfix Figur 22	BRAUN
SuperFrost/Plus Objektträger	Menzel-Gläser
Transferpipetten (steril) 3,5 ml/ 10 ml	SARSTEDT
Zellkulturflaschen T25/T75/T125 mit Filterkappe	Becton Dickinson
Zellkulturplatte 60 mm/ 10 mm	Becton Dickinson

2.17. Programme

Bezeichnung	Hersteller
Mikrowin2000-Software v.4.41	Berthold Technologies, Software von Mikrotek Laborsysteme GmbH
Microsoft Office	Microsoft
Adobe Illustrator 2015 Release	Adobe Creative Cloud
Magellan™ - Data Analysis Software	Tecan Magellan Software
PyMOL + Tcl-Tk GUI	Schrodinger, LLC
Molecular Graphics System	
Clone Manager Professional (v.9)	Sci-Ed Software

2.18. Schutzausrüstung

Bezeichnung	Hersteller
Atenschutzmaske mit Ein-und Ausatemventil Typ 1883	3M
Atenschutzmaske, Typ 9332 FFP3 Ventil	3M
Biogel Handschuhe	Mölnlycke Health Care
Classic Birki	Birkenstock
Gewebeverstärktes Folienband "Extra Universal"	TESA
Laborkittel	Leiber
Laborschuhe mit Stahlkappen	ABEBA
Latex-Einmalhandschuhe, ungepudert	Kimberly-Clark KIMTECH SCIENCE
Nitril Handschuhe, "Purple Nitrile"	Kimberly-Clark KIMTECH SCIENCE
OP Haube "Nurse Cap"	Mölnlycke Health Care
OP Maske	Mölnlycke Health Care
OP-Hose	Sattelmacher
Overalls, blau	ProFit

Material

Schuhüberzüge	Ansell Health Care
Sekuroka Overalls	ZetDress
Super Birki	Birkenstock
TYVEK® Überziehtiefel	DuPont
TYVEK®-Overalls	DuPont
Vollsichtbrille	UVEX

2.19. Zubehör für Tiere

Bezeichnung	Quelle
IVC Käfig, Typ II lang	Tecniplast
Gebälseeinheit für IVC Gestell Blueline	Tecniplast
Käfig, Typ IV	Tecniplast
Standarddeckel, erhöht, Typ IV, DST 4 MS/50	Zoonlab
Erhaltungsfutter, Ratte/Maus Haltung	SSNIFF
ssniff® Ms-H, Alleinfuttermittel Meerschweinchen - Haltung	SSNIFF
Transmissionskäfig für Meerschweinchen, Typ IV	Modifiziert von T. Renz, ZMNH, Hamburg
Tränkflaschen, Meerschweinchen	Zoonlab
Tränkflasche, Mäuse	Tecniplast
Tränkkappe 34 mm, Mäuse	Tecniplast
Tränkkappe 35 mm, Meerschweinchen	Zoonlab
Futterbehälter, Meerschweinchen	Zoonlab
Maus Haus, rot-transparent	Tecniplast
Meerschweinchen Haus, rot-transparent	Plexx B.V.

2.20. Tiere und tierische Produkte

In den nachfolgenden Kapiteln sind alle verwendeten Tierlinien sowie die verwendeten Blutarten und embryonierten Eier aufgeführt.

2.20.1. Blut

Bezeichnung	Lieferant
Hühnervollblut mit Citrat	Lohmann Tierzucht
Putenvollblut mit Alsever	Charles River

2.20.2 Embryonierte Hühnereier

Die spezifisch pathogenfreien (SPF) embryonierten Hühnereier wurden von Valo geliefert, und anschließend bis Tag 11 nach der Befruchtung in der Forschungstierhaltung (FTH) am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE), Hamburg bebrütet.

2.20.3 Tiere

Spezies	Bestellcode	Geschlecht	Spezifikationen	Lieferant
Maus – BALB/c	(BALB/cAnNCrl)	weiblich	6 Wochen	Charles River
Meerschweinchen – Hartley	(Crl:HA)	weiblich	250 – 300 g	Charles River

2.21. Analgetika und Zusätze

Bezeichnung [Konzentration]	Hersteller
Forene (Isofluran) [100 %]	Abbott
Ketamin [100 mg/ml]	WDT
Sedaxylan (Xylazin-Hydrochlorid) [20 mg/ml] -	WDT
Narcoren Pentobarbital-Natrium [16g/100 ml]	Merial
NaCl [0,9 %]	B. Braun Melsungen AG

3. Methoden

3.1. Molekularbiologische Methoden

Die im Folgenden beschriebenen Methoden wurden zur Sequenzierung des viralen Genoms sowie der Manipulation des Genoms und den *in vitro* und *in vivo* Charakterisierungen der rekombinanten Viren durchgeführt.

3.1.1. Isolierung viraler RNA

Nach Anzucht von Virus in der Zellkultur (Kapitel 3.5.3.2) wurde mittels eines Kits (QIAamp Viral RNA Mini Kit) vRNA nach Herstellerangaben isoliert. Die isolierte vRNA wurde aliquotiert und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.1.2. Entwurf von Primern zur Sequenzierung und zur zielgerichteten Mutagenese

Der Entwurf der Sequenzierungsprimer wurde mithilfe von der „Clone Manager“ Software v.9 durchgeführt. Im Anschluss wurden mittels „Clone Manager“ die Anbindungseigenschaften *in silico* überprüft. Die Mutagenese-Primer für die Aminosäure Austausch sowie für die Deletion der multi-BCS wurden mithilfe des Online Programms „QuikChange Primer Design“ entworfen (252). Anschließend wurden die Oligonukleotide von Sigma Aldrich synthetisiert. Eine Auflistung der entworfenen und verwendeten Primer ist in Kapitel 2.10.2 zu finden.

3.1.3. Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion

Um die Nukleotidsequenz des SC35F Virus zu bestimmen, wurde das virale Genom dieses Virus sequenziert. Dazu musste die vRNA zuerst mittels Reverser Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben werden. Die cDNA wurde anschließend in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und mittels QIAquick Gel Extraction Kit oder QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt. Anschließend wurden die PCR-Produkte mit einem geeigneten Primer versetzt und von SeqLab sequenziert.

Nachfolgend ist die RT-PCR detailliert erklärt. Die RT-PCR wird in zwei Schritten durchgeführt, wobei im ersten Schritt die Reverse Transkriptase die RNA in einzelsträngige cDNA transkribiert. Hier wird die Reverse Transkriptase SuperScript III eingesetzt, die mittels universellem Primer, der an hochkonservierte Promotorregionen der viralen Gensegmente

Methoden

bindet, und mittels Desoxy-Nukleosidtriphosphaten (dNTPs) cDNA generiert (255).
Nachfolgend sind die RT-Reaktionsansätze sowie die jeweiligen Programme im Thermocycler beschrieben.

RT-Reaktionsansatz für eine Reaktion:

Zusatz [Konzentration]	Volumen [μl]
Universeller Primer 12 [10 μ M]	8
dNTPs [5 mM]	4
ddH ₂ O	12
vRNA	2

Dieser Reaktionsansatz wurde für 5 min bei 65 °C im Thermocycler inkubiert, anschließend folgte eine Inkubation von mindestens einer Minute bei 4 °C. Anschließend wurden folgende Reagenzien zugesetzt.

Zusatz [Konzentration]	Volumen [μl]
First Strand Buffer [5x]	8
DTT [0.1 M]	2
Ribolock RI, Rnase Inhibitor [40 U/ μ l]	2
SuperScript III [200 U/ μ l]	2
Σ 40 μ l	

RT-Programm: 25 °C, 5 min
 50 °C, 60 min
 70 °C, 15 min
 Kühlung 4 °C, ∞

Der zweite Schritt beschreibt die eigentliche PCR. In einem neuen Reaktionsansatz wurde mittels Phusion HotStart II, einer DNA Polymerase, dNTPs und spezifischen Primern doppelsträngige DNA jedes viralen Gensegmentes amplifiziert. Die Phusion HotStart II Polymerase verfügt einen hohen Korrekturlesemechanismus, der die Möglichkeit verringert, dass zusätzliche Mutationen ins Genom eingefügt werden. Nachfolgend sind der PCR-Reaktionsansatz sowie das dazugehörige Programm im Thermocycler beschrieben.

PCR-Reaktionsansatz für eine Reaktion

Zusatz [Konzentration]	Volumen [μ l]
H ₂ O	29,5
Phusion HotStart II Puffer [5x]	10
dNTPs [10 mM]	1
Primer fw [10 mM]	2,5
Primer rev [10 mM]	2,5
Phusion HotStartII Enzym [2 U/ μ l]	0,5
cDNA	4
Σ 50 μ l	

PCR-Programm:	Initiale Denaturierung:	94 °C, 3 min
	35 Zyklen in drei Schritten mit:	
	Denaturierung:	94 °C, 10 s
	Primerhybridisierung:	71 °C, 5s
	Elongation:	72 °C, 3 min
	Finale Elongation:	72 °C, 5 min
	Kühlung:	4 °C, ∞

3.1.4. DNA-Gelelektrophorese

Um zu überprüfen, ob die amplifizierte PCR-Produkte den erwarteten Nukleotidlängen entsprachen und um den Erfolg einer PCR zu überprüfen, wurde das PCR-Produkt einer Gelelektrophorese in einem Agarosegel unterzogen. Mittels Gelelektrophorese erfolgt im Agarosegel eine Auftrennung der PCR Fragmente der Größe nach. Mithilfe eines Molekulargewichtsstandards, einer sogenannten DNA Ladder, kann die Molekülmasse der amplifizierten Fragmente bestimmt werden. Des Weiteren wurde in wenigen Fällen die Aufreinigung der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese und einer anschließenden Isolierung der DNA aus dem Gel für bessere Ergebnisse der Sequenzierung verwendet.

Das Gel wurde durch Lösen von 1 % Agarose in 1x TAE Puffer mittels Erhitzen im Mikrowellenofen hergestellt. Nachdem die Lösung auf ca. 40 °C abgekühlt war, wurde sie mit etwa 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid versetzt und in einen Gelelektrophoresegießstand gegossen. Nach vollständigem Aushärten wurde das Gel mit Proben beladen. Die Proben wurden vor Verwendung mit 6x Mass Ruler Loading Dye Solution versetzt und in die Vertiefungen des Agarosegels geladen. Auf jedem Gel wurde mindestens in eine Vertiefung MassRuler DNA Ladder Mix zur Hilfe der Größenbestimmung aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 110 V für 10 min und 120 V für weitere 70 Minuten. Anschließend erfolgt eine Visualisierung der DNA Banden durch UV-Licht. Im Fall einer Aufreinigung mittels Agarosegel, wurde unter

UV Licht mithilfe eines Skalpellens das gewünschte PCR-Fragment ausgeschnitten. Nach dem Wiegen des Gelstücks wurde die darin enthaltene DNA nach Herstellerangaben mit dem QIAquick Gel Extraction Kit prozessiert. Nach einer Aufreinigung über das Agarosegel oder unmittelbar nach Verwendung des QIAquick PCR Purification Kit wurden die Proben mit 0,5 mM des entsprechenden Primers versetzt und zur Sequenzierung bei SeqLab eingeschickt.

3.1.5. Zielgerichtete Mutagenese mittels PCR

Mittels zielgerichteter Mutagenese können in einer Nukleotidsequenz mittels PCR zielgerichtet Nukleotide ausgetauscht, inseriert, oder wie in dieser Arbeit geschehen, deletiert werden. In einem PCR Reaktionsansatz wurden hierfür zwei gegenläufige Primer eingesetzt, die an der gleichen Position der DNA binden und bis auf ein Basentriplett, das für eine Mutation kodiert, komplementär zu der Sequenz der zu verändernden DNA sind. Die Phusion Hotstart II verfügt über einen Korrekturlesemechanismus und amplifiziert die Plasmide mit der gewünschten Mutation.

Um die nicht mutierten parentalen Plasmide aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, wurde der Methylierungszustand der neusynthetisierten mutierten und parentalen nicht mutierten Plasmide genutzt. Plasmide amplifiziert in Bakterien sind methyliert oder hemimethyliert, Plasmide die in einer PCR generiert wurden, tragen keinerlei Methylierung. Um die methylierten parentalen Plasmide ohne Mutation aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, wurden diese mit der Restriktionsendonuklease *DpnI*, die spezifisch methylierte DNA verdaut, restringiert. Anschließend wurden die XL10 gold *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien mit den Plasmide des *DpnI*-behandelten PCR Reaktionsansatz (Kapitel 3.1.6). Diese Methode wurde modifiziert durchgeführt nach Otte *et al.* (203).

PCR-Reaktionsansatz für eine Reaktion

Zusatz [Konzentration]	Volumen [μ l]
H ₂ O	28,5
Phusion HotStart II Puffer [5x]	10
dNTPs [10 mM]	1
Primer vorwärts [10 mM]	2,5
Primer rückwärts [10 mM]	2,5
Phusion HotStartII Enzym [2 U/ μ l]	0,5
Plasmid-DNA [10 ng/ μ l]	5
Σ 50 μ l	

Methoden

PCR-Programm:	Initiale Denaturierung:	98 °C, 5 min
	20 Zyklen in drei Schritten mit:	
	Denaturierung:	98 °C, 30 s
	Primerhybridisierung:	55 °C, 1 min
	Elongation:	72 °C, 10 min
	Kühlung	4 °C, ∞

3.2. Mikrobiologische Methoden

Die nachfolgenden Methoden beschreiben die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten mikrobiologischen Methoden.

3.2.1. Transformation von Plasmiden in kompetente *E. coli* Bakterien

Um Plasmide in großer Menge zu vervielfältigen, wurden kompetente *E. coli* XL10 gold Bakterien mit den neusynthetisierten Plasmiden transformiert. Dafür wurden kompetente Bakterien in einem vorgekühlten Reagiergefäß mit 50 ng Plasmid versetzt und bei 4 °C für 30 min inkubiert. Anschließend folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 70 s und ein darauffolgender Kälteschock für 5 min bei 4 °C. Die transformierten Bakterien wurden danach in einem speziellen optimalen Medium SOC (*super optimal broth with catabolite repression*; SOC) bei 37 °C für 1 h inkubiert und im Anschluß auf LB Agar Ampicillin 100 Platten selektiert. Eine Selektion durch Ampicillin ist durch den Ampicillin Resistenzmarker möglich, den die verwendeten pHW2000-Plasmide tragen.

3.2.2. Plasmid-DNA Amplifikation in *E.coli* Bakterien

Nachdem die Klone nach der Transformation der Bakterien positiv auf die eingefügten Mutationen getestet wurden, wurden die transformierten Bakterien in großen Mengen in *E. coli* Bakterien vermehrt und die Plasmid-DNA isoliert (Kapitel 3.2.3). Zur Vervielfältigung von Plasmiden wurden kompetente *E. coli* Bakterien mit neusynthetisierten Plasmiden, wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben, transformiert. Für die Anzucht großer Mengen von Plasmid-DNA können entweder Klone von einer Agarplatte oder ein Glycerolstock verwendet werden. Die Glycerolstocks dienen zur Archivierung von Bakterien, bestehen aus Glycerol, das im Verhältnis 1:2 mit einer Bakterienkultur in LB Medium versetzt ist, und werden bei -80 °C gelagert. Die Bakterien werden in LB Medium Ampicillin 100 überführt, welches das ideale Flüssigmedium mit 100 µg/ml Ampicillin für die Bakterien mit einem Ampicillin Resistenzgen ist. Durch die Ampicillin Resistenz werden Bakterien ohne dieses Gen

ausselektiert. Für eine Plasmidpräparation im Maxiformat wurden 250 ml LB-Nährmedium mit Ampicillin, für eine Plasmidpräparation im Miniformat wurden 4 ml LB Nährmedium mit Ampicillin verwendet und für jeweils für etwa 18 Stunden bei 37 °C und 210 rpm inkubiert. Die Plasmide wurden mithilfe eines kommerziellen Kits isoliert (Kapitel 3.2.3). Anschließend folgte eine Bestimmung der Konzentration der Plasmid-DNA mittels des Spektralphotometers Nanodrop 1000. Alle isolierten Plasmide wurden auf eine Konzentration von 1000 ng/µl mit ddH₂O eingestellt.

3.2.3. Plasmid-DNA-Präparation

Die Plasmid-DNA der *E. coli* Bakterien wurden mittels handelsüblicher Reaktionssysteme isoliert. Für bis zu 4 ml Plasmidpräparation wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit, für 250 ml Bakterienkultur wurde das Nucleo Bond Maxi Kit nach Herstellerangaben verwendet. Um während der Isopropanol Fällung die Ausbeute der Plasmid-DNA zu steigern wurden zusätzlich 6 µg/ml Glycogen eingesetzt. Ansonsten erfolgte die Präparation nach Herstellerangaben der Kits.

3.2.4. Restriktion von Plasmid-DNA

Zur Überprüfung der Reinheit der präparierten Plasmide wurde ein enzymatischer Verdau der Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen durchgeführt. Um spezifische Banden für jedes neu präparierte Plasmid zu erhalten, wurden die Restriktionsenzyme *BsmBI*, *EcoRI*, *NheI*, *SacI*, *SmaI* und *SSpI* nach Herstellerangaben eingesetzt. Als Kontrollplasmide dienten Plasmide derselben Konstrukte aus vorhergehenden Präparationen. Des Weiteren wurde zur Bestimmung der Bandengröße die Genkarte der Plasmide verwendet.

3.3. Zellkulturmethoden

Nachfolgenden werden die Methoden dieser Arbeit beschrieben, die in Zellkultursystemen durchgeführt wurden.

3.3.1. Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen

Um Zelllinien zu archivieren und stets auf junge Passagen zurückgreifen zu können, können Zellen kryokonserviert werden. Um eukaryotische Zellen zu konservieren, wurden die Zellen mithilfe von Trypsin-EDTA vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und mittels Zentrifugation bei 1000 xg für 5 min bei 4 °C pelletiert. Anschließend wird das Zellpellet im

vorgekühlten Kryokonservierungsmedium, bestehend aus FCS und 10 % DMSO resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Für die Kryokonservierung ist ein langsames und geregeltes Einfrieren der Zellen wichtig, was mit dem Kryokonservierungscontainer *Mr. Frosty* mit 1 °C Abkühlung pro Minute gewährleistet wurde. Nach vollständiger Durchfrostung wurden die Zellen in den Kryoröhrchen in der Gasphase flüssigen Stickstoffs gelagert.

3.3.2. Kultivierung eukaryotischer Zellen nach Kryokonservierung

Die archivierten Zelllinien können nach der Kryokonservierung rekultiviert werden. Um dies zu erreichen, wurde das Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und langsam aufgetaut. Das aufgetaute, noch kühle Kryokonservierungsmedium mit den enthaltenen Zellen wurde mit aufgewärmtem Zellkulturmedium versetzt und anschließend in eine Zellkulturflasche überführt. Nach 12-16 h wurde das noch DMSO-haltige Wachstumsmedium durch frisches Zellkulturmedium ersetzt und die Zellen bis zu einer Konfluenz von 90-100 % bei 37 °C, 5 % CO₂ und 96 % rH inkubiert. Ab einer Konfluenz von 90-100 % wurden die Zellen passagiert. Um die konfluenten Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen abzulösen, wurden diese zuerst mit auf 37 °C vorgewärmtem 1x PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA bei 37 °C, 5 % CO₂ und 96 % rH inkubiert. Die Inkubationsdauer mit Trypsin-EDTA unterschied sich je nach Zelllinie und wurde durchgeführt, bis die Zellen sich vollständig voneinander und vom Boden der Zellkulturflasche gelöst hatten. Nach der Ablösung vom Zellboden wurde das Trypsin-EDTA durch FCS-haltiges Wachstumsmedium inaktiviert, darin resuspendiert und die Zellsuspension in einem definierten Verhältnis geteilt. Zur Vermehrung von Zellen wurde die abgeteilte Menge Zellsuspension in neue Zellkulturflaschen überführt und mit Wachstumsmedium versetzt. Zur reinen Erhaltung einer Zelllinie wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:20 passagiert, die restliche Suspension wurde verworfen.

3.3.3. Transfektion von Zellen

Um die präparierten Plasmide in Zellen transient einzufügen, wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamine 2000 verwendet. Hierfür wurden etwa $2 \cdot 10^6$ HEK293T Zellen in jede Vertiefung einer 6-Vertiefungsplatte in HEK Transfektionsmedium ausgesät. Das HEK Transfektionsmedium besteht aus HEK Wachstumsmedium ohne Penicillin und Streptomycin. Die Transfektion der HEK293T Zellen erfolgte in Zellsuspension mit Lipofectamine 2000 im Verhältnis 1:1 zu der transfizierten DNA. Für ein optimales Transfektionsergebnis wurden die Plasmide in OptiMEM Medium aufgenommen und im

Anschluß auf die Zellen in Suspension geträufelt. Die transfizierten Zellen wurden für 24 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 96 % rH inkubiert und anschließend lysiert. Diese Methode wurde modifiziert nach Gabriel *et al.* durchgeführt (188).

3.4. Biochemische Methoden

Nachfolgend wird der Dual Luciferase Test beschrieben, bei welchem es sich um eine biochemische Methode handelt.

3.4.1. Dualer Luciferase Test

Um die SC35- und SC35F-spezifische vRNP-Aktivität zu bestimmen, wurden HEK293T Zellen mit pHW2000-Expressionsplasmiden, die für die viralen Untereinheiten PB1, PB2, PA und NP kodieren, transfiziert. Die Menge der transfizierten Expressionsplasmide betrug 0,5 µg pro Plasmid. Um sich dem natürlichen Verhältnis im Virus anzunähern, wurden die Untereinheiten PB1:PB2:PA:NP im Verhältnis von 1:1:1:2 transfiziert. Das NP Expressionsplasmid wurde daher mit 1 µg transfiziert. Um die virale Polymeraseaktivität zu visualisieren, wurden HEK293T Zellen zusätzlich mit den Luciferase-kodierenden Plasmiden pRL-TK (Renilla-Luciferase) und pPol-I-NP-Luc (Firefly-Luciferase) transfiziert. Das pPol-I-NP-Luc-human Plasmid kodiert für die *Firefly*-Luciferase des Leuchtkäfers *Photinus pyralis*. Die Luciferase dieses Plasmids ist in die nichtkodierenden Bereiche des A/WSN/33 (H1N1) NP eingefügt und wird über den zellulären humanen Polymerase-I Promotor (Pol-I), den Promotor für die virale RNA-abhängige Polymerase kontrolliert. In humanen Zellen wird die virale RNA, welche das *Firefly* Reporter gen kodiert, in geringen Mengen exprimiert. Im Fall von gleichzeitig transfizierten Polymerase- und NP-Untereinheiten wird der virale Polymerasekomplex artifiziell rekonstruiert. Nur dann erfolgt eine Transkription des *Firefly* Reporter gens und Translation der Firefly-Luciferase. Eine nachfolgende Replikation der vRNA erhöht das exprimierte *Firefly* Reporter gen, da die cDNA als Matrize für zusätzliche vRNA verwendet wird. Zusätzlich zu dem *Firefly* Reporter gen wurde ein weiteres Reporter gen in die HEK293T Zellen eingebracht. Dieses zweite Reporter gen kodiert für die *Renilla* Luciferase aus der Seefeder *Renilla reniformis*, und diente als interne Kontrolle des Versuchs, um die Effizienz der Transfektion in den Zellen in Bezug auf die Polymeraseaktivität zu stellen. Das *Renilla* Reporter gen steht unter Kontrolle eines konstitutiv exprimierten Herpes Simplex Virus Thymidinkinase (HSV-TK) Promotors, wobei die Expression des *Renilla* Reporter gens zwar schwach aber konstitutiv ist. Der Nachweis

beider Reportergene erfolgte über Zugabe von Luciferin. Das Luciferin dient als Substrat der Luciferasen, welches während der Spaltung detektierbare Mengen Biolumineszenz freisetzt. Die transfizierten HEK293T Zellen wurden nach der Transfektion 24 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 96 % rH inkubiert und anschließend lysiert. Eine anschließende Detektion der Lumineszenz der Lysate erfolgte nach Herstellerangaben mit dem Dual-Luciferase Reporter Assay Systems von Promega in 96 well Platten im Tristar Multimode Mikroplattenleser unter Verwendung der Mikrowin2000 v.4.41 Software. Diese Methode wurde modifiziert nach Hudjetz *et al.* durchgeführt (190).

3.5. Virologische Methoden

Im Folgenden sind die virologischen Methoden dieser Arbeit aufgeführt, die zur Generierung und Charakterisierung der SC35 und SC35F rekombinanten Viren eingesetzt wurden. Die Risikogruppeneinstufung der Virusstämme erfolgte durch die Gentechnikbehörde der Stadt Hamburg, wonach alle Versuche mit den SC35 und SC35F rekombinanten Viren in einem speziell ausgerüsteten Labor am HPI mit der biologischen Schutzstufe 3 (BSL-3) durchgeführt wurden. Das komplette SC35F Virus wurde als BSL-4 Pathogen eingestuft, weshalb die Virusanzucht des kompletten SC35F Virus nur im BSL-4 Labor des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin in Hamburg durchgeführt werden konnten.

3.5.1. Reverse Genetik

Mithilfe von reverser Genetik können IAV mithilfe eines Plasmidsystems neu generiert werden. Die Generierung von Viren über Plasmide erlaubt somit das Einfügen, die Insertion oder die Deletion von gewünschten Nukleotiden im viralen Genom. Zur Herstellung der SC35 und SC35F rekombinanten IAV wurden gezielt Manipulationen auf Nukleotidebene durchgeführt (Kapitel 3.1.5). Das verwendete System zur Virusgenerierung wurde im Jahr 2000 von Hoffmann *et al.* beschrieben (255). Um Viren in Zellen zu synthetisieren, werden HEK293T Zellen mit den acht pHW2000 Plasmiden transfiziert. Die Plasmide kodieren für das virale Genom des zu generierenden IAV, wobei jedes Plasmid jeweils für eines der acht Gensegmente kodiert. Das pHW2000 Plasmid zeichnet sich dadurch aus, dass die kodierenden Gensegmente von den zellulären Pol-I und Pol-II Promotorregionen umgeben sind. Diese veranlassen die Expression des viralen genetischen Materials in den eukaryotischen Zellen, wobei vRNA und virale Proteine synthetisiert werden. Nur bei einem kompletten Satz von Plasmiden kodierend für alle acht Genomsegmente des IAV, kann ein erfolgreicher Viruszusammenbau in der Zelle erfolgen. Anschließend wurde das neu

generierte Virus aus den transfizierten HEK293T Zellen freigesetzt und konnte aus dem Zellkulturüberstand gewonnen werden. Alle generierten Viren in dieser Arbeit wurden mit 1 µg Plasmid-DNA pro Expressionsplasmid mithilfe von Lipofectamine 2000-Transfektion generiert. Die Virusgenerierung wurde in Zellkulturschalen mit 60 mm Durchmesser mit etwa $4 \cdot 10^5$ HEK293T Zellen in Suspension durchgeführt. Um die Virusvermehrung zu optimieren, wurden 500 µl des HEK293T Überstandes mit den freigesetzten rekombinanten Viren nach 48 Stunden Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ und 96 % rH für eine Überinfektion von MDCKII-Zellen genutzt. Hierfür wurden MDCKII-Zellen verwendet, da IAV in HEK293T Zellen aufgrund nur einer Monozyklus Replikation nicht zu hohen Virustitern replizieren können. Nach weiteren 48 Stunden fand eine Überinfektion der MDCK Zellen statt, die zu hohen Virustitern im Zellüberstand führte. Die erfolgreiche Generierung von Virus konnte unmittelbar durch die Bestimmung des zytopathischen Effekts (*cytopathic effect*, CPE) oder mittels Hämagglutinationstest (HA Test; Kapitel 3.5.6) überprüft werden. Mithilfe eines Plaquetests wurden die plaquebildenden Einheiten (*plaque forming units*; p.f.u.), und damit der Virustiter, auf MDCK Zellen ermittelt. Diese Methode wurde modifiziert nach Gabriel *et al.* durchgeführt (188).

3.5.2. Aufreinigung von Virus mittels Plaqueisolierung

Um für weitere Experimente nur einen Virusklon zu verwenden und nicht die entstandene virale Quasispezies, wird der Virusstock der neu generierten, rekombinanten Viren mittels Plaqueisolierung gereinigt. Die Aufreinigung dient zum Erhalt eines Virusstocks aus einem einzelnen Virusklon. Dazu wird der Überstand infizierter MDCK Zellen in Zehnerpotenzen verdünnt, wobei die Verdünnungen 10^{-3} bis 10^{-8} auf eine 6-Vertiefungsplatte mit MDCK Zellen überführt werden (Plaque Test; Kapitel 3.5.4). Um die Ausbreitung des Virus auf die gesamte Zellpopulation in der Vertiefung zu verhindern, werden die Zellen mit einer Schicht aus 2x Medium und 1,8 % Agar (im Verhältnis 1:1) überlagert. Nach 72 Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 96 % rH werden jeweils 3 Plaques mithilfe abgeschnittener, autoklavierter 1000 µl Filterspitzen einer Pipette ausgestanzt. Die so isolierten, virushaltigen Agarstücke werden im Anschluss in 200 µl 1x PBS mit 0,2 % BSA über Nacht bei 4 °C inkubiert. Diese Inkubation dient zum Anlösen des ausgestanzten Agarstücks und zur Freisetzung der in den Plaques enthaltenen Viren in das umgebende Medium. Die isolierte Viruspopulation der rekombinanten SC35 und SC35F Viren wurde im Anschluss in T25 Zellkulturflaschen mit MDCK überführt und dort zu je einem Virusstock kultiviert. Nach erfolgreicher Kultivierung werden Kryoröhrchen mit dem zellfreien, virushaltigen Zellkulturüberstand bei -80 °C eingefroren. Diese Methode wurde modifiziert nach Gabriel *et al.* durchgeführt (188).

3.5.3. Virusanzucht

In den nachfolgenden Kapiteln werden die verschiedenen Arten der Virusanzucht beschrieben, die in der vorliegenden Arbeit angewendet wurden.

3.5.3.1. Virusanzucht im embryonierten Hühnerei

Die in dieser Arbeit verwendeten HPAIV ohne säugerspezifische Mutationen wurden in embryonierten Hühnereiern vermehrt. Die Anzucht in Hühnereiern dient dazu, keinen Selektionsdruck auf die Viren auszuüben. Die in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten SC35 und SC35F Viren enthalten alle mindestens eine säugerspezifische Signatur, also eine Mutation die auf eine Adaptation an ein Säugetier hinweist. Deshalb wurde nur der aviäre SC35 Virusstock in embryonierten SPF Hühnereiern generiert. Zur Virusanzucht dürfen nur SPF Hühnereier verwendet werden, um Kontaminationen des Virusstocks mit anderen Pathogenen zu vermeiden. Die embryonierten Hühnereier wurden von Valo bezogen und anschließend bis Tag 11 nach der Embryonierung in der FTH am UKE bebrütet. Vor Beginn der Infektion wurden die Eier auf äußerliche Beschädigungen kontrolliert und mit einer speziellen Prüflampe für Eier durchleuchtet. Die Durchleuchtung zeigt bei einem lebenden Embryo die Embryonenbewegung sowie die Blutgefäßbildung in den Eiern oder auch den abgestorbenen Embryo. Für die Infektion der Eier mit intakter Schale und lebendem Embryo wurde der parentale Virusstock im Verhältnis 1:1000 und 1:10000 mit 1x PBS verdünnt. Die Eier wurden mit dem stumpfen Ende, in welchem sich der Luftsack im Ei befindet, nach oben gedreht. Anschließend folgte eine Desinfektion der Eischale mit Jodlösung. Mit einer joddesinfizierten Anreißnadel für Fliesen wurde ein Loch in die Schale des Eis gebohrt. Es folgte eine Injektion von 200 µl der 1:1000 bzw. 1:10000-fachen Virusverdünnung. Dabei wurde die Allantoishöhle des Eis vorsichtig mit einer 1 ml-Spritze mit Injektionskanüle (25G 1", 0,5 x 25 mm) angestochen und das Virus in die Höhle appliziert. Nach erfolgter Virusinokulation erfolgte eine Versiegelung der durchbohrten Eischale mit einer geringen Menge Kleber. Nach einer kurzen Trocknungszeit des Klebers wurden die Eier für 48 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 96 % rH inkubiert. Es folgte eine Inkubation bei 4 °C über Nacht, wodurch sich die Blutgefäße im embryonierten Ei kontrahierten und der Embryo euthanasiert wurde. Um das Virus in der Allantoisflüssigkeit aus dem Ei zu ernten, wurde die Eischale an der Stelle an der sich der Luftsack des Eis befindet mithilfe einer sterilen Pinzette perforiert. Nach Entfernung der Membranen konnte die Allantoisflüssigkeit vorsichtig mithilfe einer Transferpipette entnommen werden. Hierbei darf kein Blut oder Eidotter die Virusprobe kontaminieren. Nach anschließender Zentrifugation bei 1000 xg und 4 °C für 5 min wurden HA Tests (Kapitel 3.5.6) der virushaltigen Allantoisflüssigkeiten durchgeführt. Proben mit

demselben HA Titer wurden vereinigt, resuspendiert, in Kryoröhrchen aliquotiert und bis zum weiteren Gebrauch bei -80 °C gelagert. Nach einmaligem Einfrieren wurden die Virustiter mittels Plaque Test bestimmt (Kapitel 3.5.4). Diese Methode wurde modifiziert nach Gabriel *et al.*, 2005 durchgeführt (188).

3.5.3.2. Virusanzucht in eukaryotischen Zellen

Um säugeradaptierte IAV zu vermehren, werden MDCK Zellen verwendet, um die Viren keinem Selektionsdruck in aviären Zellen auszusetzen. Die MDCK Zellen wurden einen Tag vor der Infektion so passagiert, dass am darauffolgenden Tag eine Konfluenz der Zellen von 90 % erreicht war. Die Größe der verwendeten Zellkulturflaschen variierte hierbei von T25 Flaschen – T75 Flaschen. Die adhärennten Zellen wurden im nächsten Schritt zweimal mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit einem Inokulum, bestehend aus MDCK Infektionsmedium und Virus, überlagert. Es folgte eine 30 minütige Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ und 96 % rH, wobei alle 10 min die Zellkulturflasche zur optimalen Verteilung des Virus auf den Zellen, geschwenkt wurde. Im Anschluss erfolgte die Entfernung des Inokulums und eine Zugabe von MDCK Infektionsmedium. Im Fall einer Infektion von Zellen mit einem IAV mit einer mono-BCS wurde dem Infektionsmedium TPCK-Trypsin beigelegt. Das TPCK-Trypsin ist für IAV mit mono-BCS notwendig, da diese exogene Protease zur Spaltung des HA₀ in die Untereinheiten HA₁ und HA₂ benötigt wird. Dies erlaubt multiple Replikationszyklen und somit eine effiziente Virusvermehrung in den infizierten Zellen.

Das Volumen des zugegebenen Infektionsmediums war hierbei abhängig von der Fläche der Zellkulturflasche (T25 Zellkulturflasche: 3-4 ml; T75 Zellkulturflasche: 7-10 ml). Die infizierten Zellen wurden bei den oben genannten Bedingungen inkubiert, bis ein CPE von etwa 90 % im Mikroskop sichtbar war. Der virushaltige Überstand der infizierten Zellen wurde anschließend bei 1000 xg und 4 °C für 5 min zentrifugiert um Zelltrümmer zu entfernen. Es folgte das Aliquotieren in Kryoröhrchen (meist á 300 µl) und die Einlagerung des neugewonnenen Virusstocks bei -80 °C. Wie bei der Generierung des Virusstocks in embryonierten Eiern, wurde nach einmaligem Einfrieren der Virustiter mittels Plaque Test bestimmt. Diese Methode zur Anzucht von IAV in eukaryotischen Zellen wurde modifiziert nach Gaush *et al.* durchgeführt (256).

3.5.4. Virustiterbestimmung von Virusstocks oder Organhomogenisat Proben aus Tieren mittels Plaquetest

Zur Bestimmung der Virustiter von neu generierten Virusstocks, Organhomogenisaten oder Nasenspülungen wurde die Methode des Plaque Tests angewendet. Dazu wurden am Vortag MDCK Zellen in 6-Vertiefungsplatten mit einer Konfluenz von etwa 90 % ausgesät. Am Tag der Infektion der Zellen folgte ein zweimaliges Waschen der adhären Zellen mit 1x PBS. Anschließend wurde das PBS vollständig entfernt und pro Vertiefung wurden die MDCK Zellen mit 333 µl einer Virusverdünnung infiziert. Die Verdünnungsreihe wurde in 1x PBS durch 1:10er Schritte hergestellt. Im Normalfall wurden Verdünnungen von 10^{-1} bis 10^{-8} generiert. Es folgte eine Inkubation für 30 min im Zellkulturinkubator (37 °C, 5 % CO₂ und 96 % rH), wobei die Zellkulturplatten alle 10 min geschwenkt wurden. Nach Ablauf der 30-minütigen Inkubation wurden die infizierten MDCK Zellen mit 3 ml Überlagerungsmedium für Plaque Tests überschichtet und für 72 h im Zellkulturinkubator, ohne diese zu bewegen, inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Überlagerungsmedium entfernt und die adhären Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen. Es folgte eine Fixierung der Zellen und des Virus mit 4 % PFA für mindestens 30 min. Um die Virusplaques, also die Löcher im Zellrasen zu visualisieren, folgte eine Anfärbung des Zellrasens mit Kristallviolett. Nach Färbung der Zellen wurden die Plaques gezählt und der Virustiter aus der Anzahl der Plaques in den jeweiligen Verdünnungsstufen als p.f.u./ml berechnet. Der Plaquetest ermöglicht die Bestimmung infektiöser Viruspartikel oder sogenannter plaquebildender Einheiten (*plaque forming units*; p.f.u.) in einer Probe pro ml. In Kapitel 3.5.2 wurde die Aufreinigung mittels Plaqueisolierung beschrieben. Hier wurde ebenfalls das Prinzip des Plaque Tests angewendet, wobei das Überschichtungsmedium aus einer Mischung von 2x Medium und 1,8 % Agar bestand (Kapitel 3.5.2). Der Plaque Test wurde modifiziert nach Gaush *et al.* und Matrosovich *et al.* durchgeführt (256, 257).

3.5.5. Gewinnung von Erythrozyten aus Hühner- und Putenvollblut

Die Aufreinigung der Erythrozyten aus Putenvollblut oder Hühnervollblut wurde am HPI durchgeführt. Hierzu erfolgte eine Versetzung des Hühnervollbluts mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung und eine 5 minütige Zentrifugation zur Auftrennung der Blutbestandteile bei 1000 xg bei 4 °C. Das Putenvollblut ist empfindlicher und wurde aufgrund dessen nur bei 1000 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert. Für Putenvollblut und Hühnervollblut folgte jeweils eine Abtrennung des Blutüberstands, bestehend aus Serum und der Leukozyten- und Blutplättchenhaltigen Interphase, von den Erythrozyten. Das Serum und die Interphase wurden dabei nach dem initialen Waschschrift mit 0,9 % NaCl verworfen. Die

Waschschritte wurden wiederholt, bis nach der Zentrifugation keine Interphase mehr sichtbar und der NaCl Überstand frei von Erythrozyentrümmern und hämolysierten Erythrozyten war. Nach Entfernung des kompletten Überstandes erhielt man so eine 100 %-ige Erythrozytenlösung, die als Stammlösung für weitere Experimente verwendet wurde.

3.5.6. Bestimmung der hämagglutinierenden Einheiten einer virushaltigen Probe mittels HA Test

Um die Menge an hämagglutinierenden Einheiten (*hemagglutination units*; HAU) in einer virushaltigen Probe zu bestimmen, wurden Hämagglutinations Tests (HA Tests) eingesetzt. Dieser Test macht sich die Eigenschaft von IAV über ihr HA an terminal verknüpfte Sialinsäuren zu binden zunutze. Für den Test wurden Hühner- oder Putenerythrozyten verwendet, die ebenfalls die verknüpften Sialinsäuren exprimieren. Das Virus bildet durch sein HA Quervernetzungen mit den Erythrozyten, die als gleichmäßige Auskleidung der Vertiefung mit einer homogenen Erythrozytenlösung oder als Hämagglutination optisch wahrgenommen werden können. In Abwesenheit von hämagglutinierendem Virus sinken nicht agglutinierte Erythrozyten auf den Boden der v-förmigen Vertiefungsplatte und bilden sogenannte „Knöpfchen“ aus.

Zur Durchführung des Tests wurden 1:2 Virusverdünnungen in 96-Vertiefungsplatten mit v-förmigem Boden in 1x PBS hergestellt, sodass jede Vertiefung 50 µl virushaltige Probe enthielt. Als Kontrollen dienten PBS und ein Virus mit einem bekannten HA Titer. Anschließend wurde eine 1 %-ige Hühnererythrozyten- oder 0,5 %-ige Putenerythrozytenlösung in 0,9 % NaCl in gleichem Volumen auf die Proben transferiert. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 4 °C wurde der Test optisch ausgewertet. Hierbei stellte der HA Titer den reziproken Wert der Verdünnungsstufe dar, bei welcher noch eine Hämagglutination erkennbar war. Diese Methode eignet sich jedoch nur zur quantitativen Bestimmung der hämagglutinierenden Einheiten, nicht der Anzahl von infektiösen Viruspartikeln. Der Grund dafür ist, dass die Erythrozyten auch hämagglutinieren, wenn statt infektiöser Viruspartikel defektive Viruspartikel oder Virustrümmer in der Probe vorhanden sind, da auch Bruchteile oder nicht infektiöse Viren hämagglutinierende Eigenschaften besitzen.

Der HA Test wurde modifiziert nach Shubladze *et al.* und Soloviev *et al.* durchgeführt (258, 259).

3.5.7. Genotypisierung der generierten Viren

Nach erfolgreicher Generierung der rekombinanten SC35 und SC35F Viren wurden ausgewählte Bereiche des Virusgenoms sequenziert. Dies diente zur Genotypisierung des jeweiligen Virus und der Sicherstellung korrekt eingefügter Mutationen sowie einer Bestätigung der Abwesenheit von nicht erwünschten Mutationen. Um die Viren zu genotypisieren, wurde virale vRNA aus einem Virusaliquot isoliert. Die Isolierung erfolgte mittels QIAamp Viral RNA Mini Kit, wie bereits oben beschrieben (Kapitel 3.1.1). Anschließend wurde eine zweistufige RT-PCR mit der isolierten vRNA und spezifischen Primern durchgeführt. Bei den verwendeten Programmen der RT und der PCR handelte es sich um dieselben Programme, die bereits zuvor in dieser Arbeit beschrieben wurden (Kapitel 3.1.3). Die PCR-Produkte aus diesen Reaktionen wurden anschließend von der Firma SeqLab unter Verwendung passender Primer sequenziert und die Sequenzen mittels Clone Manager (v.9) analysiert.

3.5.8. Untersuchung der Bindespezifität von Viren

Zur Bestimmung der Bindespezifität einzelner IAV an verschiedene Rezeptoren auf der Oberfläche von Wirtszellen wurde der Test zur Rezeptorbindung an Putenerythrozyten durchgeführt. Die Gewinnung der Erythrozyten aus Vollblut wurde bereits in Kapitel 3.5.6 beschrieben. Der erste Schritt für die Modifizierung der Erythrozyten bestand aus der vollständigen Entfernung verknüpfter Sialinsäuren von der Oberfläche der Erythrozyten. Die Entfernung der Rezeptoren wird enzymatisch durch eine einstündige Inkubation bei 37 °C mit 50 mU *Vibrio cholerae* Neuraminidase in einer 8 mM CaCl₂ Lösung durchgeführt. Nach erfolgter Desialylierung wurden die Putenerythrozyten spezifisch mit α 2,3-verknüpften Sialinsäuren oder mit α 2,6-verknüpften Sialinsäuren resialyliert. Die Resialylierung erfolgte mittels zweistündiger Inkubation mit 6 mU α 2,3-Sialyltransferase aus *Pasteurella multocida* zur Resialylierung α 2,3-verknüpfter Sialinsäuren. Zur Resialylierung α 2,6-verknüpfter Sialinsäuren hingegen wurden 38 mU α 2,6-Sialyltransferase aus *Photobacterium damsela* eingesetzt. Nach mehrfachem Waschen der modifizierten Erythrozyten zur Entfernung überschüssiger Sialyltransferase fand eine Aufnahme in 1x PBS mit 1 % BSA als 0,5 % Erythrozytenlösung statt. Vor Beginn des Versuchs wurden die zu testenden Viren mithilfe einer Filtereinheit Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Unit mit einer Durchlassgröße von 100 kDA aufkonzentriert. Es folgte eine Einstellung des HA-Titers der Viren auf 64 HAU mittels HA Test (Kapitel 3.5.6). Anschließend wurden die Viren mit den genormten HA-Titern in einem, wie oben beschriebenen HA Test, unter Einsatz der modifizierten Erythrozyten und

nicht modifizierten Kontrollerythrozyten getestet. Der Test zur Rezeptorbindespezifität wurde modifiziert nach Otte *et al.* durchgeführt (260).

3.5.9. Neuraminidaseaktivitäts Tests

In den nachfolgenden Kapiteln werden zwei in dieser Arbeit durchgeführten Tests zur Untersuchung der Neuraminidaseaktivität beschrieben.

3.5.9.1. Erythrozyten Elutions Test

Zur Untersuchung der NA Aktivität können zur Visualisierung Erythrozyten eingesetzt werden. Dazu wurde ein, wie in Kapitel 3.5.6 beschriebener, HA Test durchgeführt. Die Viren für diesen Versuch, wurden zuvor auf 8 HAU eingestellt. In dem oben beschriebenen HA Test findet eine Inkubation der Viren mit den Erythrozyten bei 4 °C für 30 min statt. Bei 4 °C wird die NA Aktivität gehemmt, was zwar für einen HA Test vonnöten, für eine Untersuchung der NA Aktivität allerdings hinderlich ist. Nach der Zugabe der Erythrozyten wird der NA Elutions Test deshalb bei 37 °C inkubiert. Bei 37 °C ist die Neuraminidase aktiv und entfernt gebundene Sialinsäuren von den Erythrozyten. Diese Entfernung der Sialinsäuren kann durch die Bildung von sogenannten „Knöpfchen“ in Vertiefungen, in welchen zuvor Hämagglutination nachgewiesen wurde, beobachtet werden. Nach 30-minütiger Inkubation werden die agglutinierten Vertiefungen in der Platte gezählt. Die Entwicklung der Elution wird danach stündlich bis 4 h nach Inkubationsbeginn dokumentiert, wobei die Anzahl der eluierten Vertiefungen als Einheit der NA Aktivität gerechnet wird. Der NA Elutions Test wurde modifiziert nach Castrucci *et al.* durchgeführt (261).

3.5.9.2. 4-MUNANA Test

Für eine weitere Bestimmung der NA Aktivität wurde 4-Methylumbelliferyl N-Acetylneuraminsäure (4-MUNANA) eingesetzt. Die NA kann mittels der NA Aktivität das detektierbare 4-Methylumbelliferyl (4-MU) von 4-MUNANA abspalten und dient als Substrat für die Reaktion. Das fluoreszierende 4-MU wurde anschließend mithilfe des Fluoreszenzphotometers nachgewiesen. Um die NA Aktivität zu bestimmen, wurden 1 µl, 2,5 µl, 5 µl, 7,5 µl und 10 µl einer 8 HAU Virusverdünnung mit 50 µl einer 40 mM MUNANA-Lösung in Kalzium TBS Puffer versetzt. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C im Inkubator für 30 min. Anschließend wurde die Reaktion mithilfe von 100 µl Stopp Puffer unterbrochen, die Fluoreszenz von 4-MU wurde im Tecan Safire 2 bei $\lambda_{\text{Anregung}} = 355 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Emission}} = 460 \text{ nm}$ detektiert. Der 4-MUNANA Test wurde modifiziert nach Matrosovich *et al.* durchgeführt (262).

3.6. Tierversuche

Nachfolgend werden die Methoden der in dieser Arbeit durchgeführten *in vivo* Versuche beschrieben.

3.6.1. *In vivo* Versuche in Mäusen zur Bestimmung der Virulenz und Pathogenität von H7N7 HPAIV

In folgendem Abschnitt werden alle Methoden der verwendeten *in vivo* Versuche in Mäusen zur Untersuchung der Pathogenität und Virulenz der in dieser Arbeit untersuchten H7N7 Viren beschrieben. Den Mäusen stand jederzeit Futter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung.

3.6.1.1. Narkotisierung von Mäusen

Für eine Anästhesie vor einer Infektion wurden den Mäusen intraperitoneal (i.p.) Analgetika und Anästhetika verabreicht. Die Dosen wurden bei der Narkose auf das individuelle Gewicht der Tiere bezogen. Eine Narkose für eine Maus setzte sich aus 100 mg/kg Ketamin und 10 mg/kg Xylazin in 200 µl 0,9 %-iger physiologischer NaCl-Lösung zusammen, wobei die Narkose mithilfe einer 1 ml-Spritze und einer 26G Kanüle i.p. injiziert wurde.

Im Fall einer Blutentnahme vor einer Organentnahme der infizierten Mäuse, wurden Mäuse mittels Isofluran Inhalationsnarkose kurzzeitig betäubt. Hierzu wurde ein Isofluran-Verdampfer eingesetzt, in welchem die Tiere gezielt mit Isoflurangas nach Herstellerangaben narkotisiert wurden. Die Tiere waren während der Dauer der Isofluran Einwirkung anästhesiert.

3.6.1.2. Euthanasie von Mäusen

Im Fall einer Überschreitung von >25 % Gewichtsverlust oder vor einer Organentnahme wurden die Mäuse euthanasiert. Dies geschieht nach einer Isoflurannarkose (Kapitel 3.6.1.1) und einer anschließenden zervikalen Dislokation mittels überstrecken. Die euthanasierten Mäuse wurden nach einem Autoklavierschritt entweder direkt der Tierkörperbeseitigung zugeführt, oder es wurden zuvor noch diverse Organe der Tiere entnommen. Die Organe wurden für weitere Verwendungen bei -80 °C eingefroren oder in 4 % PFA für weitere Untersuchungen fixiert und bei 4 °C gelagert.

3.6.1.3. Intranasale Infektion von Mäusen

Zur intranasalen Infektion von Mäusen mit IAV wurden die Mäuse narkotisiert und in tiefer Narkose mit 50 µl einer definierten Virusmenge infiziert oder als Kontrolle mit 1x PBS inokuliert. Dies geschah über eine langsame Verabreichung der 50 µl Inokulum in die Nasenöffnungen der Tiere mit einer Pipette. Die Atemfrequenz der infizierten Mäuse wurde überwacht und die Mäuse wurden in Narkose in eine stabile seitliche Position mit leicht erhöhtem Kopf gelagert, um ein Herauslaufen des Inokulums zu verhindern.

3.6.1.4. Kontrolle des Gewichtsverlustes und des Überlebens der Mäuse mit MLD₅₀ Bestimmung

Für die Bestimmung der Gewichtsverluste und des Überlebens der Mäuse nach Applikation verschiedener Virusdosen wurden die Mäuse 14 Tage lang täglich kontrolliert und gewogen. Ein humaner Endpunkt mit Euthanasie einer Maus wurde definiert, wenn die Maus weniger als 75 % ihres Ausgangsgewichts am Tag der Infektion aufwies, wenn das Tier nicht mehr selbstständig fressen und trinken konnte oder an offensichtlichen Schmerzen litt. Die Gewichte, die Symptome der Virusinfektion, der Body Score sowie das Überleben der einzelnen Tiere wurden täglich dokumentiert. Die Überlebensrate der Mäuse wurde für eine Bestimmung der Maus-letalen Dosis 50 (MLD₅₀) genutzt, die mit der Reed und Muench Methode aus dem Jahr 1938 bestimmt wurde (263). Mit der Reed und Muench Methode kann die Dosis bestimmt werden, bei der 50 % der Mäuse versterben oder euthanasiert werden müssen.

3.6.1.5. Blut- und Organentnahmen

Während der durchgeführten Versuche wurden die Mäuse nur final geblutet. Nach einer Isoflurannarkose wurde retrobulbär (r.b.) Blut entnommen. Das gewonnene Vollblut wurde in EDTA Röhrchen aufgefangen und anschließend bei 4 °C für 10 min bei 1500 xg zentrifugiert, das überstehende Blutserum aliquotiert und für spätere Untersuchungen bei -80 °C eingefroren. Nach der Blutentnahme wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation euthanasiert und die Bauch und Brusthöhle eröffnet. Es folgte eine Entnahme der Lunge, der Milz, der Leber und des Gehirns. Das Gehirn wurde entnommen, indem das *Foramen magnum* des Mausschädels mit einer chirurgischen Feinschere eröffnet wurde. Jedes entnommene Organ wurde geteilt (wenn möglich sagittal), wobei ein Teil des Organs in 4 % PFA fixiert und eingelagert wurde. Ein weiterer Teil des Organs wurde in ein Röhrchen mit Schraubverschluss und Dichtungsring gefüllt mit Glaskügelchen bei -80 °C eingefroren wurde. Diese Organproben wurden vor dem Einfrieren gewogen und nach einer

Homogenisation in PBS (Kapitel 3.6.1.6) zur Bestimmung des Virustiters mittels Plaquetest verwendet (Kapitel 3.5.4).

3.6.1.6. Homogenisierung von Organen mit Glaskügelchen

Um die Virustiter in einem Organ einer infizierten Maus zu bestimmen, wurde die Hälfte eines Organs zuvor gewogen (abhängig vom Organ ~0,02 - 0,25 g), zerkleinert und bei -80 °C in Röhrchen mit Dichtungsringen mit eingefüllten Glaskügelchen eingefroren. Nach dem Auftauen des Organs wurde 1 ml 1x PBS zugegeben. Es folgte eine Homogenisierung der Organe in einer Labormühle bei 20 Hz und 4 °C für 10 min. Anschließend wurden die Homogenisate bei 3000 rpm für 5 min bei 4 °C zentrifugiert um Organteile zu pelletieren. Die neu generierten Überstände der Homogenisate wurden direkt für eine Bestimmung des Virustiters im Plaquetest verwendet (Kapitel 3.5.4), verbleibende Homogenisate wurden für eventuelle Wiederholungsversuche bei -80 °C gelagert.

3.6.2. *In vivo* Versuche in Meerschweinchen zur Untersuchung der Intraspezies-Transmission von H7N7 HPAIV

Der zweite Teil dieses Methodenabschnitts beschreibt die Methoden der durchgeführten *in vivo* Meerschweinchen Versuche. Die Meerschweinchen wurden bei etwa 21 °C und circa 50 % rH gehalten. Während der Versuche befanden sich maximal zwei Tiere in einem Typ IV Käfig mit erhöhtem Gitterdeckel. Die Käfige wurden in einem UNI-PROTECT-Laminar-Luftstromschrank bei einem 12 h Tag-/Nachtzyklus und einem konstanten Luftstrom platziert. Die Meerschweinchen, die als Raumkontrolle verwendet wurden, bewohnten dieselben Käfige unter denselben Bedingungen, allerdings außerhalb des Luftstromschranks ohne definierten Luftstrom. Allen Meerschweinchen stand Futter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung.

3.6.2.1. Narkotisierung von Meerschweinchen

Die Meerschweinchen wurden vor einer intranasalen Infektion (Kapitel 3.6.2.3), vor Nasenspülungen (Kapitel 3.6.2.5) und vor der Euthanasie (Kapitel 3.6.2.2) narkotisiert. Wie auch bei den Mäusen basiert die Narkose auch hier auf dem Gewicht jedes einzelnen Meerschweinchens. Dazu wurden die Meerschweinchen gewogen und eine entsprechende Narkose aus 100 mg/kg Ketamin und 10 mg/kg Xylazin in 0,9 %-iger NaCl-Lösung mit einem Gesamtvolumen von 200 µl angesetzt. Die Narkose wurde intramuskulär (i.m.) mit einer 1 ml-Spritze und 26G Kanüle in den Oberschenkelmuskel des Meerschweinchens injiziert,

wobei zur Vermeidung von Hämatombildung jeweils am nächsten Tag die Narkose in den anderen Oberschenkel injiziert wurde. Die Atemfrequenz der infizierten Meerschweinchen wurde überwacht und die Tiere wurden in Narkose in einer stabilen seitlichen Position gelagert. Nach erfolgter Infektion oder Nasenspülung des Meerschweinchens wurden die empfindlichen Augen der Tiere mit Augensalbe befeuchtet.

3.6.2.2. Euthanasie von Meerschweinchen

Die infizierten Meerschweinchen entwickelten keinerlei Symptome und zeigten keinen Gewichtsverlust nach einer Infektion mit den verwendeten IAV Stämmen. Die Meerschweinchen wurden trotzdem regelmäßig gewogen, um andere Erkrankungen oder Verletzungen, die mit Gewichtsverlust einhergehen können, auszuschließen. Zudem wurden die Tiere täglich beobachtet und optisch kontrolliert. Auch in den durchgeführten Versuchen mit Meerschweinchen wurden humane Endpunkte zur Euthanasie gesetzt. Im Fall von offensichtlichen Schmerzen oder einer unmöglichen Futter- und Wasseraufnahme der Tiere wurden die Meerschweinchen euthanasiert. Außerdem wurden die Tiere schmerzlos getötet, wenn mehr als 15 % ihres Ausgangsgewichts am Tag der Infektion verloren oder ein sehr rapider Gewichtsverlust von >10 % auftrat. Eine schmerzlose Euthanasie wurde mittels Überdosis einer Narkose durch das Barbiturat Pentobarbital-Natrium *Narcofen* durchgeführt. Nach einer erfolgten i.m. Narkose der Meerschweinchen wurde diese Überdosis von 800 mg/kg Körpergewicht i.p. mit einer 3 ml-Spritze und einer 26G Kanüle injiziert. Die euthanasierten Meerschweinchen wurden nach einem Autoklavierschritt entweder direkt der Tierkörperbeseitigung zugeführt, oder es wurden vor dem Autoklavieren diverse Organe der Tiere entnommen und für weitere Verwendungen bei -80°C eingefroren oder in 4 % PFA fixiert und bei 4 °C gelagert.

3.6.2.3. Intranasale Infektion von Meerschweinchen

Um Meerschweinchen mit IAV zu infizieren, wurden die Tiere zuerst narkotisiert. Es folgte eine i.n. Infektion mit insgesamt 300 µl Virusverdünnung. Alle Meerschweinchen wurden mit $5 \cdot 10^5$ p.f.u. der jeweiligen rekombinanten SC35 und SC35F Viren oder des parentalen SC35 Virus infiziert. In jede Nasenöffnung wurden hierzu langsam zweimal 75 µl der Virusverdünnung pipettiert. Kontrolltiere und Sentinel-Meerschweinchen erhielten dieselbe Menge sterilen 1x PBS. Nach einer durchgeführten intranasalen Infektion wurden die Meerschweinchen mit erhöhtem Oberkörper gelagert, um ein Herausfließen des Inokulums aus der Lunge zu verhindern.

3.6.2.4. Versuche zur Virus-Intraspezies-Transmission im Meerschweinchen

In den beiden nachfolgenden Kapiteln werden die beiden unterschiedlichen Untersuchungen der Virus-Transmission beschrieben. Alle Transmissionsversuche wurden bei etwa 21 °C und etwa 50 % relativer Luftfeuchtigkeit durchgeführt. Die eingestellte Strömungsgeschwindigkeit in dem Luftstromschrank betrug zu jeder Zeit an den Stellen des Luftaustritts etwa 0,9 m/s.

3.6.2.4.1. Untersuchung der Aerogentransmission

Meerschweinchen eignen sich als Modellorganismus zur Untersuchung der Transmissionsfähigkeit eines Influenza A Virus (104, 231). Um die Fähigkeit eines Virus zur Luftübertragbarkeit zu untersuchen, wurden zwei Meerschweinchen infiziert (Kapitel 3.6.2.3) und anschließend in speziell angefertigten Transmissionskäfigen mit Gittern an den Seiten platziert. Der Transmissionskäfig wurde in einem Luftstromschrank so aufgestellt, dass zwei Sentinel-Meerschweinchen in einem Transmissionskäfig in dem Luftstrom der zwei infizierten Tiere standen (siehe Abbildung 6A). Wie bereits zuvor beschrieben, befinden sich die Transmissionskäfige in einem 10 cm Abstand zueinander, wobei Luft von den infizierten Tieren zu den Sentineltieren strömte (28). Außerhalb des Luftstromschrankes befand sich mindestens ein Raumkontrollmeerschweinchen. Dieses Tier wurde zusammen mit den anderen Meerschweinchen zur Organentnahme euthanasiert, die Organe wurden auf Anwesenheit von Virus getestet (mittels Plaquetest und Histopathologie). Jedes Meerschweinchen wurde an Tag 0, dem Tag der Infektion, narkotisiert. Anschließend wurden die Tiere entweder mit 1x PBS intranasal behandelt oder das Virusinokulum wurde intranasal appliziert. An den Sentineltieren und den infizierten Meerschweinchen wurden unter Narkose Nasenspülungen an Tag 1, 3, 6 und 9 p.i. vorgenommen (Kapitel 3.6.2.5).

3.6.2.4.2. Untersuchung der Transmission über direkten Kontakt

Zur Untersuchung der Fähigkeit eines Virus zur Kontakttransmission wurde jeweils ein infiziertes Meerschweinchen zusammen mit einem nicht infizierten Meerschweinchen in einem Käfig platziert (Abbildung 6B).

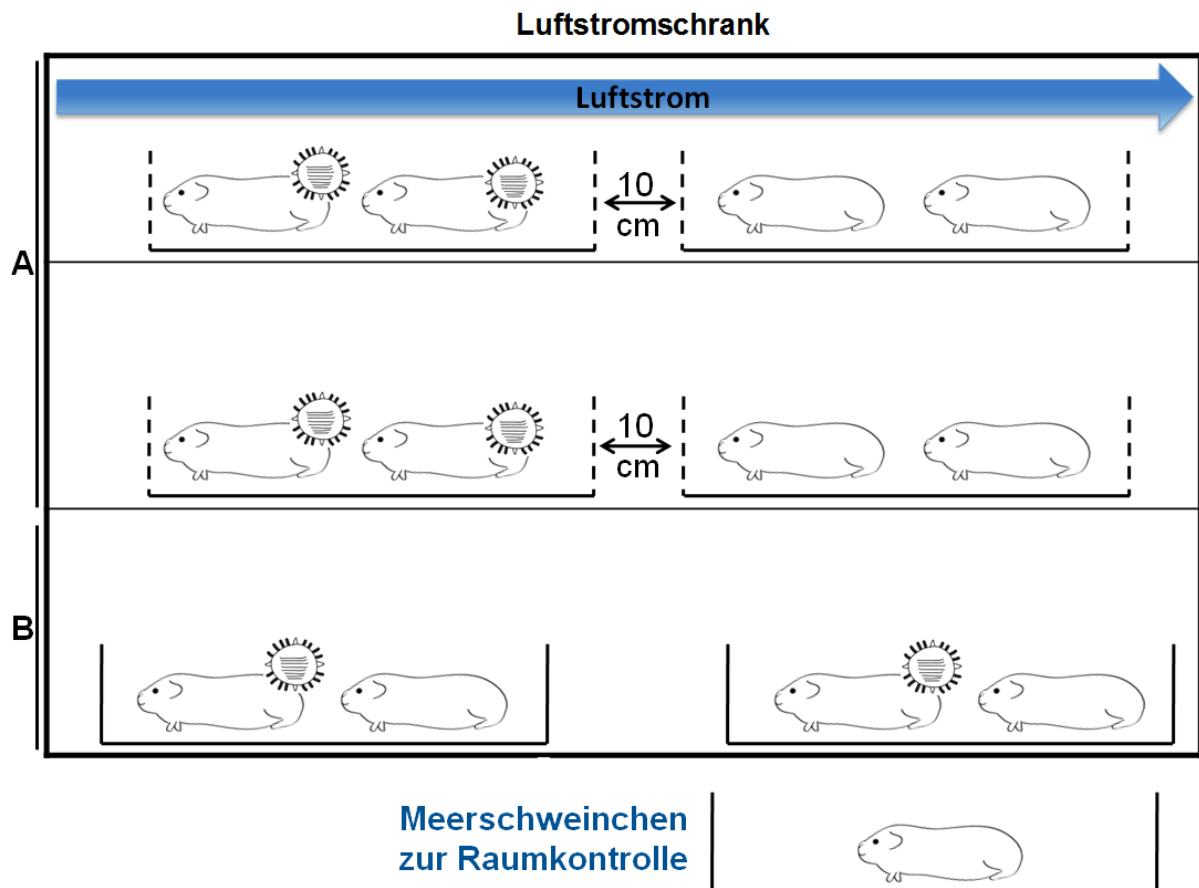


Abbildung 6: Versuchsaufbau im Luftstromschrank zur Untersuchung der Transmission von Influenza A Viren im Meerschweinchen.

Dargestellt ist ein Luftstromschrank mit einem von links nach rechts gerichteten Luftstrom eines definierten Volumens und einer anfänglichen Strömungsgeschwindigkeit von etwa 0,9 m/s. Die Donor-Meerschweinchen sind mit einem Virussymbol gekennzeichnet. Im Fall der Untersuchung der Aerogentransmission (A) sind jeweils zwei infizierte Meerschweinchen in einem Transmissionskäfig 10 cm entfernt platziert von einem weiteren Transmissionskäfig mit zwei Sentinel-Meerschweinchen. Im Fall der Aerogenen Übertragung des Virus auf die Sentineltiere wäre in den Nasenspülungen dieser Tiere Virus nachweisbar. Zur Untersuchung der Transmission über direkten Kontakt (B) wurden jeweils ein Donor- und ein Sentinel-Meerschweinchen zusammen in einem Käfig platziert. Im Fall einer Übertragung des Virus durch direkten Kontakt wäre Virus in den Nasenspülungen der Sentineltiere nachweisbar (illustriert von C. Dreier, 2016).

Die infizierten Meerschweinchen dienen hier als Virusdonor für die Untersuchung der Aerogentransmission. Jedes Tier wurden an Tag 0, dem Tag der Infektion, narkotisiert. Anschließend wurden entweder 1x PBS oder Virusinokulum intranasal appliziert. An den Tagen 1, 3, 6 und 9 p.i. wurden, wie bei der Untersuchung zur Aerogentransmission, Nasenspülungen durchgeführt. Die Nasenspülungen wurden nach einmaligem Einfrieren mittels Plaquetest auf die enthaltene Viruslast im Nasen- und Rachenraum der Meerschweinchen hin untersucht.

3.6.2.5. Nasenspülungen

Um die Anwesenheit von Virus im Rachen- und Nasenraum zu überprüfen, und somit den Virustiter zu bestimmen, wurden Nasenspülungen jedes Tieres durchgeführt. Dazu wurden die Tiere narkotisiert und mit leichtem Druck in jede Nasenöffnung 700 µl 1x PBS versetzt mit 0,2 % BSA und 1 % P/S pipettiert. Der Ausfluss aus der anderen Nasenöffnung wurde in einer Petrischale aufgefangen. Die Atemfrequenz der Meerschweinchen nach den Nasenspülungen wurde überwacht und die Tiere wurden in einer stabilen seitlichen Position mit leicht abgesenktem Kopf gelagert, damit die im Respirationstrakt verbleibende Nasenspülung abfließen konnte. Im Anschluss wurden die Nasenspülungen durch Zentrifugation bei 2000 xg und 4 °C für 5 min von Zelltrümmern und Mukus befreit. Nasenspülungen wurden an den Tagen 1, 3, 6 und 9 nach der i.n. Gabe von PBS (Sentinel-Meerschweinchen) oder Infektion mit Virus (Donor-Meerschweinchen) durchgeführt. Eine Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Infektion und der Nasenspülungen ist in Abbildung 7 abgebildet. Die Nasenspülungen wurden anschließend aliquotiert und bis zur Verwendung im Plaque Test bei -80 °C eingefroren.

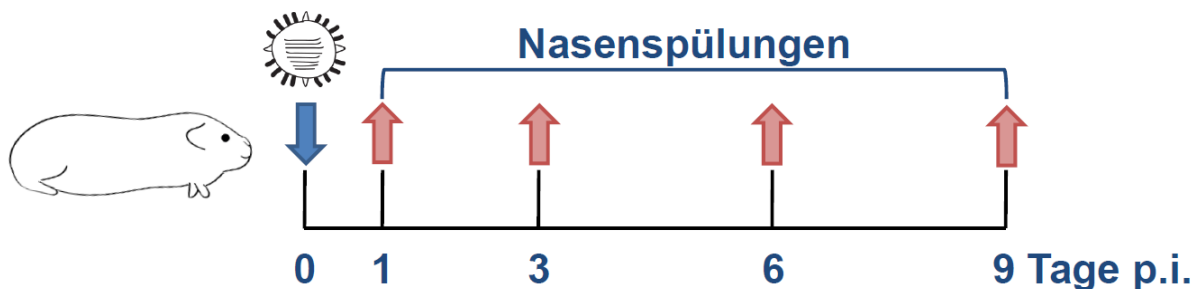


Abbildung 7: Zeitlicher Verlauf in Transmissionsversuchen im Meerschweinchen.

Dargestellt ist die Infektion der Meerschweinchen mit Virus oder PBS (nicht infizierte Tiere) an Tag 0 p.i.. Es folgen Nasenspülungen unter Narkose an den Tagen 1, 3, 6 und 9 p.i. (illustriert von C. Dreier, 2016).

3.6.2.6. Blut- und Organentnahme

Zur finalen Blutabnahme vor der Euthanasie der Tiere, wurde das Herz punktiert. Diese intrakardiale (i.k.) Blutentnahme erfolgte unter Pentobarbital-Natrium Überdosis. Dazu wurde eine 10 ml-Spritze mit einer 20G Kanüle (25 mm lang) ventral mit einem Winkel von etwa 45 ° in das Herz eingeführt und mehrere Milliliter Blut entnommen.

Die Entnahme der Organe wurde ebenfalls nach einer Überdosis Pentobarbital-Natrium in Form von *Narcoren* durchgeführt. Für die Organentnahme wurden der Bauch- und Brustraum des Tieres bis zum Kopf hin eröffnet. Die Trachea wurde oberhalb der Lunge und unmittelbar unterhalb des Kehlkopfes durchtrennt. Die Lungen wurden in vier Quadranten

aufgeteilt (oben rechts, unten rechts, oben links und unten links). Jeweils die Hälfte des entnommenen Organs wurde in 4 % PFA fixiert und bei 4 °C gelagert. Die anderen Hälften wurden gewogen und in Röhrchen mit Dichtung und Schraubverschluss mit eingefüllten Glaskügelchen bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

3.6.2.7. Homogenisierung von Meerschweinchenorganen

Die Herstellung von Homogenisaten der Lungenteile und der Trachea erfolgte, wie bereits für die Organe von Mäusen in Kapitel 3.6.1.6, beschrieben.

3.7. Histologie

Nachfolgend sind die Vorbereitungen der Gewebeproben sowie die Färbungen der Gewebeschnitte beschrieben.

3.7.3. Aufbereitung der Proben für Histologie

Eine Fixierung der Gewebeproben erfolgte für mindestens zwei Wochen bei 4 °C. Nach der vollständigen Fixierung der Gewebeproben von Mäusen oder Gewebeproben von Meerschweinchen in 4 % PFA, wurden die Proben in Paraffin eingebettet. Vor dem Einbetten wurden die Proben in 1x PBS gelagert, um den Proben das PFA zu entziehen. Es folgten mehrere Schritte von Inkubationen mit aufsteigenden Konzentrationen Ethanol und einer anschließenden Behandlung mit Xylol um die Proben zu entwässern. Im Anschluß wurden die Proben mit Paraffin infiltriert. Die verwendeten Entwässerungsschritte, sowie die Paraffinbehandlung der Gewebeproben im Gewebeeinfiltrationsautomat sind nachfolgend aufgeführt:

Beschreibung des Programms:

- Ethanol, 70 % für 1 h
- Ethanol, 80 % für 1 h
- Ethanol, 90 % für 1 h
- Ethanol, 95 % für 1 h
- Ethanol, 100 % für 1 h
- Ethanol, 100 % für 1,5 h
- Xylol I für 1 h
- Xylol II für 1 h
- Paraffin Typ 3, bei 58 °C für 1 h

Methoden

- Paraffin Typ 3, bei 58° C für 1 h
- Paraffin Typ 3, bei 58 °C für 1 h

Nachfolgend wurden die Gewebeproben in Paraffin eingebettet. Die Einbettung wurde mithilfe einer Paraffinausgießstation durchgeführt. Im Anschluß erfolgte einer Lagerung der Paraffinblöcke bis zur weiteren Verwendung im Dunkeln bei RT. Um die Paraffinblöcke in Dünnschnitte weiterzuverarbeiten, wurden diese auf einer Kühlplatte für etwa 30 min auf ungefähr -12 °C abgekühlt. Dies ermöglichte das Schneiden der Paraffinblöcke in 4 µm dicke Dünnschnitte. Die Herstellung der Schnitte erfolgte am Mikrotom, wobei die Gewebeschnitte direkt nach dem Schneiden zur Ausbreitung in ein Wasserbad mit 42 °C überführt wurden. Anschließend wurden die Gewebeschnitte auf einen Objektträger aufgenommen und bei 37 °C über Nacht getrocknet.

Die Schnitte auf den Objektträgern können bei RT bis zur Färbung gelagert werden und werden als FFPE-Gewebeschnitte (*formalin-fixed paraffin-embedded*) bezeichnet.

Vor einer histochemischen oder immunhistochemischen Färbung wurden die Gewebeschnitte entparaffiniert und rehydriert. Dies wurde für die immunhistochemische Antigenfärbung mittels Xylol-ähnlichen Lösungen und ansteigenden Alkoholkonzentrationen durchgeführt. Die Schritte dieser durchgeführten Entwässerung der Gewebeproben im Gewebeeinfiltrationsautomaten sind nachfolgend beschrieben.

- Ottix Plus, I für 5 min
- Ottix Plus, II für 5 min
- Ottix Plus, III für 5 min
- Ottix Plus, IV für 5 min
- Ottix Shaper, I für 2 min
- Ottix Shaper, II für 2 min
- Ottix Shaper, III für 2 min
- Ottix Shaper, IV für 2 min
- ddH₂O, dd für 2 min
- ddH₂O, dd für 2 min

3.8.2. Hämatoxylin-Eosin Färbung

Um unter dem Mikroskop zwischen Zellkern und Zytoplasma der einzelnen Zellen unterscheiden zu können, wurden Gewebeproben mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Das Hämatoxylin färbt hierbei saure und basophile Bausteine der Zelle, wie den Zellkern und das

Methoden

raue Endoplasmatische Retikulum blau bis violett an. Das Eosin hingegen ist in der Lage basische, auch genannt eosinophile Zellstrukturen, wie das Zytoplasma, Mitochondrien und das glatte Endoplasmatische Retikulum, rot zu färben. Die HE-Färbung wurde in den entparaffinierten FFPE-Gewebeschnitten durchgeführt. Die Schritte der durchgeführten Färbung sind nachfolgend beschrieben.

- H₂O, doppelt destilliert (dd) für 2 min
- Hämatoxylinlösung für 4 min
- fließendes Leitungswasser für ca. 10 s
- Ethanol, 100 % mit HCl, 3% für 10 s
- fließendes Leitungswasser für 5 min

Es folgte eine Entwässerung der Proben mit den Ersatzstoffen Ottix Shaper (Alkoholversatz) und Ottix Plus (Xylolersatz). Die durchgeführten Schritte der Entwässerung von Gewebeproben sind nachfolgend beschrieben.

- Ottix Shaper, I 10x für wenige Sekunden eintauchen
- Ottix Shaper, II 10x für wenige Sekunden eintauchen
- Ottix Shaper, III 10x für wenige Sekunden eintauchen
- Ottix Shaper, IV für 5 min
- Ottix Plus, I 10x für wenige Sekunden eintauchen
- Ottix Plus, II 10x für wenige Sekunden eintauchen
- Ottix Plus, III 10x für wenige Sekunden eintauchen
- Ottix Plus, IV 10x für wenige Sekunden eintauchen
- Xylol 10x eintauchen, mindestens 10 min inkubieren

Es folgte eine Eindeckelung der FFPE-Gewebeschnitte mit Eukitt und eine Lagerung bei RT im Dunkeln bis die Dünnschnitte mikroskopisch ausgewertet wurden.

3.8.3. Immunhistochemische Färbung von FFPE-Gewebeschnitten (IHC-P)

Zur Detektion von virusinfizierten Zellen zur Bestimmung des Zell- und Gewebetropismus der rekombinanten Viren in den FFPE-Gewebeschnitten, wurden diese immunhistochemisch gefärbt (IHC-P). Um das IAV in den Schnitten nachweisen zu können, wurden entparaffinierte und dehydrierte Gewebeschnitte (beschrieben in Kapitel 3.7.3) verwendet.

Methoden

Diese wurden zuerst mit einem Citrat Plus Puffer in der Mikrowelle aufgekocht. Die verwendeten Programme waren die Folgenden:

- 16 min bei 850 Watt in der Mikrowelle
- 5 min bei 450 Watt
- etwa 20 min Abkühlungszeit
- einmal für 5 min in 1x PBS waschen

Die Behandlung mit dem Citrat Plus Puffer dient der Demaskierung des viralen Antigens. Zur Detektion des viralen Antigens wurde ein Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) Konjugat eingesetzt. Um eine zu hohe DAB-Hintergrundfärbung zu vermeiden, erfolgte ein Blockieren der endogenen Peroxidase. Dies geschah mit einer Methanolbehandlung mit 3 % H₂O₂ für 5 min bei RT. Es folgte ein Waschschrift in 1x PBS für 5 min bei RT. Das Avidin und Biotin wurden mittels Verwendung eines Avidin/Biotin Blocking Kits geblockt. Dazu wurde jede enthaltene Lösung mit den Proben für 15 min bei RT inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe in 1x PBS für 5 min bei RT. Anschließend wurden die Proben mit dem ZytoChemPlus (HRP) Broad Spectrum (DAB) Kit für 5 min bei RT inkubiert. Wieder folgten drei Waschschriffe in 1x PBS für 5 min bei RT. Um eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers auszuschließen, erfolgte eine Inkubation mit 10 % Eselserum für 30 min bei RT. Es folgte eine Inkubation der Gewebeschnitte mit dem Primärantikörper Kaninchen anti-FPV, welcher gegen das komplette FPV Virus gerichtet ist. Der anti-FPV Antikörper wurde 1:2000 in PBS für 75 min bei RT eingesetzt.

Nachfolgend wurden die Schnitte dreimal mit PBS-T Puffer für 5 min bei RT, dann dreimal 5 min mit 1x PBS bei RT gewaschen. Nachfolgend wurde der Biotin-konjugierte Sekundärantikörper anti-Kaninchen in 1x PBS mit 2 % Eselserum mit dem Gewebeschnitt für 25 min bei RT inkubiert. Nachfolgend wurden die Schnitte dreimal mit 1x PBS für 5 min bei RT gewaschen. Es folgte eine 15 minütige Inkubation mit einem Streptavidin-HRP-Konjugat des ZytoChemPlus (HRP) Broad Spectrum (DAB) Kit bei RT. Nachfolgend wurden die Schnitte zweimal mit 1x PBS bei RT gewaschen und das Antigen des IAV mit HRP, 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) durch indirekte Färbung immunohistochemisch nach Herstellerangaben detektiert. Die Reaktion wurde lichtmikroskopisch kontrolliert und nach ausreichender Färbung nach 3-5 min durch Wasserzugabe gestoppt. Um eine Gegenfärbung der basophilen Zellbausteine zu erhalten, wurde eine Hämatoxylin-Färbung angeschlossen (Kapitel 3.8.2), die in der Intensität der DAB Färbung angepasst wurde.

4. Ergebnisse

Alle nachfolgenden Ergebnisse wurden im Zuge der vorliegenden Doktorarbeit generiert. Hierbei werden die Ergebnisse in zwei verschiedene Kapitel unterteilt und stellen die Ergebnisse der *in vitro* sowie der *in vivo* Charakterisierungen der SC35F-spezifischen Mutationen dar.

4.1. In vitro Charakterisierung der SC35F-spezifischen Mutationen

In den nachfolgenden Abschnitten sind die Ergebnisse der *in vitro* Charakterisierungen der SC35F-spezifischen Mutationen dargestellt.

4.1.1. **Detektion von SC35F-spezifischen Mutationen auf Nukleotid- und Aminosäuresequenzebene im Vergleich zum parentalen Virus SC35**

Um adaptive Mutationen im SC35F Genom detektieren und auf molekularer Ebene charakterisieren zu können, wurde das SC35F Virus erstmals mittels Sanger Sequenzierung sequenziert. Zum Erhalt der vollständigen Sequenz des SC35F Genoms wurde das SC35F Virus inaktiviert und anschließend die vRNA isoliert. Diese vRNA wurde zur RT verwendet, um cDNA zu generieren. Im Anschluß diente diese cDNA als Matrize zur Vermehrung des Genoms mittels PCR.

Im Anschluss an die Sequenzierung erfolgte ein Vergleich der Sequenz des parentalen SC35 und des in dieser Arbeit sequenzierten SC35F Virus. Nach vergleichenden Analysen zu SC35 konnten sieben Mutationen auf Nukleotidebene und sechs Mutationen, die zu Aminosäureaustauschen führen, im SC35F Genom detektiert werden. Bei den SC35F-spezifischen Aminosäure (*amino acid*; aa) Mutationen handelt es sich um PB2_{H357N}, PB1_{L13P}, HA_{I111T/A146S/G340R} und NA_{A328S}. Eine Übersicht der detektierten aa und Nukleotid (nt) Austausche in SC35F im Vergleich zu SC35 ist in nachfolgender Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Nukleotid- und Aminosäuresequenzunterschiede zwischen SC35 und SC35F (H7N7)

Virales Gen	PB2		PB1	HA			NA
aa	H357 N	Q628 Q	L13 P	I111 T	A146 S	G340 R	A328 S
nt	c1096 a	a1911 g	t62 c	t353 c	g457 t	g1039 a	g1004 t
SC35	(CAT) H	(CAA) Q	(CTA) L	(ATA) I	(GCC) A	(GGA) G	(GCA) A
SC35F	(AAT) N	(CAG) Q	(CCA) P	(ACA) T	(TCC) S	(AGA) R	(TCA) S

Das komplette virale Genom von SC35F wurde mithilfe von Sanger Sequenzierung sequenziert und nachfolgend mittels der Clone Manager Software translatiert. Die viralen Gene PB2, PB1, NA und HA von SC35F wiesen 7 Austausche in der nt Sequenz und 6 daraus resultierende aa Mutationen vergleichend zu der Sequenz von SC35 auf.

SC35F-spezifische Positionen sind fett dargestellt; aa: Aminosäure; nt: Nukleotid

Um herauszufinden, ob nach der Adaptation von SC35 an die Maus (SC35M) ähnliche Mutationen im Genom aufzufinden sind, wurden im Folgenden SC35, SC35M und SC35F verglichen.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich SC35 und SC35F in 7 Nukleotiden und 6 Aminosäuren unterscheiden.

4.1.2. Vergleich von SC35, SC35F und der mausadaptierten Variante SC35M

Zum Vergleich der Mutationen im SC35M und SC35F Genom, wurden die viralen Gensegmente durch Alignments auf Aminosäuresequenzebene gegenübergestellt. Das mausadaptierte Virus SC35M wurde bereits von Gabriel und Kollegen im Jahr 2005 vollständig sequenziert und die SC35M-spezifischen Mutationen *in vitro* und *in vivo* charakterisiert (188). Da SC35 das parentale Virus sowohl von SC35F, als auch SC35M ist und beide Virusvarianten an Säuger adaptiert wurden, werden die aa Sequenzen von SC35, SC35M und SC35F in nachfolgender Tabelle 3 verglichen.

Tabelle 3: Die Aminosäuresequenzmutationen von SC35M und SC35F im Vergleich zu SC35 (H7N7).

Virales Gen	PB2				PB1		PA	NP	HA			NA
aa Position	333	357	701	714	13	678	615	319	111	146	340	328
SC35	H	T	D	S	L	S	K	N	I	A	G	A
SC35M	H	I	N	R	P	N	N	K	I	A	R	S
SC35F	N	T	D	S	P	S	K	N	T	S	R	S

Darstellung der viralen Proteine von SC35M und SC35F, in welchen durch Sequenzanalysen Unterschiede zu SC35 detektiert wurden. Die verwendete Nomenklatur für alle Proteine ist die des H7N7 Subtyps.

aa Position: Nummerierte Stelle der Mutation in der Aminosäuresequenz des Proteins; SC35-spezifische (grün); SC35M-spezifische (rot) und SC35F-spezifische (blau) aa sind farbig hervorgehoben.

Nach einer vergleichenden Untersuchung der Aminosäuresequenzmutationen konnten zwischen SC35M und dem parentalen SC35 neun aa Mutationen detektiert werden. Interessanterweise zeigen SC35M und SC35F in PB1 an aa Position 13, in HA an aa Position 340 und in NA an aa Position 328 dieselben Mutationen auf. Da in dem maus- (SC35M) und frettchenadaptierten (SC35F) Virus diese drei identischen Mutationen aufgetreten sind, könnten diese Mutationen in H7 Viren als Adaptationsdeterminanten an den Säuger verstanden werden. Um die detektierten SC35F-spezifischen Mutationen einzeln zu charakterisieren, wurden rekombinante Viren in Form von Einzelpunktmutanten oder Einzelgenreassortanten generiert. Diese Viren wurden danach für *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen genutzt.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich SC35 und SC35F in 6 Aminosäuren unterscheiden. Wir konnten ebenfalls zeigen, dass drei der SC35F-spezifischen Mutationen (PB1_{L13P}, HA_{G340R} und NA_{A328S}) bereits in SC35M detektiert wurden.

4.1.3. Generierung rekombinanter SC35F Viren im SC35 Hintergrund

Zur molekularen Charakterisierung sowie der Untersuchung von Pathogenitäts- und Transmissionseigenschaften von SC35F wurden rekombinante Viren im SC35 Hintergrund mit SC35F-spezifischen Aminosäureaustauschen generiert. Diese Einzelpunktmutanten bzw. –genreassortanten, wenn ganze Gensegmente ausgetauscht wurden in dieser Arbeit mittels Reverser Genetik generiert (Kapitel 3.5.1). Dazu wurden zur Rekonstruktion der Viren HEK293T Zellen mit den Expressionsplasmiden von SC35 und SC35F transfiziert. Anschließend wurde aus dem rekombinanten Virusstock ein neuer Virusstamm aus einem

funktionellen Virusklon generiert. Neben den Einzelgenreassortanten und -punktmutanten konnte ein komplettes SC35F Virus generiert werden, das keine multi-BCS sondern eine mono-BCS im HA aufweist. Die so generierten rekombinanten Viren sind in folgender Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Generierte rekombinante SC35 und SC35F Viren.

Virus	Genotyp							
	PB2	PB1	PA	NP	HA	NA	M	NS
SC35	■	■	■	■	■	■	■	■
SC35F (nicht generiert)	■	■	■	■	■	■	■	■
SC35-PB2 _{SC35F}	■	■	■	■	■	■	■	■
SC35-PB1 _{SC35F}	■	■	■	■	■	■	■	■
SC35-NA _{SC35F}	■	■	■	■	■	■	■	■
SC35-HA _{SC35F}	■	■	■	■	■	■	■	■
SC35-HA _{111T}	■	■	■	■	111T	■	■	■
SC35-HA _{146S}	■	■	■	■	146S	■	■	■
SC35-HA _{340R}	■	■	■	■	340R	■	■	■
SC35F-HA _{monobasisch}	■	■	■	■	mono	■	■	■

Da Arbeiten mit dem kompletten SC35F Virus nur im BSL-4 Labor möglich sind und ein solches Labor im Heinrich-Pette-Institut nicht verfügbar ist, durften nur einzelne SC35F-spezifische Gene oder Mutationen in den SC35 Hintergrund mit einer multi-BCS generiert werden. Zudem durfte ein Virus mit allen SC35F-spezifischen Mutationen in einem SC35 Hintergrund mit einer mono-BCS (mono) hergestellt werden (SC35F-HA_{monobasisch}). Diese rekombinanten SC35 und SC35F Viren sind BSL-3 Pathogene. Die Reassortanten SC35-PB1_{SC35F}, SC35-PB2_{SC35F}, SC35-NA_{SC35F}, SC35-HA_{SC35F} sind Einzelgenreassortanten im SC35 Hintergrund, wohingegen es sich bei den Reassortanten SC35-HA_{111T}, SC35-HA_{146S}, SC35-HA_{340R} um Einzelpunktmutanten (Mutationen in weiß markiert) handelt, die ebenfalls im SC35 Hintergrund generiert wurden. Die SC35-spezifischen Gene (grau) und die SC35F-spezifischen Gene (schwarz) sind in der Tabelle mittels Kästchen in unterschiedlichen Schattierungen hervorgehoben.

Die generierten, rekombinanten SC35 und SC35F Viren wurden im Anschluß zur Charakterisierung der Mutationen in diversen *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen verwendet.

4.1.4. Untersuchungen der Polymeraseaktivität der SC35F Mutationen im PB1 und PB2 Protein

Die virale Polymerase des IAV, bestehend aus PB2, PB1 und PA, transkribiert und repliziert in Kombination mit NP die virale RNA (264). Untersuchungen eines säugeradaptierten H7N7 HPAIV konnten zeigen, dass eine Adaptation an Säugetiere durch Mutationen in der Polymerase und dem NP Protein vermittelt wird (25, 188). Mithilfe des Luciferase Tests wurde der mögliche Einfluss der SC35F-spezifischen Mutationen PB2_{H357N} und PB1_{L13P} auf die vRNP-Aktivität in HEK293T Zellen untersucht (detailliert beschrieben in Kapitel 3.4.1). Dazu wurden HEK293T Zellen mit Plasmiden, die für die Polymeraseuntereinheiten (PB1, PB2, PA) sowie das NP kodieren zusammen mit den Luciferase-kodierenden Plasmiden (Renilla-Luciferase) pRL-TK und pPol-I-NP-Luc (Firefly-Luciferase) transfiziert. Um die SC35F-spezifischen Mutationen der Polymerase einzeln und in Kombination auf ihre Polymeraseaktivität hin zu testen, wurden vRNP Untereinheiten in verschiedenen Kombinationen im SC35 Hintergrund transfiziert. Die Polymeraseaktivitäten der vRNP Komplexe in den HEK293T Zellen wurden 24 h nach der Transfektion bestimmt.

Ein Weglassen des PB2 Plasmids bei der Transfektion fungierte in diesem Test als Negativkontrolle. Die relative Polymeraseaktivität in Zellen transfiziert mit SC35-spezifischen vRNP Untereinheiten wurde durch Einbezug der Renilla- und Firefly-Luciferaseexpression berechnet und auf 100 % gesetzt. Alle anderen Werte sind in Relation zur vRNP Aktivität von SC35 dargestellt (Abbildung 8).

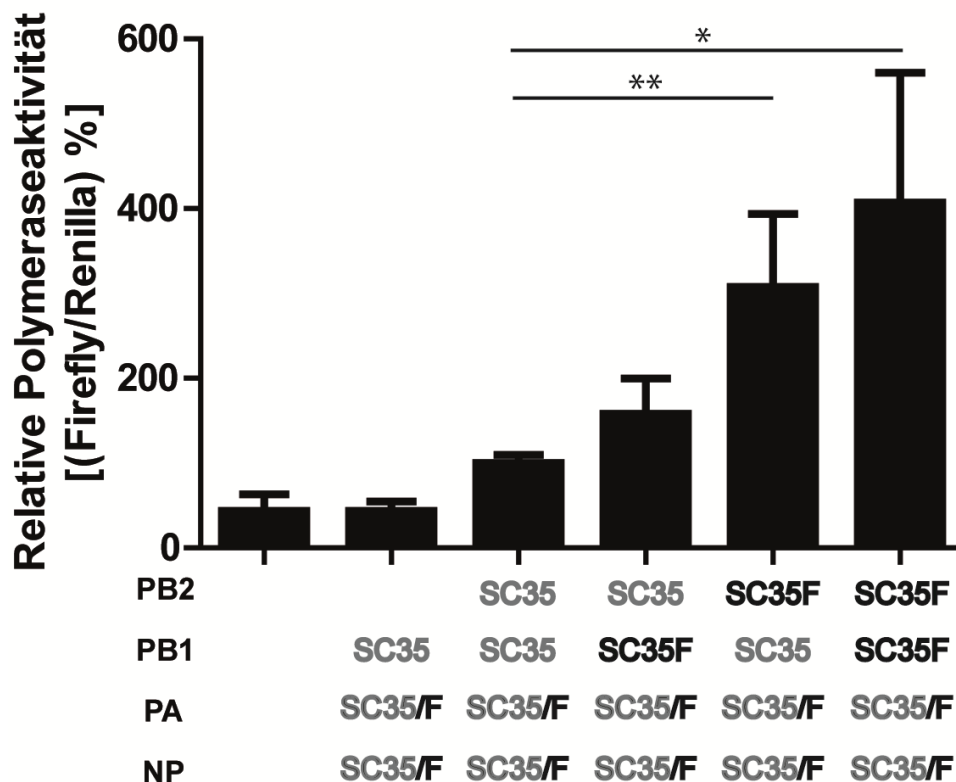


Abbildung 8: vRNP-Aktivität von SC35 und SC35F rekombinanten Viren.

Die Säulen des Diagramms stellen die Ergebnisse aus Transfektionen von HEK293T Zellen mit den angegebenen SC35 und SC35F Expressionsplasmiden dar. HEK293T Zellen wurden mit 0,5 µg der Expressionsplasmide pPol-I-NP-Luc, pRL-TK und PB1, PB2, PA und 1 µg NP von SC35 oder SC35F transfiziert. Die vRNP-Aktivität wurde 24 h nach Transfektion bestimmt. Die normalisierte vRNP-Aktivität der SC35 transfizierten Zellen wurde auf 100 % gesetzt, wobei die restlichen Werte dazu in Relation stehen. Die Ergebnisse dieser Abbildung stammen aus mindestens drei unabhängigen Ergebnissen mit Triplikaten. Die statistische Relevanz der Ergebnisse wurde mithilfe des Student's *t*-Test in dem Programm GraphPad ermittelt (**p*<0,05, ***p*<0,01, ****p*<0,001).

Für PA und NP wurden identische Plasmide (SC35/F) verwendet, da in diesen Genen zwischen SC35 und SC35F keine Sequenzunterschiede vorhanden sind. SC35F-spezifische Positionen sind in schwarz dargestellt. SC35-spezifische Positionen sind in grau dargestellt.

Die Polymeraseaktivität des vRNP-Komplexes von SC35 (Abbildung 8) war relativ zur Negativkontrolle nur geringfügig höher. Das Einbringen der SC35F-spezifischen PB1 Untereinheit resultierte lediglich in einer leichten, jedoch nicht signifikanten Erhöhung der Polymeraseaktivität. Allerdings wurde die Polymeraseaktivität signifikant erhöht, nachdem das SC35F-spezifische PB2 in den SC35 RNP-Komplex Hintergrund eingebracht wurde. Durch das Einfügen der SC35F-spezifischen Polymerasen (PB2 und PB1) konnte die Polymeraseaktivität gegenüber SC35 ebenfalls signifikant erhöht werden.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass der SC35 vRNP-Komplex in HEK293T Zellen im Allgemeinen in einer niedrigen Polymeraseaktivität resultiert. In einem SC35 vRNP-Komplex Hintergrund sind die SC35F-spezifischen Mutation PB2_{H357N}, sowie PB2_{H357N} mit PB1_{L13P} in Kombination in der Lage die Polymeraseaktivität signifikant zu erhöhen.

4.1.5. Charakterisierung der SC35F NA Mutation

Die NA von IAV entfernt Sialinsäuren von neugebildeten IAV, Glykoproteinen und Wirtszellrezeptoren. Durch diese Sialidasefunktion der NA wird die Freisetzung von Nachkommenviren aus infizierten Zellen vermittelt (262). In der Sequenz des NA Proteins von SC35F wurde im Vergleich zu SC35 die NA_{A328S} Mutation detektiert. Um mögliche Unterschiede in der Neuraminidaseaktivität des SC35- und SC35F-spezifischen NA Proteins zu untersuchen, die durch diese Mutation vermittelt werden, wurde der Erythrozyten Elutionstest und der 4-MUNANA Test durchgeführt. Beide Tests nutzen die Sialidasefunktion der Neuraminidase um deren Aktivität zu ermitteln, wobei der Erythrozytenelutionstest auf der Verwendung von Erythrozyten und der 4-MUNANA Test auf der Verwendung eines fluoreszierenden Spaltprodukts basiert.

4.1.5.1. Untersuchung der Auswirkung der NA_{328S} Mutation auf die Neuraminidaseaktivität mittels Erythrozytenelution

Es konnte gezeigt werden, dass die NA von IAV in der Lage ist, an Erythrozyten gebundenes Virus freizusetzen (261). Um zu ermitteln, ob Unterschiede in der Erythrozytenelution bei Einführung der SC35- oder SC35F-spezifischen Mutationen auftreten, wurden die beiden Viren in Bezug auf ihre Elutionseigenschaften getestet. Wie bereits in Kapitel 3.5.9.1 beschrieben, wurde die Erythrozytenelution mit einer 1 %-igen Hühnererythrozytensuspension in 0,9 %-iger physiologischer Kochsalzlösung durchgeführt. Das SC35 WT Virus (NA_{328A}) sowie SC35F-NA_{328S} wurden dafür auf denselben HAU-Titer mittels HA Test eingestellt. Nachfolgend wurden 1:2 Verdünnungen hergestellt und im Brutschrank inkubiert. Bei 37 °C ist die NA aktiv und N-Acetyl-Neuraminidasereste werden von den Erythrozytenoberflächen abgetrennt. Dadurch wird die anfängliche Hämagglutination durch das HA aufgehoben und die Erythrozyten sedimentieren auf den Boden der Vertiefungsplatte und bilden ein sogenanntes „Knöpfchen“. In folgender Abbildung sind die Ergebnisse der Erythrozytenelution dargestellt.

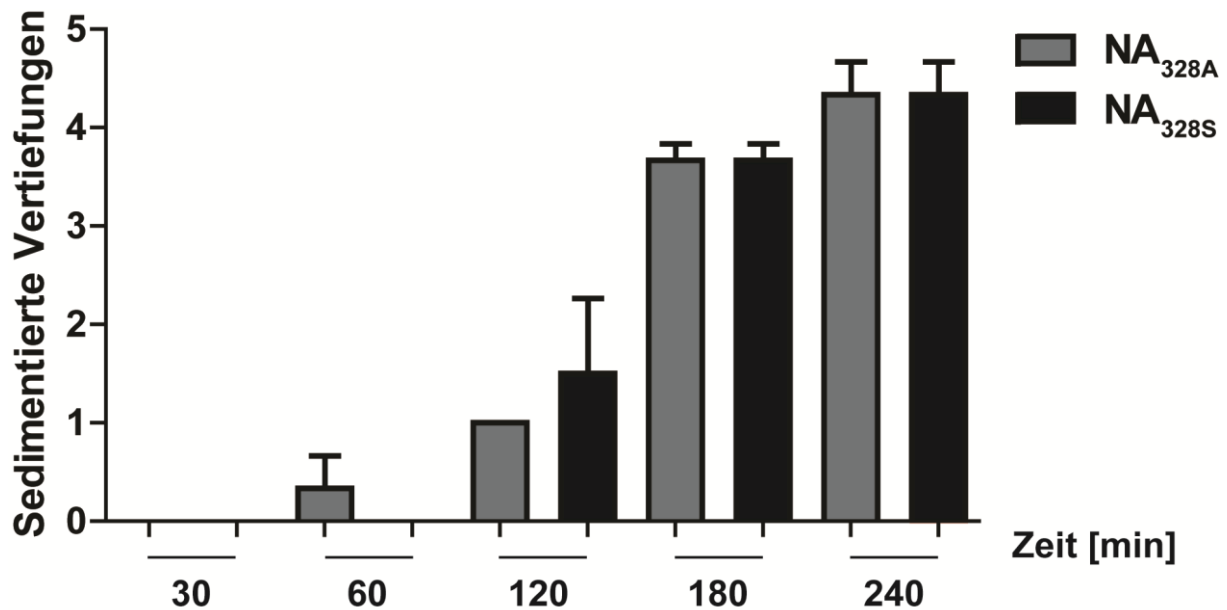


Abbildung 9: Ermittelte Neuraminidaseaktivität von NA_{328A} und NA_{328S} durch Neuraminidase Elution.

Zur Untersuchung der NA Elution wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe von SC35 Virus mit SC35-spezifischer NA (NA_{328A}, grau) oder SC35F-spezifischer NA (NA_{328S}; schwarz) in PBS generiert und mit einer 1 % Hühnererythrozytenlösung versetzt. Die dargestellten Daten stammen aus Triplikaten aus drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Relevanz der Ergebnisse wurde mithilfe des Student's *t*-Test in GraphPad ermittelt, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen NA_{328A} und NA_{328S} in Bezug auf ihre Aktivität vorlagen.

Nach Auswertung der Ergebnisse konnte in der Erythrozytenelution kein signifikanter Unterschied der Aktivitäten der SC35- und der SC35F-spezifischen NA gezeigt werden. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass der SC35F-spezifische Aminosäure Austausch an Position 328 keinen signifikanten Einfluss auf die NA Aktivität hat.

4.1.5.2. Untersuchung der Mutation NA_{328S} auf die Neuraminidaseaktivität mittels 4-MUNANA Test

Die Aktivität der IAV NA kann mithilfe von artifiziell generierten Sialinsäurekonjugaten untersucht werden. Diese Sialinsäurekonjugate dienen als Substrate, von welchen im Fall der 4-MUNANA das fluoreszierendes 4-MU abgespalten wird, das im Fluoreszenzphotometer bei $\lambda_{\text{Anregung}} = 355 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Emission}} = 460 \text{ nm}$ detektiert werden kann (202, 262). Um die NA Aktivität der SC35- und SC35F-spezifischen Viren zu bestimmen, wurden alle Viren mittel HA Test auf denselben HAU-Titer eingestellt. Anschließend wurden verschiedene Volumina (1 μl , 2,5 μl , 5 μl , 7,5 μl und 10 μl) der SC35- und SC35F-spezifischen Viren mit 4-MUNANA versetzt und inkubiert (Kapitel 3.5.9.2). Nach einer 30 minütigen Inkubationszeit wurde die Reaktion gestoppt und das fluoreszierende 4-MU detektiert. Die Ergebnisse dieser drei unabhängigen Versuche in Triplikaten sind in folgender Abbildung 10 dargestellt.

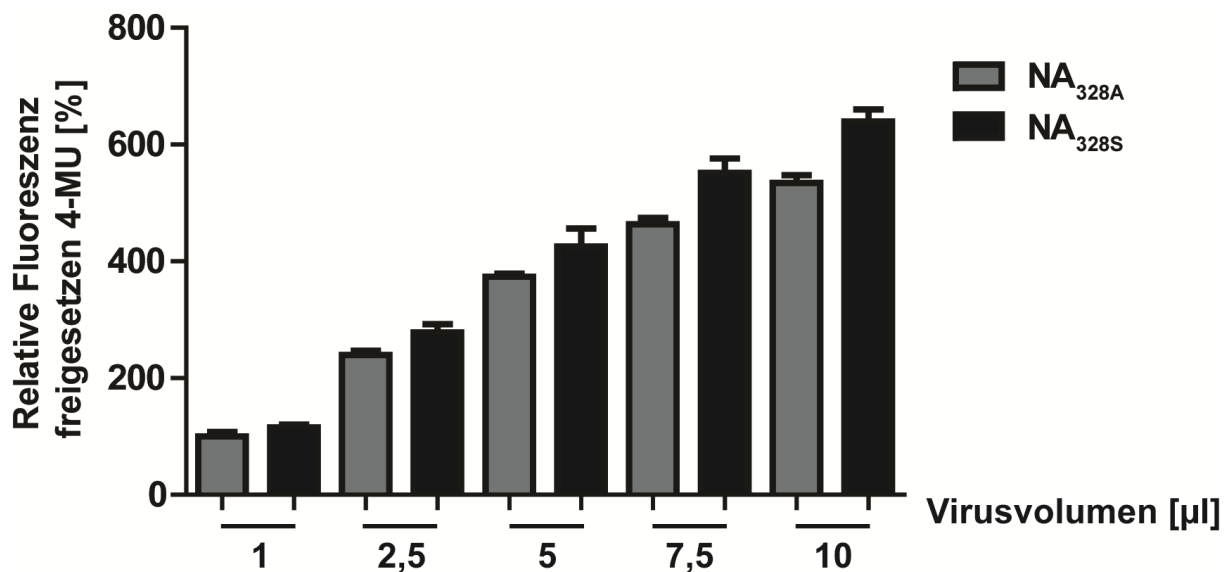


Abbildung 10: Mittels 4-MUNANA Test ermittelte Neuraminidaseaktivität SC35- und SC35F-spezifischer Viren mit NA_{328A} oder NA_{328S}.

Um vorherige Ergebnisse aus der NA Elution zu bestätigen, wurden mittels 4-MUNANA Spaltung die Aktivitäten der SC35-spezifischen NA (NA_{328A}; grau) und SC35F-spezifischen NA (NA_{328S}; schwarz) untersucht. Die Aktivität der NA kann durch die Freisetzung von 4-MU mithilfe eines Fluoreszenzphotometers gemessen werden, wobei die Ergebnisse der SC35-spezifischen NA_{328A} mit Zugabe eines 1 µl Virus auf 100 % gesetzt wurden und die restlichen Ergebnisse der verschiedenen Volumina (aufgetragen auf der x-Achse) davon prozentual dargestellt sind. Skizziert sind die Ergebnisse von Triplikaten aus drei unabhängigen Versuchen. Die statistische Relevanz der Ergebnisse wurde mithilfe des Student's *t*-Test in GraphPad ermittelt, wobei die Unterschiede zwischen NA_{328A} und NA_{328S} nicht signifikant sind.

Die Ergebnisse zeigen die NA Aktivitäten von NA_{328A} (SC35-spezifisch; grau) und NA_{328S} (SC35F-spezifisch; schwarz).

Die relative Fluoreszenz des freigesetzten 4-MU bei 1 µl SC35 Virus wurde als Referenzwert auf 100 % gesetzt.

Wie bereits durch die Erythrozytenelution gezeigt, ist auch durch diese Ergebnisse gezeigt, dass die NA Aktivität von SC35 (NA_{328A}) nicht signifikant erhöht im Vergleich zu der NA Aktivität des SC35-NA_{SC35F} (NA_{328S}) ist. Die SC35F-spezifische Mutation NA_{A328S} hat somit keinen Effekt auf die NA Aktivität.

4.1.6. Untersuchungen der Mutationen der SC35F-spezifischen Mutationen im HA

Eine der Funktionen des HA Proteins von IAV ist die Anbindung des Virions an Wirtszellrezeptoren zur Aufnahme in die Wirtszelle mittels rezeptorvermittelter Endozytose (3). Aufgrund von Mutationen im HA in der Nähe von oder in Rezeptorbindestellen kann sich

die Bindepräferenz des Virus für die zellulären, verknüpften Sialinsäuren ändern (28, 39, 103). Üblicherweise präferieren aviäre IAV die Anbindung an α 2,3-verknüpfte Sialinsäuren, wohingegen humane IAV primär an α 2,6-verknüpfte Sialinsäuren binden (265, 266). Wie bereits in Kapitel 1.1.12 beschrieben, können aviäre IAV während der Adaptation an den Säuger adaptive Mutationen erwerben. Die Ergebnisse der *in silico* und *in vitro* Charakterisierung der SC35F-spezifischen Mutationen im HA sind nachfolgend dargestellt.

4.1.6.1. *In silico* Untersuchung der SC35F-spezifischen Mutation im HA auf Strukturebene des Proteins

Um die SC35F-spezifischen Mutationen im gefalteten Protein darzustellen und auch mögliche Auswirkungen auf die Konformation der HA Rezeptorbindestellen zu überprüfen, wurde mithilfe des Programms Pymol ein H7 HA modelliert.

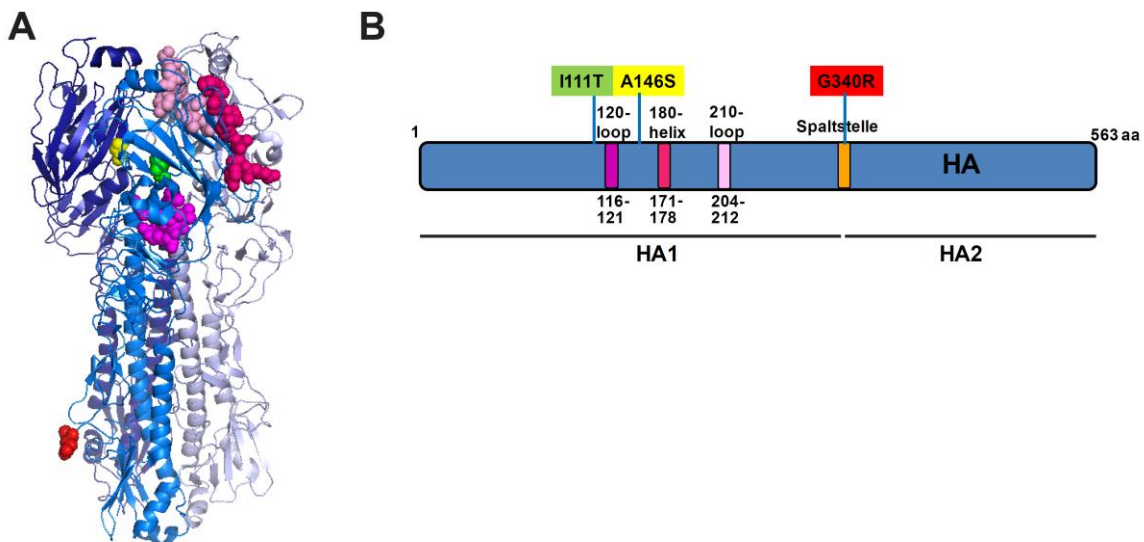


Abbildung 11: Lokalisierung der SC35F-spezifischen Mutationen in einem beispielhaften HA Proteinmodell.

Das 3D Modell zeigt HA Proteine im Tetramer, wobei jede Blauschattierung ein HA Monomer darstellt (hellblau, marine und dunkelblau) (A). Die verwendete H7 HA Grundsequenz zur Modellierung wurde von der Protein Datenbank PDB erhalten, es handelt sich hierbei um die PDB Sequenz mit der internen PDB Identifikationsnummer 4DJ6 (A/Netherlands/219/2003 (H7N7)). Leider ist die Sequenz der Spaltstelle in diesem gespeicherten Protein nicht vorhanden, die Lokalisation der HA_{G340R} Mutation ist hier daher graphisch um wenige aa nach vorne verschoben. Die Spaltstelle des Proteins ist nur im linearen Modell markiert. Ebenfalls dargestellt ist ein linearisiertes HA Protein mit der Lokalisation der SC35F-spezifischen Mutationen I111T (grün), A146S (gelb) und G340R (rot), sowie dem 120-Loop (magenta), der 180-Helix (pink) und dem 210-Loop (rosa), welche die HA Rezeptorbindestelle (RBS) bilden (B). Außerdem dargestellt ist die HA Spaltstelle (orange).

Aus der 3D-Modellierung des H7 HA Proteins wird ersichtlich, dass sich die beiden Mutationen HA_{I111T} (grün; Abbildung 11A) und HA_{A146S} (gelb; Abbildung 11A) in der globulären Kopfdomäne befinden (262). In der Kopfdomäne des HA befindet sich ebenfalls der 120-Loop (Position 123 bis 128 in magenta; Abbildung 11A), die 180-Helix (Position 178 bis 185 in pink; Abbildung 11A) und der 210-Loop (Position 211 bis 219 in rosa; Abbildung 11A) des Proteins. Die Rezeptorbindestelle aller IAV setzt sich aus diesen drei Elementen zusammen. Die Basis der Rezeptorbindetasche bilden die Aminosäurereste Y88, W143, H174 und Y186, die in IAV hochkonserviert sind (267). Aus dem 3D-Modell wird ersichtlich, dass sich die beiden Mutationen HA_{I111T} und HA_{A146S} auch in der Tertiärstruktur des Proteins in unmittelbarer Nähe der RBS befinden. Aufgrund ihrer Lokalisation können beide SC35F-spezifischen Mutationen daher Auswirkungen auf die Rezeptorbindeigenschaften haben. Die Mutation HA_{G340R} (rot; Abbildung 11A) liegt direkt in der multi-BCS des HA Proteins. Leider war es aufgrund eines unvollständigen 3D H7 Modellvirus nicht möglich, die Mutation HA_{G340R} an der exakten Stelle darzustellen. Es handelt sich bei dem verwendeten Modell um das einzig verfügbare H7 Modell. Die im Modell dargestellte Mutation befindet sich 4 aa Positionen vor der eigentlichen Position, da für die multi-BCS in diesem 3D Modellvirus keine Sequenz vorlag. Die Ergebnisse der linearen Darstellung des H7 HA Proteins verdeutlichen, dass die HA_{I111T} und HA_{A146S} Mutationen beide in der Nähe der Rezeptorbindestelle lokalisiert sind (Abbildung 11B). Im linearen HA Modell wird außerdem sichtbar, dass die HA_{G340R} Mutation mitten in der Spaltstelle (orange) lokalisiert ist.

Mithilfe der HA Modelle konnte gezeigt werden, dass die SC35F-spezifischen Mutationen HA_{I111T} und HA_{A146S} nah an der Rezeptorbindetasche gelegen sind. Zudem konnte gezeigt werden, dass die SC35F-spezifische Mutation HA_{G340R} in der multi-BCS des HA Proteins liegt.

4.1.6.2. Untersuchung der Bindesepezifität der SC35F-spezifischen Mutation im HA

Wie in Kapitel 4.1.2 gezeigt werden konnte, unterscheidet sich das HA Protein von SC35 in drei Aminosäuren im Vergleich zu SC35F. Die SC35F-spezifische HA_{I111T} Mutation befindet sich in der Nähe der HA Rezeptorbindestelle, wohingegen die Position neben der HA_{A146S} Mutation die Basis der Rezeptorbindetasche darstellt (267). Die dritte SC35F-spezifische Mutation HA_{G340R} ist direkt in der HA Spaltstelle lokalisiert (89, 251, 268). Da HA_{I111T} und HA_{A146S} einen Einfluss auf die Rezeptorbindung haben könnten, ist die Untersuchung der Bindesepezifität von SC35- sowie SC35F-spezifischen Viren von größter Bedeutung. Hierbei wird modellhaft mit Putenerythrozyten eine natürliche Rezeptorbindung, eine Rezeptorbindung an α 2,3-verknüpfte Sialinsäuren beziehungsweise eine Rezeptorbindung

Ergebnisse

an α 2,6-verknüpfte Sialinsäuren sowie eine fehlende Rezeptorbindung (als Kontrolle) simuliert. Mit den modifizierten Putenerythrozyten in Kombination mit den rekombinanten Viren konnte die Auswirkung der einzelnen und der kombinierten SC35F-spezifischen HA Mutationen auf die Bindepräferenz an Sialinsäuren untersucht werden.

In Tabelle 5 werden die Bindespezifitäten von SC35, SC35-HA_{SC35F} sowie den drei Einzelpunktmutanten mit den jeweiligen Kontrollviren H3N2 (α 2,6-Bindepräferenz) und H5N1-HA_{monobasisch} (α 2,3-Bindepräferenz) dargestellt. Alle Viren wurden ursprünglich auf 64 HAU eingestellt und mit den jeweiligen modifizierten Putenerythrozyten in einem HA Test untersucht. Die Anbindungsstärke des SC35 Virus und der SC35F-spezifischen Viren nach einer Resialylierung mit entweder α 2,3- oder α 2,6-verknüpften Sialinsäuren wurde mit der gleichen Intensität festgestellt (64 HAU) wie die Anbindung an unbehandelte Putenerythrozyten (PE).

Tabelle 5: Bindespezifität von SC35 und SC35F rekombinanten Viren an modifizierte PE.

Virus	Unbehandelte PE	VCNA behandelte PE	α 2,3 SA PE	α 2,6 SA PE
SC35	64	0	64	0
SC35-HA _{SC35F}	64	0	64	0
SC35-HA _{111T}	64	0	64	0
SC35-HA _{146S}	64	0	64	0
SC35-HA _{340R}	64	0	64	0
H3N2 (α 2,6) Kontrolle	64	0	0	64
H5N1-HA _{monobasisch} (α 2,3) Kontrolle	64	0	128	0

Die hier gezeigten Daten stellen repräsentative Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Versuchen dar. Die Daten der SC35 und SC35F rekombinanten Viren sind in Hämagglutinationseinheiten (HAU) dargestellt.

Mittels *Vibrio cholerae* Neuraminidase (VCNA) wurden sämtliche Sialinsäuren (SA) von der Oberfläche der PE eliminiert (VCNA behandelte PE).

Nachfolgend an die Behandlung mit VCNA wurden die PE entweder mit α 2,6-Sialyltransferase aus dem *Photobacterium damselae* (α 2,6 SA PE) oder α 2,3-Sialyltransferase von *Pasteurella multocida* (α 2,3 SA PE) resialyliert.

Für die Kontrolle der Desialylierung sowie der Resialylierung und der späteren Anbindung der spezifisch modifizierten PE wurden die Kontrollviren A/Netherlands/213/03 (H3N2, α 2,6-Bindepräferenz) und ein H5N1 rekombinantes Virus mit 7 Gensegmenten aus A/PR/8/34 (H1N1) und dem HA des A/Vietnam/11/94 (H5N1) (rekombinantes H5N1, α 2,3-Bindepräferenz) mit einer monobasischen Spaltstelle verwendet.

In unbehandelten PE zeigten alle Viren einen HAU-Titer von 64. Wohingegen nach der Entfernung der SA mittels VCNA keinerlei Bindung an die Viren mehr gezeigt werden konnte, die HAU Werte jedes Virus lagen, wie erwartet, bei 0. Interessanterweise banden alle H7N7 Viren mit einer gleichen Bindungsstärke von 64 HAU an die α 2,3-resialylierte PE, es konnte jedoch bei keiner der Reassortanten eine erhöhte Bindespezifität an α 2,6-resialylierte PE festgestellt werden. Das Kontrollvirus H5N1-HA_{monobasisch} zeigte nach Einstellung auf 64 HAU nur eine Bindung an α 2,3-resialylierte Putenerythrozyten mit 128 HAU. Diese reine Anbindung an α 2,3-resialylierte PE wurde erwartet, da dieses aviäre Virus bekanntermaßen nur an α 2,3-verknüpfte Sialinsäuren bindet.

Das H3N2 Kontrollvirus zeigte nach Einstellung auf 64 HAU nur eine Bindung an α 2,6-resialylierte Putenerythrozyten mit 64 HAU. Auch hier wurde diese spezifische Anbindung an α 2,6-resialylierte PE erwartet, da dieses humane Virus bekanntermaßen an α 2,6-verknüpfte Sialinsäuren bindet.

Diese Untersuchungen zur Anbindung an Sialinsäuren lassen daraus schließen, dass keine der SC35F-spezifischen Mutationen einzeln oder in Kombination mit den anderen Mutationen in einem SC35 Hintergrund in der Lage ist, die Bindespezifität des Virus zu ändern.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse aus Kapitel 4.1.6, dass die SC35F-spezifischen Mutationen im linearisierten HA und in der Tertiärstruktur des HA Proteins in der Nähe der Rezeptorbindestelle und in der multi-BCS lokalisiert sind. Allerdings lösen die SC35F-spezifischen Mutationen keine Änderung in der Bindepräferenz aus. Mithilfe der resialylierten PE konnte gezeigt werden, dass die SC35- sowie die SC35F-spezifischen Viren stets die Anbindung an α 2,3-resialylierte PE präferieren.

4.2. Einfluß der SC35F-spezifischen Mutationen auf die Pathogenität und den Organtropismus im Mausmodell

Das Mausmodell eignet sich sehr gut zur Bestimmung der Virulenz und Pathogenität eines Virus (104). Die folgenden Ergebnisse resultieren aus *in vivo* Versuchen durchgeführt in weiblichen BALB/c Mäusen, die mit SC35 und SC35F rekombinanten Viren infiziert wurden.

4.1.7. Untersuchung von Gewichtsverlust und Überleben nach Infektion mit SC35 und SC35F rekombinanten Viren

Um die rekombinanten Viren auf Pathogenität und Virulenz hin zu untersuchen, wurden BALB/c Mäuse mit verschiedenen Dosen der rekombinanten Viren infiziert. Aus diesen Versuchen resultierten Abbildungen von Gewichtsverläufen und Überlebensraten infizierter Mäuse (Abbildung 12-Abbildung 14). Abbildung 12 skizziert hierbei die Ergebnisse aus Infektionen von Mäusen mit SC35, SC35-PB1_{SC35F}, SC35-PB2_{SC35F}, SC35-NA_{SC35F} und SC35-HA_{monobasisch}. Diese Graphen zeigen die Viren mit niedriger Virulenz in Bezug auf ihre Virulenz in Bezug auf den Gewichtsverlust (Abbildung 12A) und die Pathogenität mittels der Überlebensraten der Mäuse (Abbildung 12B), wobei die dargestellte verwendete Dosis der MLD₅₀ des jeweiligen Virus entspricht. Ersichtlich ist, dass Mäuse, die mit 10⁶ p.f.u. von SC35-PB1_{SC35F} infiziert wurden, die größten Gewichtsverluste aufwiesen (hellblaues Dreieck; Abbildung 12A). Mäuse, die mit diesem Virus infiziert wurden, wiesen eine Letalitätsrate von

40 % auf. Erstaunlicherweise zeigten die Mäuse infiziert mit dem SC35-PB2_{SC35F} Virus die geringsten Gewichtsverluste. Das SC35-PB2_{SC35F} Virus (>10⁶ p.f.u.) (rotes Quadrat; Abbildung 12A) zeigte trotzdem dieselbe Virulenz auf, als das parentale SC35 Virus (schwarzer Kreis; Abbildung 12A).

Interessanterweise konnte eine ähnliche Pathogenität des SC35 Virus und des SC35-NA_{SC35F} Virus (beide >10⁶ p.f.u.) (blaue Raute; Abbildung 12A) detektiert werden. Das SC35F-HA_{monobasisch} Virus verursachte schon nach einer Infektion mit 10⁵ p.f.u. (violette Sechseck; Abbildung 12A) einen stärkeren Gewichtsverlust im Vergleich zu einer Infektion mit 10⁶ p.f.u. des WT Virus SC35, was darauf hindeutet, dass das SC35F-HA_{monobasisch} Virus eine erhöhte Pathogenität gegenüber dem WT aufwies. Alle rekombinanten Viren mit den angegebenen Virusdosen, außer SC35-PB1_{SC35F}, resultierten in einer 100 %-igen Überlebensrate infizierter BALB/c Mäuse (Abbildung 12B).

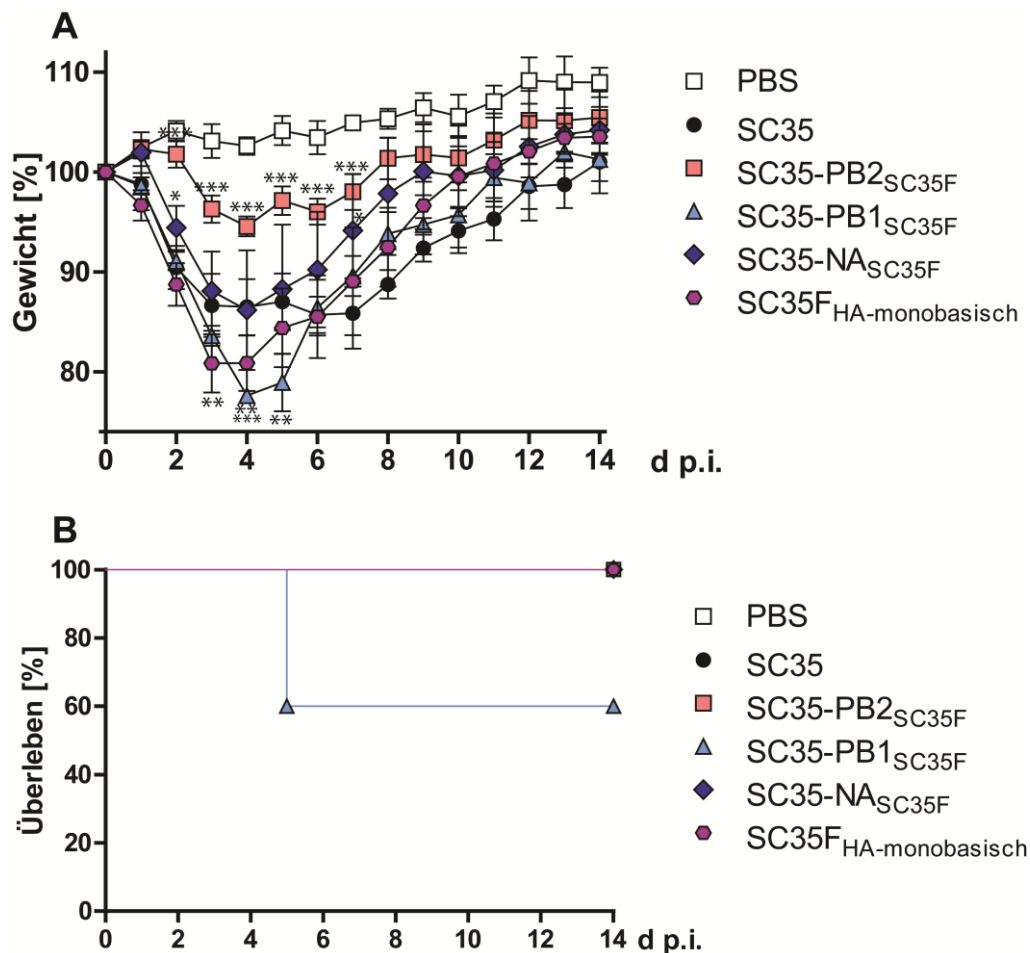


Abbildung 12: Gewichtsverläufe und Überlebensraten infiziert mit rekombinanter SC35 und SC35F Viren (niedrige Virulenz) in BALB/c Mäusen.

Die Gewichtsverläufe (A) und Überlebensraten der Mäuse (B) wurden im Zuge der Bestimmung der MLD₅₀ durchgeführt. Hier dargestellt sind Infektionen von weiblichen BALB/c Mäusen, die mit SC35 (10⁶ p.f.u., schwarzer Kreis), SC35-PB2_{SC35F} (10⁶ p.f.u., rotes Quadrat), SC35-PB1_{SC35F} (10⁶ p.f.u.,

Ergebnisse

hellblaues Dreieck), SC35-NA_{SC35F} (10^6 p.f.u., dunkelblaue Raute) sowie die höchst mögliche Dosis von SC35F-HA_{monobasisch} (10^5 p.f.u., violettes Sechseck) infiziert wurden. Als Negativkontrolle wurden Mäusen eingesetzt, welchen intranasal PBS verabreicht wurde (weißes Quadrat). Die höchstmögliche Dosis für das SC35F-HA_{monobasisch} Virus betrug 10^5 p.f.u., da aufgrund schlechter Virusreplikation kein Virusstock generiert werden konnte, mit dem eine höhere Infektionsdosis möglich gewesen wäre. Das Gewicht jeden Tages bezieht sich auf das Ausgangsgewicht jeder Maus am Tag der Infektion und ist dargestellt als Mittelwert \pm SD. Die Gruppengröße der infizierten Tiere betrug jeweils mindestens 5 Tiere pro Virusdosis ($n \geq 5$). Die statistische Relevanz der Ergebnisse wurde mithilfe des Student's *t*-Test in dem Programm GraphPad ermittelt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Die Signifikanzberechnung bezieht sich auf die Gewichte der Mäuse, die mit dem parentalen SC35 Virus infiziert wurden. In A dargestellt sind nur die Signifikanzen der Tage 2 – 7 p.i., da in diesem Zeitraum die Gewichtsverluste der Tiere am größten waren.

Nach Infektion mit den Einzelgenreassortanten konnte gezeigt werden, dass die größte Pathogenität und die höchste Virulenz in BALB/c Mäusen nach Infektion mit SC35-HA_{SC35F} erreicht wurde (Abbildung 13).

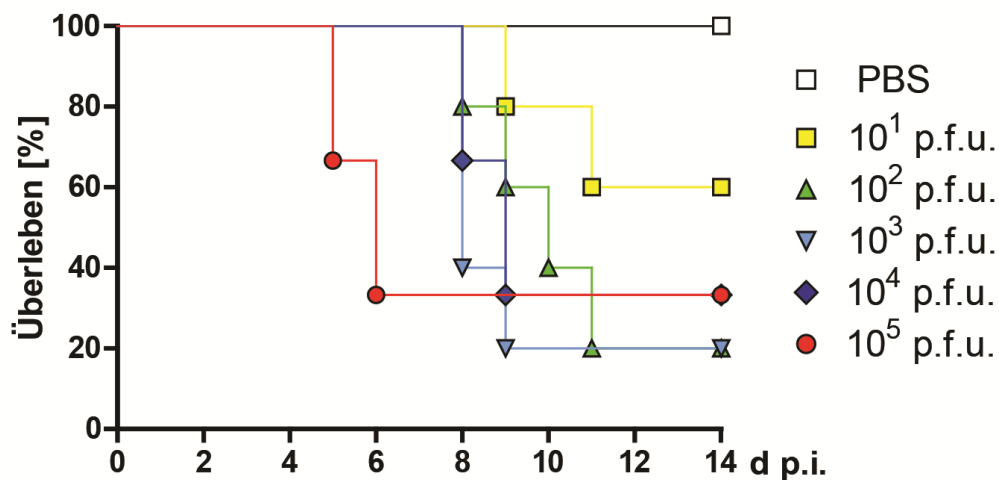


Abbildung 13: Überlebensraten von BALB/c Mäusen nach Infektion mit verschiedenen Dosen von SC35-HA_{SC35F}.

Die Überlebensraten der Mäuse wurden im Zuge der MLD₅₀ Bestimmung durchgeführt. Hier dargestellt sind Infektionen von weiblichen BALB/c Mäusen, die mit SC35-HA_{SC35F} (10^1 p.f.u., gelbes Quadrat; 10^2 p.f.u., grünes Dreieck; 10^3 p.f.u., hellblaues Dreieck, gespiegelt; 10^4 p.f.u., dunkelblaue Raute; 10^5 p.f.u., roter Kreis) infiziert wurden. Als Negativkontrolle wurden Mäusen eingesetzt, welchen intranasal PBS verabreicht wurde (weißes Quadrat). Die Gruppengröße der infizierten Tiere betrug jeweils mindestens 5 Tiere pro Virusdosis ($n \geq 5$).

In Abbildung 13 ist das Überleben der Mäuse, die mit SC35-HA_{SC35F} Virus infiziert wurden, dargestellt. Die mit 10^1 p.f.u. infizierten Mäuse verloren am wenigsten, die mit 10^5 p.f.u. SC35-HA_{SC35F} infizierten Tiere verloren hingegen am meisten Gewicht (Daten nicht gezeigt). Die Überlebensraten der SC35-HA_{SC35F} infizierten Mäuse hingegen waren nicht direkt von der Virusdosis abhängig (Abbildung 13). Besonders nach Applikation mit niedrigen Dosen dieses Virus wurden sehr starke neurologische Symptome mit letalen Folgen beobachtet. Interessanterweise betrug die Überlebensrate in Mäusen, die mit 10^2 oder 10^3 p.f.u. infiziert

wurden nur 20 %, wohingegen BALB/c Mäuse, die mit 10^5 p.f.u. infiziert wurden eine Überlebensrate von 33 % nach einer Infektion mit SC35-HA_{SC35F} aufwiesen (Abbildung 13).

Um zu untersuchen, welche der Mutationen im HA des SC35-HA_{SC35F} Virus die Pathogenität sowie die Virulenz erhöhen kann, wurden die Einzelpunktmutanten SC35-HA_{111T}, SC35-HA_{146S} und SC35-HA_{340R} in BALB/c Mäusen untersucht (Abbildung 14). Die Ergebnisse dieser Versuche sind anhand der Gewichtsverläufe (Abbildung 14A) und der Überlebensraten infizierter Mäuse (Abbildung 14B) dargestellt. Die Mäuse, die mit 10^5 p.f.u. der SC35-HA_{111T} und SC35-HA_{146S} Viren infiziert wurden, überlebten zu 100 % die Infektion. Die Tiere die mit SC35-HA_{340R} infiziert wurden (pinke Raute, Abbildung 14A) wiesen die höchsten Gewichtsverluste auf. Nach Infektion mit 10^5 p.f.u. des SC35-HA_{340R} Virus überlebten 78 % der Mäuse. (Abbildung 14B).

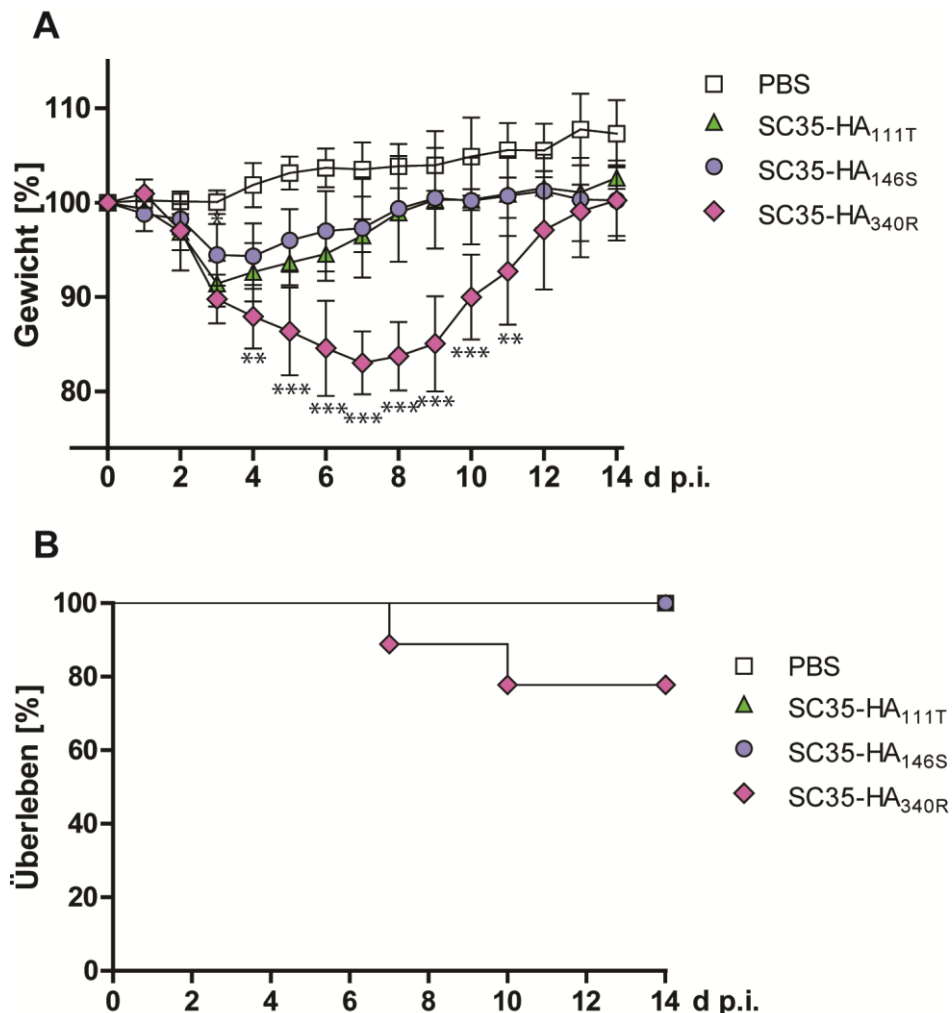


Abbildung 14: Gewichtsverläufe und Überlebensraten von BALB/c Mäusen infiziert mit SC35F Einzelpunktmutanten.

Die Gewichtsverläufe (A) und Überlebensraten der Mäuse (B) wurden im Zuge der MLD₅₀ Bestimmung durchgeführt. Hier dargestellt sind Infektionen von weiblichen BALB/c Mäusen, die mit 10^5 p.f.u. des

Ergebnisse

SC35-HA_{111T} Virus (hellgrünes Dreieck), 10^5 p.f.u. des SC35-HA_{146S} Virus (hellblauer Kreis) und 10^5 p.f.u. des SC35-HA_{340R} Virus (pinke Raute) infiziert wurden. Als Negativkontrolle wurden Mäusen eingesetzt, welchen intranasal PBS verabreicht wurde (weißes Quadrat). Das Gewicht jeden Tages bezieht sich auf das Ausgangsgewicht jeder Maus am Tag der Infektion und ist dargestellt in Prozent als Mittelwert \pm SD. Die Gruppengröße der infizierten Tiere betrug jeweils mindestens 5 Tiere pro Virus ($n \geq 5$). Die statistische Relevanz der Ergebnisse wurde mithilfe des Student's *t*-Test in dem Programm GraphPad ermittelt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Die Signifikanzberechnung bezieht sich auf die Gewichte der Mäuse, die mit SC35-HA_{111T} Virus infiziert wurden. In dieser Abbildung dargestellt sind die Signifikanzen von 4 – 11 d p.i..

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die drei Mutationen in SC35F-HA (SC35-HA_{111T}, SC35-HA_{A146S} und SC35-HA_{G340R}) vor allem in Kombination zur erhöhten Virulenz in der Maus beitragen.

4.1.8. MLD₅₀ von SC35 und SC35F rekombinanten Viren

Um MLD₅₀ der rekombinanten SC35 und SC35F Viren im Mausmodell zu bestimmen, wurden BALB/c Mäuse mit verschiedenen Dosen dieser Viren i.n. infiziert. Die niedrigste Virusdosis betrug 10^2 p.f.u., wobei die höchste verwendete Dosis der meisten Viren 10^6 p.f.u. betrug. Im Falle eines Gewichtsverlusts der Mäuse von mehr als 25 % ihres ursprünglichen Gewichts am Tag der Infektion oder falls vorher definierte Abbruchkriterien (Reduktion des Körpergewichts oder Verschlechterung des Allgemeinzustands in Kombination mit einer Verschlechterung des Spontanverhaltens der Mäuse) erreicht waren, wurden die Tiere euthanasiert. Eine Auswertung der MLD₅₀ Werte der einzelnen Viren sind in folgender Abbildung 15 dargestellt. Genaue Beschreibungen zur *in vivo* Versuchsdurchführung in Mäusen sind in Kapitel 3.6.1 aufgeführt.

Virus	Genotyp								MLD ₅₀ [p.f.u.]
	PB2	PB1	PA	NP	HA	NA	M	NS	
SC35	■	■	■	■	■	■	■	■	>10 ⁶
SC35-PB2 _{SC35F}	■	■	■	■	■	■	■	■	>10 ⁶
SC35-PB1 _{SC35F}	■	■	■	■	■	■	■	■	>10 ⁶
SC35-NA _{SC35F}	■	■	■	■	■	■	■	■	>10 ⁶
SC35-HA _{SC35F}	■	■	■	■	■	■	■	■	10 ^{1,74*}
SC35-HA _{111T}	■	■	■	■	111T	■	■	■	10 ^{5,5}
SC35-HA _{146S}	■	■	■	■	146S	■	■	■	10 ^{5,5}
SC35-HA _{340R}	■	■	■	■	340R	■	■	■	10 ⁵
SC35F-HA _{monobasisch}	■	■	■	■	mono	■	■	■	>10 ^{5**}

Abbildung 15: MLD₅₀ von SC35 und SC35F rekombinanten Viren in BALB/c Mäusen.

Zu Bestimmung der MLD₅₀ wurden weibliche BALB/c Mäuse i.n. mit verschiedenen Virusdosen infiziert. Die Berechnung wurde nach der Reed-Muench Methode durchgeführt (275). Die Ergebnisse sind in p.f.u. dargestellt. Die Gruppengröße der infizierten Tiere betrug jeweils mindestens 5 Tiere pro Virusdosis (n≥5).

* die höchstmögliche, zu untersuchende Virusdosis betrug 10⁵ p.f.u.

** höchstmögliche, zu untersuchende Virusdosis, da aufgrund schlechter Virusreplikation kein Virusstock generiert werden konnte, mit dem eine höhere Infektionsdosis möglich gewesen wäre
mono = mono-BCS

Die MLD₅₀ des parentalen SC35 Virus beträgt >10⁶ p.f.u.. Das bedeutet, dass die Infektion mit einer Virusdosis von 10⁶ p.f.u. dieses Virus eine Überlebensrate von 100 % der Mäuse zur Folge hatte. Interessanterweise sind nur rekombinante Viren, die SC35F-spezifische Mutationen im HA Protein aufweisen, in der Lage, eine Reduktion der MLD₅₀ auszulösen. Die größte Virulenz und Pathogenität in BALB/c Mäusen wurde nach Infektion mit dem SC35-HA_{SC35F} Virus erreicht, das alle drei SC35F-spezifischen Mutationen des HA Proteins trägt. Das SC35-HA_{SC35F} Virus war ~18.000-fach virulenter als das WT Virus SC35. Die einzelnen SC35F Mutationen (HA_{111T}, HA_{A146S}, HA_{G340R}) im SC35 Hintergrund hingegen, beeinflussten die MLD₅₀ nur geringfügig (HA_{111T} und HA_{A146S} MLD₅₀ von 10^{5,5} p.f.u.). Eine Infektion mit dem SC35-HA_{340R} Virus (MLD₅₀ von 10⁵ p.f.u.) resultierte in einer log-Stufe Unterschied in der MLD₅₀ im Vergleich zum parentalen Virus SC35. Die rekombinanten Viren mit den SC35F-spezifischen Mutationen PB2_{H357N}, PB1_{L13P} und NA_{A328S} zeigten die gleiche MLD₅₀ wie das parentale Virus SC35 (MLD₅₀ >10⁶ p.f.u.). Die Mutationen PB2_{H357N}, PB1_{L13P} und NA_{A328S} waren somit nicht in der Lage die Virulenz und Pathogenität von SC35 in der Maus zu erhöhen. Das Virus SC35F-HA_{monobasisch} hatte eine MLD₅₀ von >10⁵ p.f.u.. Eine höhere Virusdosis konnte nicht getestet werden, da das Virus trotz diverser Anzuchtversuche in MDCK Zellen nur zu Titern wuchs, die eine Infektion mit 10⁵ p.f.u./50 µl ermöglichten.

Ergebnisse

Die Ergebnisse zeigen, dass nur Viren mit den SC35F-spezifischen Mutationen im HA Protein (SC35-HA_{I111T}, SC35-HA_{A146S} und SC35-HA_{G340R}) die MLD₅₀ reduzierten. Dies bedeutet, dass diese drei SC35F-spezifischen Mutationen in Kombination, die im SC35-HA_{SC35F} Virus vorhanden sind, die Virulenz im Mausmodell im Vergleich zum parentalen SC35 Virus ~18.000-fach erhöhen können.

4.2.2. Organtropismus der SC35 und SC35F rekombinanten Viren

Während der Adaptation von IAV an einen neuen Wirt, wie beispielsweise den Säuger, kann sich der Organtropismus des Virus verändern (269). Um den Organtropismus der SC35 und SC35F rekombinanten Viren im Mausmodell zu bestimmen, wurden BALB/c Mäuse zuerst mit einer Virusdosis ähnlich der jeweiligen MLD₅₀ infiziert. Drei und sechs Tage p.i. wurden die infizierten Mäuse geblutet, euthanasiert und Organe für weitere Versuche entnommen. Bei den entnommenen Organen handelte es sich um die Lungen und das Gehirn. Die Lungentiter zeigen die Infektion der Lunge einer Maus, wobei die Untersuchung der Gehirntiter verdeutlicht, ob ein Virus in der Lage ist, eine Maus systemisch zu infizieren. In Abbildung 16A+B sind die viralen Titer von Lungenhomogenisaten sowie Gehirnhomogenisaten nach Infektion der Mäuse mit den Einzelgenreassortanten sowie des parentalen SC35 Virus dargestellt.

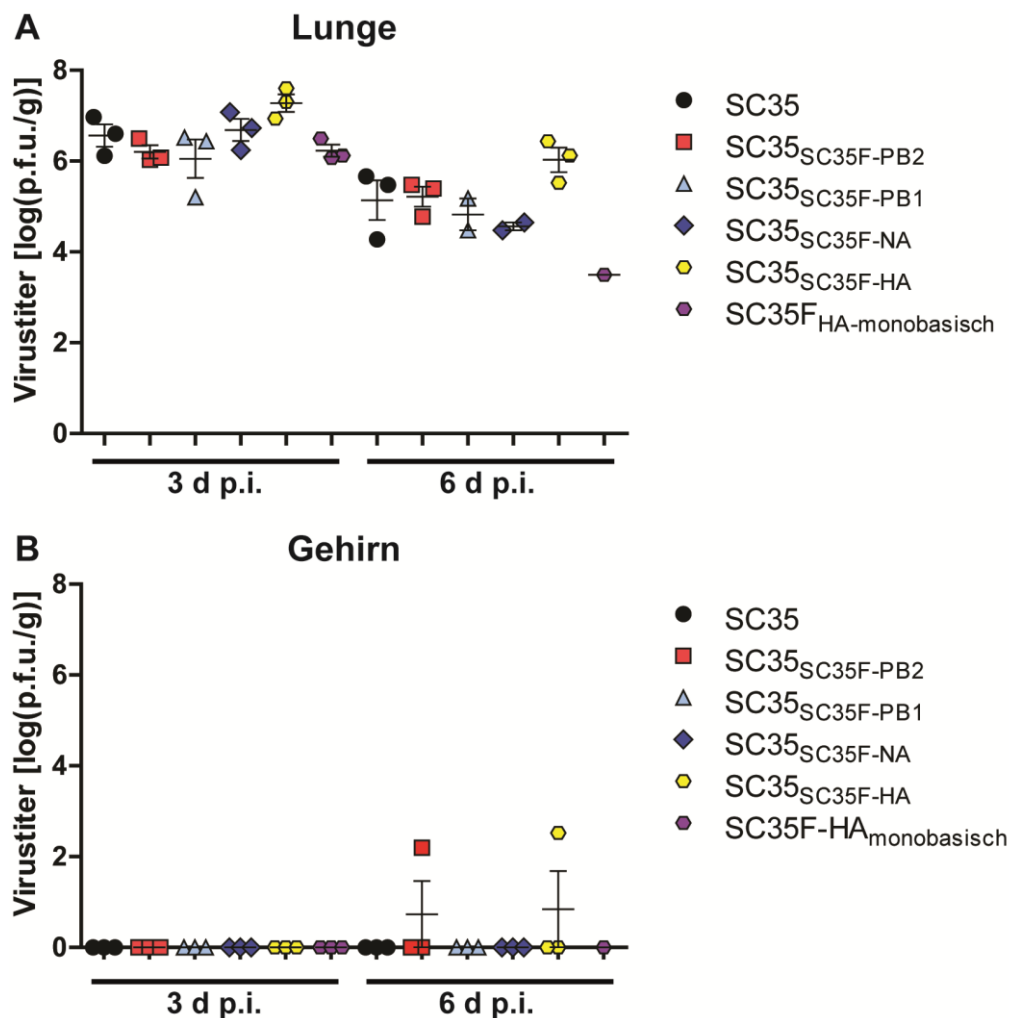


Abbildung 16: Lungentiter und Gehirntiter von BALB/c Mäusen nach Infektion mit SC35F Einzelgenreassortanten.

Dargestellt sind die Lungentiter (A) an Tag 3 und 6 p.i. und Gehirntiter (B) an Tag 3 und 6 p.i. von weiblichen BALB/c Mäusen, die mit den SC35F Einzelgenreassortanten SC35 (10^6 p.f.u.; schwarzer Kreis), SC35-PB2_{SC35F} (10^6 p.f.u., rotes Quadrat), SC35-PB1_{SC35F} (10^6 p.f.u., hellblaues Dreieck), SC35-NA_{SC35F} (10^6 p.f.u., dunkelblaue Raute), SC35-HA_{SC35F} (10^5 p.f.u., gelber Kreis) sowie SC35F-HA_{monobasisch} (10^5 p.f.u., violette Sechseck) infiziert wurden. Die Titer sind in log (p.f.u./g) nach Normalisierung des Virustiters mit dem Gewicht des eingewogenen Organstückes angegeben. Die Gruppengröße der infizierten Tiere betrug jeweils 3 Tiere pro Virusdosis, wobei in der SC35F-HA_{monobasisch} Gruppe zwei der infizierten Mäuse aufgrund des rapiden Gewichtsverlusts vor Versuchsende human euthanasiert werden mussten. Die statistische Relevanz der Ergebnisse wurde mithilfe des Student's *t*-Test in dem Programm GraphPad ermittelt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$), wobei gezeigt werden konnte, dass die Virustiter in Bezug auf SC35 nicht signifikant sind.

Die Lungen infizierter Mäuse (SC35, SC35-PB2_{SC35F}, SC35-PB1_{SC35F}, SC35-NA_{SC35F}, SC35-HA_{SC35F} und SC35F-HA_{monobasisch}) hatten an Tag 3 p.i. einen höheren Virustiter als die Lungen der Mäuse an Tag 6 p.i.. (Abbildung 16A). In allen infizierten Mäusen konnten an Tag 3 p.i. die höheren Lungentiter im Vergleich zu Tag 6 p.i. detektiert werden. In den Lungen der Mäuse, die mit SC35-HA_{SC35F} infiziert worden waren, war die geringste Reduktion der Virusmengen zu beobachten. Aufgrund der Tatsache, dass zwei der drei mit SC35F-

Ergebnisse

HA_{monobasisch} infizierten Mäuse aufgrund von massivem Gewichtsverlust vor dem Versuchsende und damit vor der Organentnahme euthanasiert werden mussten, ist eine endgültige Aussage über die Signifikanz dieses Befundes nicht möglich.

Des Weiteren wurden die Titer aus Gehirnhomogenisaten der infizierten Mäuse bestimmt. Interessanterweise konnten nur an Tag 6 p.i. virale Titer im Gehirn infizierter Mäuse festgestellt werden. In jeweils einer von drei Mäusen, die mit SC35-PB2_{SC35F} und SC35-HA_{SC35F} infiziert wurden, konnte an Tag 6 p.i. eine systemische Infektion detektiert werden.

Zur Untersuchung des Organotropismus der Einzelpunktmutanten wurden die viralen Titer in den Lungen (Abbildung 17A) und im Gehirn (Abbildung 17B) von Mäusen, die SC35-HA_{111T}, SC35-HA_{146S} oder SC35-HA_{340R} infiziert wurden, detektiert.

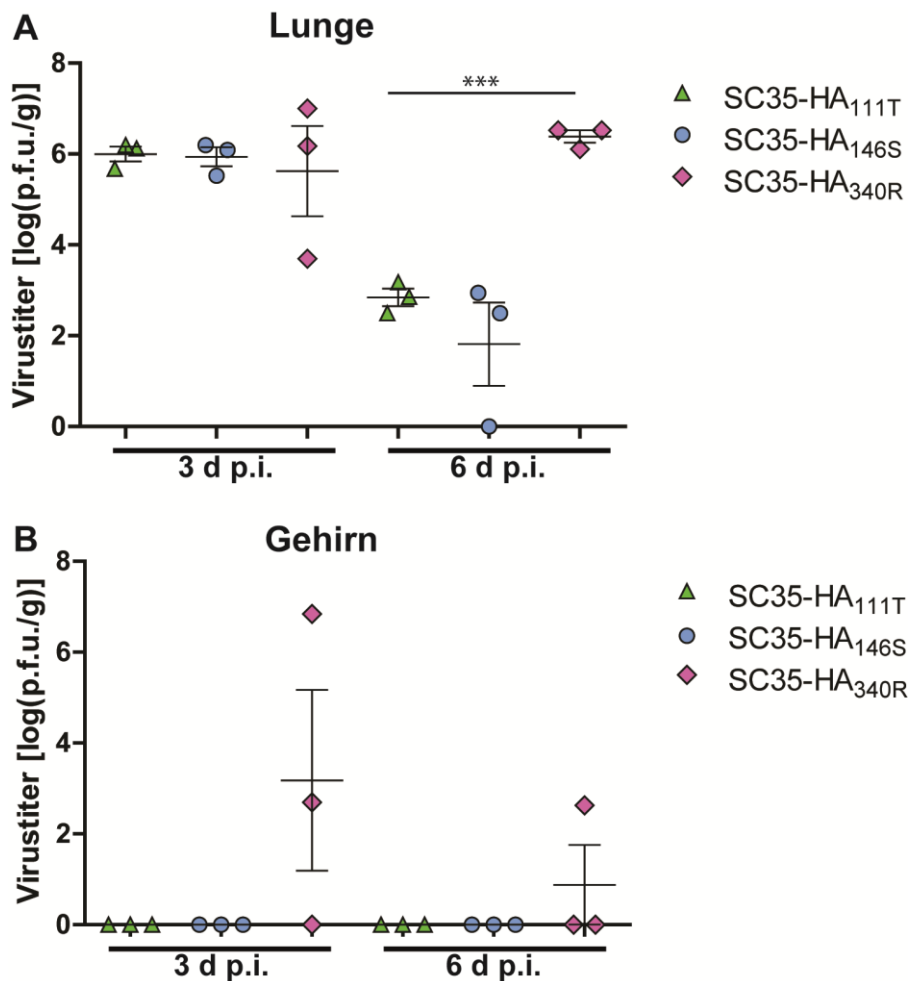


Abbildung 17: Lungentiter und Gehirntiter von BALB/c Mäusen nach Infektion mit den SC35-SC35F Einzelpunktmutanten.

Dargestellt sind die Lungentiter (A) an Tag 3 und 6 p.i. und Gehirntiter (B) an Tag 3 und 6 p.i. von weiblichen BALB/c Mäusen, die mit je 10^5 p.f.u. des SC35-HA_{111T} (hellgrünes Dreieck), SC35-HA_{146S} (hellblauer Kreis) oder SC35-HA_{340R} (pinke Raute) Virus infiziert wurden. Die Titer sind in log (p.f.u./g) nach Normalisierung des Virustiters mit dem Gewicht des eingewogenen Organstückes angegeben. Die Gruppengröße der infizierten Tiere betrug jeweils 3 Tiere pro Virusdosis. Die statistische Relevanz der Ergebnisse wurde mithilfe des Student's *t*-Test in dem Programm GraphPad ermittelt (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$).

Die Lungentiter von Mäusen, die mit SC35-HA_{111T} und SC35-HA_{146S} infiziert wurden, waren an Tag 3 p.i. deutlich höher als an Tag 6 p.i. Interessanterweise waren die Lungentiter von Mäusen, die mit SC35-HA_{340R} infiziert wurden, an Tag 6 p.i. im Gegensatz zu Tag 3 p.i. leicht erhöht. Im Gegensatz zu SC35-HA_{111T} ist an Tag 6 p.i. ein signifikanter Unterschied der Virustiter in der Lunge nach Infektion mit SC35-HA_{340R} detektierbar.

Des Weiteren wurden die Titer von Gehirnhomogenisaten von Mäusen, die mit SC35-HA_{111T}, SC35-HA_{146S} oder SC35-HA_{340R} infiziert wurden untersucht. Interessanterweise war nur das SC35-HA_{340R} Virus in der Lage an Tag 3 p.i. zwei von drei Mäusen, bzw. eine von drei

Mäusen an Tag 6 p.i. systemisch zu infizieren. In allen anderen infizierten Mäusen konnten keine Virustiter im Gehirn nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass nur die Titer in den Lungen von Mäusen, die mit SC35-HA_{340R} infiziert wurden, an Tag 6 p.i. mindestens so hoch wie an Tag 3 p.i. waren. Hier konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Lungen von Mäusen, die mit SC35-HA_{111T} und SC35-HA_{340R} infiziert waren festgestellt werden.

Diese Daten deuten darauf hin, dass die SC35F-spezifischen Mutationen in PB2 und HA den Organotropismus des SC35 Virus in der Maus verändern können. In einigen Mäusen, die mit SC35-PB2_{SC35F}, SC35-HA_{SC35F} oder SC35-HA_{340R} infiziert worden waren, konnten systemische Infektionen nachgewiesen werden.

4.2.3. Untersuchung des Zelltropismus im murinen Respirationstrakts mittels Immunohistologie

Um pathologische Veränderungen sowie den Zelltropismus im Respirationstrakt infizierter Mäuse bestimmen zu können, wurden Teile der in 3.6.2.6 zur Virustiterbestimmung entnommenen Organe zuerst mit Paraformaldehyd fixiert und danach in Paraffin eingebettet. Im Anschluß wurden Dünnschnitte zur histologischen Untersuchung angefertigt. Die durchgeführten Färbungen beinhalteten entweder eine Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE-Färbung) oder eine Immunfärbung gegen Influenza-Antigene (anti-FPV; siehe Kapitel 3.8.3). Wie zuvor beschrieben, wurden zur Generierung der Dünnschnitte Organe von infizierten Mäusen an Tag 3 und 6 p.i. entnommen. Der Fokus der Untersuchungen lag hier auf der Lunge, da in anderen Organen nur sporadisch Virus detektiert werden konnte. In nachfolgender Abbildung 18 sind Schnitte infizierter Mauslungen, gefärbt mit HE, dargestellt.

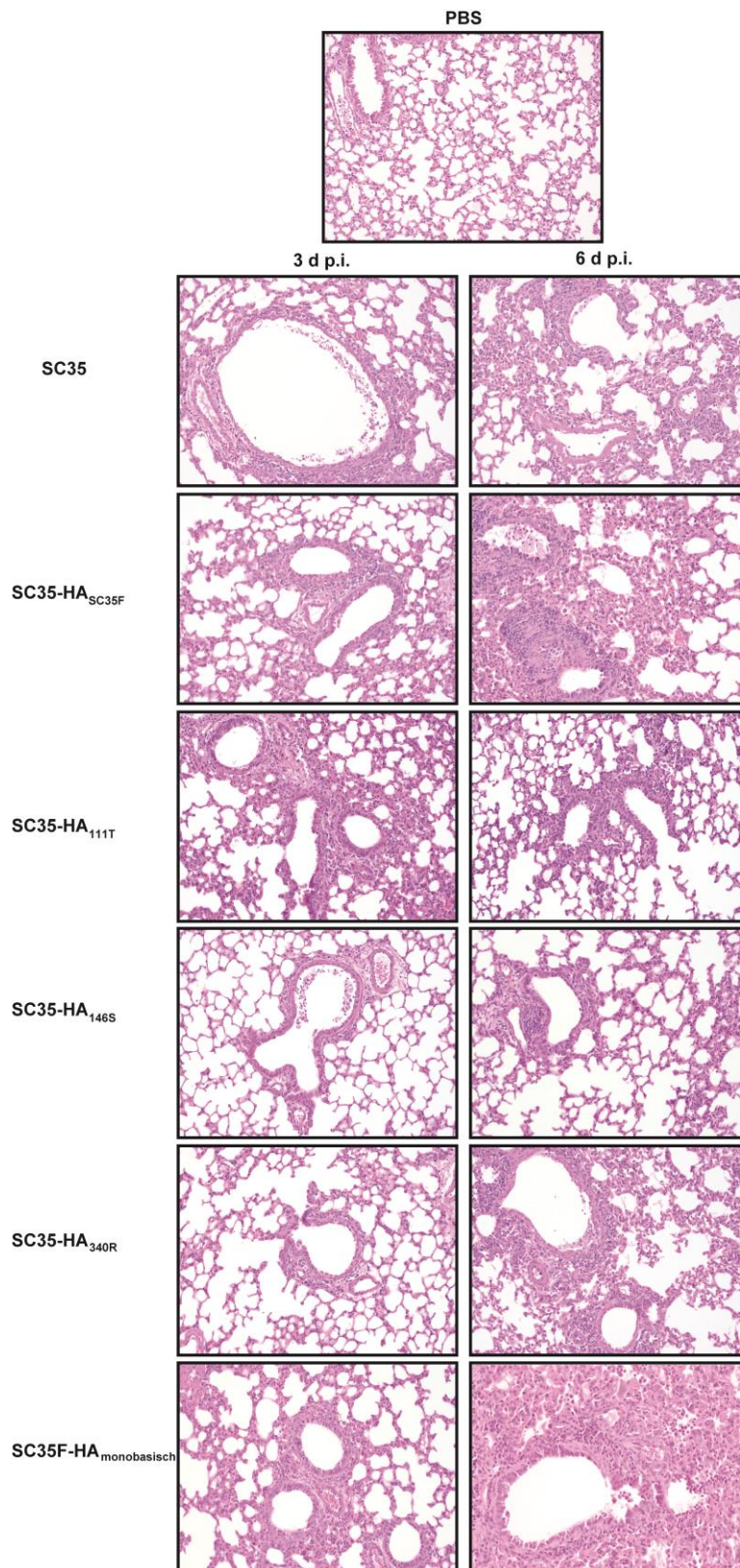


Abbildung 18: HE-Färbungen von Lungen infizierter BALB/c Mäusen nach Infektion mit SC35 und SC35F rekombinanten H7N7 Viren.

Weibliche BALB/c Mäuse wurden mit SC35 und SC35F rekombinanten Viren infiziert. Eine Gruppe der zur Kontrolle mit PBS behandelten Tiere wurde am Ende des Versuches euthanasiert. Von je drei

Ergebnisse

Tieren pro Gruppe wurden die Lungen entnommen und Dünnschnitte dieser HE-Färbungen unterzogen. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der HE-gefärbten Lungen von Kontrolltieren (oberste Reihe), sowie nach Infektion mit SC35, SC35-HA_{SC35F}, SC35-HA_{1111T}, SC35-HA_{146S}, SC35-HA_{340R} oder SC35F-HA_{monobasisch} an Tag 3 (linke Spalte) oder Tag 6 p.i. (rechte Spalte). Die lichtmikroskopischen Bilder zeigen die Gewebeschnitte in einer 400-fachen Vergrößerung.

Lungen von Mäusen, welche mit den SC35 und SC35F rekombinanten Viren infiziert wurden, zeigten eine erhöhte Infiltration. Hierbei war deutlich erkennbar, dass die Infiltration der Lungen an Tag 6 p.i. im Vergleich zu Tag 3 p.i. noch weiter erhöht war. Dies galt besonders für Lungen von Mäusen, die mit SC35-HA_{SC35F} oder SC35F-HA_{monobasisch} infiziert wurden. Interessanterweise wurde an Tag 6 p.i. in Mäusen, die mit SC35-HA_{1111T} oder SC35-HA_{146S} infiziert waren eine leichte Reduktion der Immunzellinfiltration in der Lunge beobachtet. Dieses Ergebnis passte zu der Beobachtung der nur minimalen Gewichtsreduktion in Mäusen, die mit 10^5 p.f.u. dieser rekombinanten Viren infiziert waren (Abbildung 14A) und auch zu der starken Reduktion der viralen Lungentiter an Tag 6 p.i. dieser Mäusen (Abbildung 17A). Diese Ergebnisse zeigen, dass die HPAIV H7N7 rekombinanten SC35 und SC35F Viren mit SC35F-spezifischen Mutationen im HA eine starke Immunzellinfiltration der Lungen auslösen. Des Weiteren wurde in den Dünnschnitten der fixierten und Paraffin eingebetteten Proben auch das Influenza Antigen immunohistochemisch angefärbt. Immunohistochemische Färbungen der histologischen Schnitte sind in folgender Abbildung 19 dargestellt.

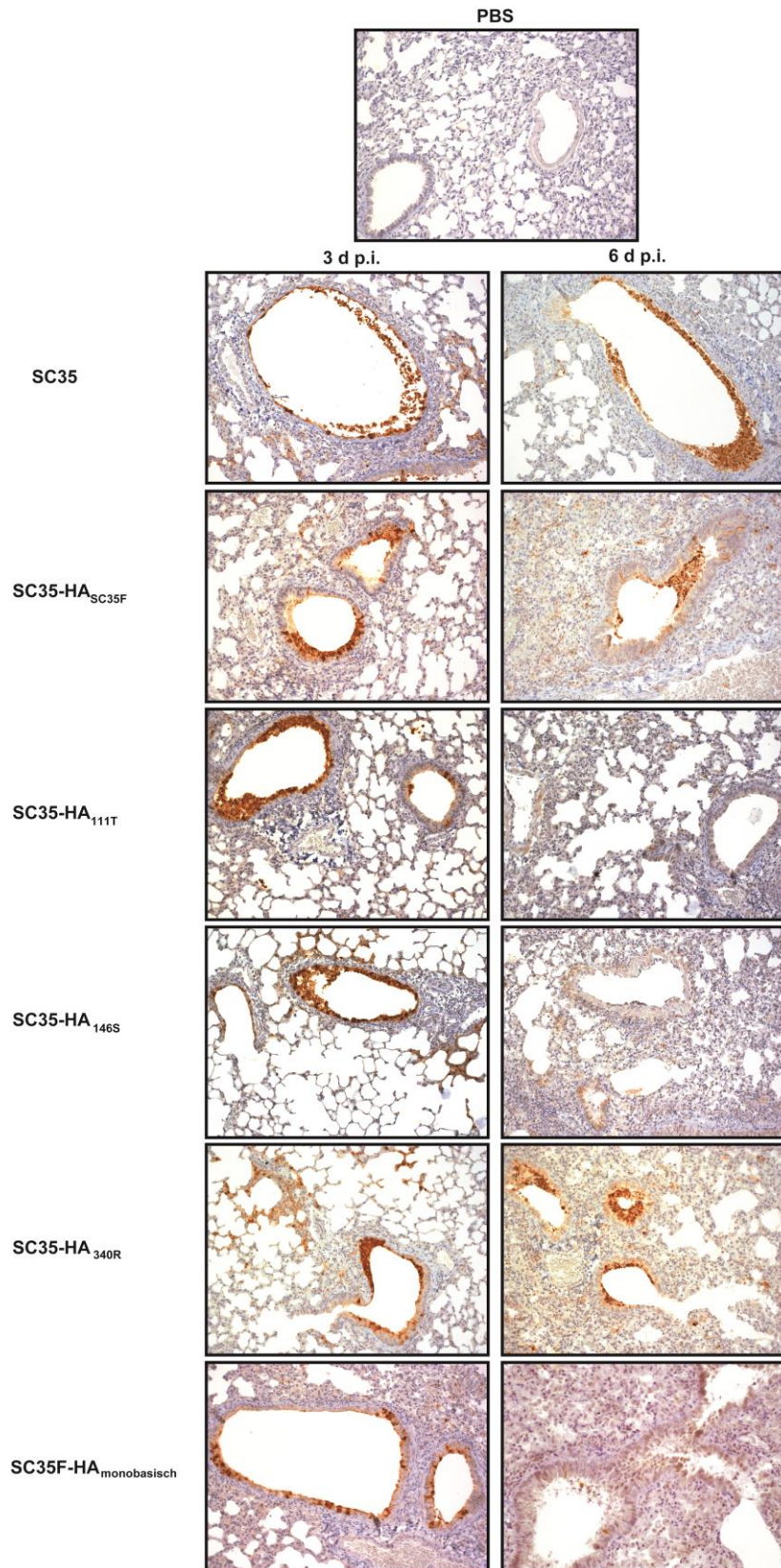


Abbildung 19: Immunohistochemisch gefärbte Lungenschnitte aus BALB/c Mäusen nach Infektion mit rekombinanten SC35 und SC35F H7N7 Viren.

Weibliche BALB/c Mäuse wurden mit SC35 und SC35F rekombinanten Viren infiziert. Eine Kontrollgruppe von Mäusen, die i.n. mit PBS behandelt wurden, wurden an Tag 14 p.i. am Ende des

Ergebnisse

Versuches euthanasiert. Von je drei Tieren pro Gruppe wurden die Lungen entnommen und Dünnschnitte dieser immunhistochemischen Färbungen unterzogen. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der immunhistochemisch gefärbten Lungen von Kontrolltieren (oberste Reihe), sowie nach Infektion mit SC35, SC35-HA_{SC35F}, SC35-HA_{111T}, SC35-HA_{146S}, SC35-HA_{340R} oder SC35F-HA_{monobasisch} an Tag 3 (linke Spalte) oder Tag 6 p.i. (rechte Spalte). Die lichtmikroskopischen Bilder zeigen die Gewebeschnitte in einer 400-fachen Vergrößerung.

Alle Viren, außer SC35-HA_{SC35F} und SC35-HA_{340R} trugen hauptsächlich zu einer Infektion der Bronchioli in der Mauslunge bei. Die IAV Infektion war durch eine gelb-braune Färbung des Antigens in den Gewebeschnitten erkennbar. Nach Infektion mit SC35-HA_{SC35F} und SC35-HA_{340R} und zeigte sich zusätzlich eine starke Infektion des alveolaren Gewebes an Tag 6 p.i., die durch die gelb-braune Färbung dargestellt ist. In allen abgebildeten Gewebeschnitten konnte eine Reduktion der Bronchiolarinfektion an Tag 6 p.i. im Vergleich zu Tag 3 p.i. beobachtet werden. Interessanterweise war in Mäusen, die mit SC35-HA_{111T}, SC35-HA_{146S} oder SC35F-HA_{monobasisch} infiziert waren an Tag 6 p.i. kaum noch infiziertes Lungengewebe detektierbar. Diese Ergebnisse stützen die Ergebnisse der Gewichtsverlustversuche hinsichtlich der geringen Gewichtsreduktion in Mäusen, die mit diesen beiden Einzelpunktmutanten infiziert wurden (Abbildung 14A), sowie der geringeren Virustiter in den Lungen dieser Mäuse an Tag 6 p.i. (Abbildung 17A) und der beobachteten Reduktion der Immunzellinfiltration in den histologischen Dünnschnitten (Abbildung 18).

Die Ergebnisse der histopathologischen Befunde der Immunzellinfiltration und der Infektion der Bronchioli und des alveolären Gewebes bestätigen damit die Resultate der Virulenz- und Pathogenitätsuntersuchungen (Abbildung 18, Abbildung 19). Mithilfe der histopathologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Lungen von Mäusen, die mit SC35-HA_{SC35F} und SC35-HA_{340R} infiziert wurden, eine hohe Immunzellinfiltration im alveolaren Gewebe aufweisen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die SC35F-spezifischen Mutationen in Kombination sowie die HA_{G340R} Mutation im SC35 Hintergrund eine Infektion der Bronchioli sowie des alveolaren Gewebes verstärken.

4.3. Einfluß der SC35F-spezifischen Mutationen auf die Transmission im Meerschweinchenmodell

Es wird angenommen, dass die Erlangung der Fähigkeit einer effizienten Mensch-zu-Mensch Transmission eine der wichtigsten Eigenschaften eines pandemischen IAV ist (27). Die effiziente Transmission wird durch Adaptationen im viralen Genom, besonders aber durch Mutationen im HA Protein hervorgerufen. Mutationen im HA Protein können eine Änderung der Bindepräferenz an α 2,6-verknüpfte Sialinsäuren auslösen (27).

Das Meerschweinchen konnte bereits zuvor erfolgreich zur Untersuchung von Kontakttransmission und Aerogentransmission eingesetzt werden (104, 231, 240). Zur Untersuchung der SC35 und SC35F rekombinanten Viren in Bezug auf deren Fähigkeit zur Transmission wurde in der vorliegenden Arbeit das Meerschweinchenmodell eingesetzt. Hierbei wurde untersucht, welche der SC35F-spezifischen Mutationen zu einer erhöhten Transmission im Meerschweinchen beitragen. Unterschieden wird dabei in den Transmissionswegen zwischen der Aerogentransmission und der Transmission durch direkten Kontakt. Die Aerogentransmission beschreibt in der vorliegenden Arbeit die Übertragung durch Aerosole ($\leq 5 \mu\text{m}$) und größere Tröpfchen (28). Für jede der nachfolgend beschriebenen Infektionen in Meerschweinchen wurden $300 \mu\text{l}$ mit $5 \cdot 10^5$ p.f.u. Virus intranasal appliziert. An Tag 1, 3, 6 und 9 p.i. wurden Nasenspülungen durchgeführt. Die Abläufe und Methoden zu *in vivo* Versuchen mit Meerschweinchen sind in Kapitel 3.6.2 detailliert beschrieben.

4.3.1. Transmission von SC35 und SC35F rekombinanten Viren im Meerschweinchen

Die nachfolgenden Ergebnisse stellen jeweils die Virustiter der Nasenspülungen aus infizierten Meerschweinchen und Sentinel-Meerschweinchen nach direktem oder Luftkontakt der Tiere dar.

4.3.1.1. Transmission der Einzelgenreassortanten und des WT SC35 Virus im Meerschweinchen

Ein Teil der zu untersuchenden Meerschweinchen wurden an Tag 0 p.i. mit $5 \cdot 10^5$ p.f.u. mit dem angegebenen Virus infiziert (Donor-Meerschweinchen), dem anderen Teil (die Sentinel-Meerschweinchen und die Raumkontrolltiere) wurde intranasal PBS appliziert. Ein Donor-Meerschweinchen bezeichnet ein infiziertes Tier, welches das Virus an nicht infizierte Artgenossen transmittieren soll. Ein Sentinel-Meerschweinchen bezeichnet ein PBS behandeltes Tier, das entweder durch direkten Kontakt oder über Aerogene dem ausgeschiedenen Virus eines Donortiers ausgesetzt ist. Mithilfe von Nasenspülungen kann man dann überprüfen, ob Virus im oberen Respirationstrakt der Sentineltiere detektierbar ist. Somit kann untersucht werden, ob die SC35 und SC35F Viren in der Lage sind über die Luft oder über direkten Kontakt transmittieren können.

An Tag 1, 3, 6 und 9 p.i. wurden Nasenspülungen bei allen Meerschweinchen durchgeführt. Die Nasenspülungen dienen zur Überprüfung einer Infektion eines Sentineltiers

Ergebnisse

beziehungsweise des Infektionsverlaufs in bereits infizierten Meerschweinchen. Der Aufbau der Transmissionsversuche im Meerschweinchen ist in Abbildung 6 detailliert dargestellt. Eine Darstellung der viralen Titer der Nasenspülungen nach Infektion erfolgt in logarithmischer Auftragung der p.f.u. pro Milliliter ($\log_{10}(\text{p.f.u./ml})$). Die Detektionsgrenze liegt bei diesem Versuch bei drei plaquebildenden Viruspartikeln pro 1000 μl . In folgender Abbildung (Abbildung 20) sind die Virustiter der Nasenspülungen von Meerschweinchen, welche mit den Einzelgenreassortanten (SC35, SC35-PB2_{SC35F}, SC35-PB1_{SC35F}, SC35-NA_{SC35F} und SC35-HA_{SC35F}) infiziert wurden, sowie die Titer der dazugehörigen Sentinel-Meerschweinchen dargestellt.

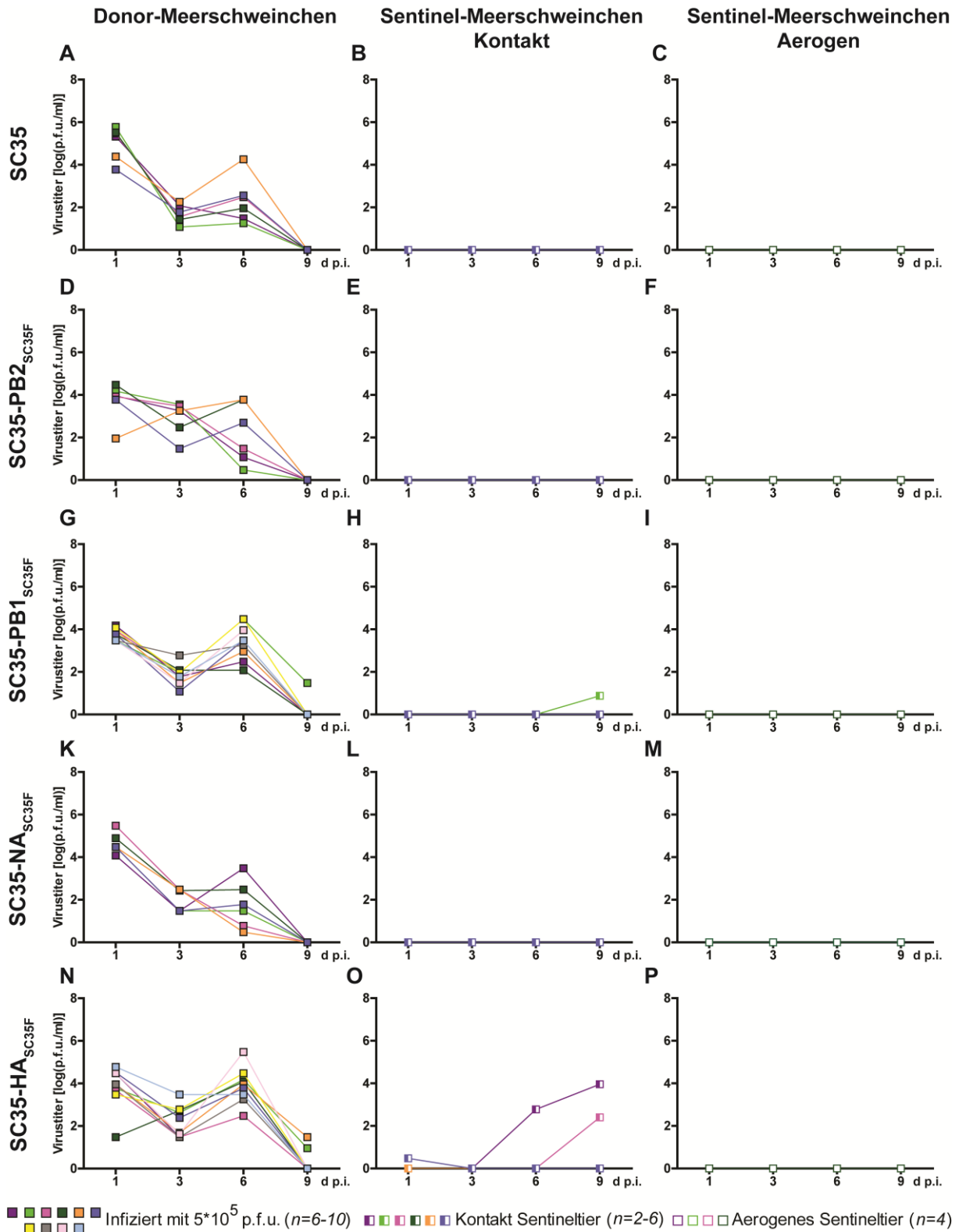


Abbildung 20: Virustiter der Nasenspülungen von Meerschweinchen, die mit den Einzelgenreassortanten SC35, SC35-PB2_{SC35F}, SC35-PB1_{SC35F}, SC35-NA_{SC35F} und SC35-HA_{SC35F} infiziert wurden.

Zur Untersuchung der Transmission wurden weibliche Hartley Meerschweinchen mit verschiedenen Einzelgenreassortanten infiziert. Die in A, D, G, K und N dargestellten Ergebnisse stellen die Titer der Nasenspülungen aus Donor-Meerschweinchen der Transmissionsversuche dar (gefüllte Quadrate in

Ergebnisse

lila, hellgrün, pink, dunkelgrün, orange, blau, gelb, grau, rosa und hellblau; $n=6-10$). Die in B, E, H, L und O dargestellten Ergebnisse zeigen die Titer der Nasenspülungen von Sentinel-Meerschweinchen aus Versuchen zur Kontakttransmission (halb gefüllte Quadrate in lila, hellgrün, pink, dunkelgrün, orange und blau; $n=2-6$). Die in C, F, I, M und P dargestellten Ergebnisse zeigen die Titer der Nasenspülungen von Sentinel-Meerschweinchen aus Versuchen zur Aerogenstransmission (leere Quadrate in lila, hellgrün, pink und dunkelgrün; $n=4$). Alle Titer sind in logarithmischer Auftragung dargestellt. Die Aerogenen Sentineltiere wurden in Transmissionskäfigen mit ca. 10 cm Abstand zu den Donor-Meerschweinchen platziert, wobei ein Luftstrom von den Donor-Meerschweinchen zu den Sentinel-Meerschweinchen gerichtet war. Die Kontakt Sentinel-Meerschweinchen wurden direkt in denselben Käfig mit einem infizierten Meerschweinchen gesetzt. Die Nasenspülungen wurden an den Tagen 1, 3, 6 und 9 p.i. durchgeführt. Die Virustiter der Nasenspülungen wurden mittels Plaque Test ermittelt.

Auffällig bei dem Verlauf der Infektion von SC35 im oberen Respirationstrakt ist, dass der höchste Virustiter an Tag 1 p.i. aufzufinden war, an Tag 3 p.i. der Virustiter wieder abfiel und an Tag 6 p.i. noch einmal anstieg (Abbildung 20). Dies weist auf eine aktive Replikation des Virus im oberen Respirationstrakt hin, zumindest in einigen der mit SC35 infizierten Donor-Meerschweinchen. An Tag 9 p.i. war das SC35 Virus nicht mehr in den Nasenspülungen der infizierten Tiere nachweisbar, was für eine erfolgte Virus *clearance* durch das Immunsystem spricht. In den Nasenspülungen der Kontakt und Aerogenen Sentinel-Meerschweinchen, die dem SC35 Virus ausgesetzt waren, wurden keine Virustiter festgestellt (Abbildung 20B, C).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das SC35 Virus nicht mittels direkten Kontakt oder über Aerogene luftgestützt im Meerschweinchen transmittieren konnte.

Im Anschluss wurden die SC35-PB2_{SC35F} und SC35-NA_{SC35F} Viren auf ihre Fähigkeit zur Transmission im Meerschweinchen hin untersucht. Um eine Vergleichbarkeit mit vorhergehenden Experimenten zu erhalten, erfolgte auch hier eine Infektion mit einer Dosis von $5 \cdot 10^5$ p.f.u. der Viren. Die Titer von SC35-PB2_{SC35F} und SC35-NA_{SC35F} waren in den Nasenspülungen infizierter Meerschweinchen (Abbildung 20D, K) an Tag 1 p.i. am höchsten, an den Tagen 3 und 6 p.i. reduziert und an Tag 9 p.i. nicht mehr nachweisbar. SC35-PB2_{SC35F} und SC35-NA_{SC35F} schienen somit nicht aktiv im oberen Respirationstrakt des Meerschweinchens zu replizieren.

Interessanterweise waren die Virustiter in den Nasenspülungen an Tag 1 p.i. von Meerschweinchen, die mit SC35-PB2_{SC35F} infiziert waren (Abbildung 20D) generell niedriger, als die Titer der Nasenspülungen nach Infektion mit SC35 an Tag 1 p.i.. Die Titer der Nasenspülungen von Meerschweinchen, die mit SC35-PB2_{SC35F} infiziert waren lagen zwischen 1,95 und 4,5 $\log_{10}(\text{p.f.u./ml})$, wobei die Titer in Nasenspülungen von Meerschweinchen, die mit dem WT SC35 Virus infiziert waren zwischen 3,8 und 5,8 $\log_{10}(\text{p.f.u./ml})$ betragen. Damit waren die Virustiter in Nasenspülungen von Meerschweinchen, die mit SC35-PB2_{SC35F} infiziert waren um mehr als eine Logstufe niedriger im Vergleich zu den Titern von Meerschweinchen, die mit SC35 infiziert waren. Dahingegen waren die Virustiter in den Nasenspülungen der SC35-NA_{SC35F} infizierten Tiere an Tag 1 p.i.

Ergebnisse

ungefähr so hoch wie in mit SC35 infizierten Meerschweinchen (Abbildung 20K). Die Titer der Nasenspülungen von SC35-NA_{SC35F} infizierten Meerschweinchen lagen an Tag 1 p.i. zwischen 4,1 und 5,5 log₁₀(p.f.u./ml). Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass neben dem SC35 WT Virus die beiden Viren SC35-PB2_{SC35F} und SC35-NA_{SC35F} nicht in der Lage waren über Aerogene (Abbildung 20F, M) oder über direkten Kontakt im Meerschweinchen zu transmittieren (Abbildung 20E, L).

Des Weiteren wurden die rekombinanten Viren SC35-PB1_{SC35F} und SC35-HA_{SC35F} auf ihre Fähigkeit zur Transmission im Meerschweinchen untersucht. Wie in den vorherigen Transmissionsversuchen wurden auch hier die Donor-Meerschweinchen mit einer Dosis von 5*10⁵ p.f.u. infiziert. Im Gegensatz zu SC35-PB2_{SC35F} und SC35-NA_{SC35F} scheinen das SC35-PB1_{SC35F} und das SC35-HA_{SC35F} Virus in der Lage zu sein, aktiv im oberen Respirationstrakt des Meerschweinchens zu replizieren. Dies ist sichtbar durch die Anstiege der Virustiter in den Nasenspülungen der Donor-Meerschweinchen an Tag 6 p.i. (Abbildung 20G, N). Des Weiteren konnte nach Infektion mit SC35-PB1_{SC35F} in einem der infizierten Meerschweinchen noch Virustiter im oberen Respirationstrakt bis Tag 9 p.i. detektiert werden (Abbildung 20G). Dieselbe Beobachtung konnte für Donor-Meerschweinchen infiziert mit SC35-HA_{SC35F} gemacht werden (Abbildung 20N). Nach Infektion mit dem SC35-PB1_{SC35F} Virus waren die Virustiter in den Nasenspülungen der Meerschweinchen generell an Tag 1 p.i. etwas niedriger (~3,5 bis 4,2 log₁₀(p.f.u./ml)) im Vergleich zu den Titern aus Meerschweinchen, die mit dem WT SC35 Virus infiziert wurden. Die Höhe der Virustiter in den Nasenspülungen der Tiere, die mit SC35-HA_{SC35F} infiziert wurden, war sehr unterschiedlich, obwohl allen Tieren dieselbe Virusdosis appliziert wurde. Die Titer der Nasenspülungen reichten dabei an Tag 1 p.i. von 1,5 bis 4,8 log₁₀(p.f.u./ml). Weder für das SC35-PB1_{SC35F} noch für SC35-HA_{SC35F} Virus konnte Aerogentransmission detektiert werden (Abbildung 20I, P). Interessanterweise konnte für beide Einzelgenreassortanten SC35-PB1_{SC35F} und SC35-HA_{SC35F} Transmission über direkten Kontakt nachgewiesen werden (Abbildung 20H, O). In einem ersten Versuch zur Kontakttransmission von SC35-PB1_{SC35F} konnte in einem der beiden Sentineltiere Virus nachgewiesen werden. In einem ersten Versuch zur Kontakttransmission von SC35-HA_{SC35F} im Meerschweinchen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sich eines der beiden Sentineltiere infiziert hatte. Daraufhin wurden die Kontakttransmissionsversuche mit den beiden Einzelgenreassortanten SC35-PB1_{SC35F} und SC35-HA_{SC35F} wiederholt. Der Versuchsaufbau des Wiederholungsversuchs war unverändert zu den vorherigen Kontakttransmissionsversuchen, wobei die Anzahl der Tiere auf vier Donor- und vier Sentinel-Meerschweinchen erhöht wurde. Die in Abbildung 20H und O dargestellten Virustiter aus Nasenspülungen fügten sich aus jeweiligen Versuchen zu Kontakttransmission von SC35-PB1_{SC35F} oder SC35-HA_{SC35F} zusammen. In dem Wiederholungsversuch der

Ergebnisse

Kontakttransmission konnten für das SC35-PB1_{SC35F} Virus keine viruspositiven Nasenspülungen in den Sentinel-Meerschweinchen, also keine erneute Transmission über direkten Kontakt, detektiert werden. Interessanterweise konnte für das SC35-HA_{SC35F} Virus erneut Kontakttransmission, diesmal in zwei der vier Sentinel-Meerschweinchen, gezeigt werden. Somit konnte in insgesamt drei der sechs Sentinel-Meerschweinchen Transmission von SC35-HA_{SC35F} Virus über direkten Kontakt der Meerschweinchen nachgewiesen werden (Abbildung 200). Die Ergebnisse zur Transmission von SC35-PB1_{SC35F} Virus im Meerschweinchen lassen darauf schließen, dass dieses Virus eine geringere Fähigkeit zur Kontakttransmission (~17 % der Sentineltiere wurden über direkten Kontakt infiziert) im Gegensatz zu dem SC35-HA_{SC35F} Virus (50 % der Sentineltiere wurden über direkten Kontakt infiziert) hatte.

Zusammenfassend konnte durch die Transmissionsversuche gezeigt werden, dass kein in dieser Arbeit getestetes Virus über Aerogene transmittieren konnte. Zudem waren nur Einzelgenreassortanten, die aktiv im oberen Respirationstrakt des Meerschweinchens replizierten, über direkten Kontakt transmittierbar. Bei den Viren die über direkten Kontakt transmittierbar waren, handelt es sich um das SC35-PB1_{SC35F} Virus und das SC35-HA_{SC35F} Virus. Somit scheinen die SC35F-spezifischen Mutationen im HA und im PB1 Protein eine Transmission über direkten Kontakt im Meerschweinchenmodell zu erhöhen.

4.3.1.2. Transmission der Einzelpunktmutanten und des SC35F-HA_{monobasisch} Virus im Meerschweinchen

Des Weiteren wurden sowohl die einzelnen Mutationen des SC35F Virus im HA im SC35 Hintergrund, als auch die kompletten SC35F-spezifischen Mutationen in Kombination in einem Virus ohne multi-BCS auf ihre Fähigkeit der Transmission untersucht. Dazu wurden Meerschweinchen mit $5 \cdot 10^5$ p.f.u. der SC35F Einzelpunktmutanten (SC35-HA_{111T}, SC35-HA_{146S} und SC35-HA_{340R}) sowie des SC35F-HA_{monobasisch} Virus infiziert. Nach der Infektion wurden Nasenspülungen Sentineltiere und der Donortiere durchgeführt.

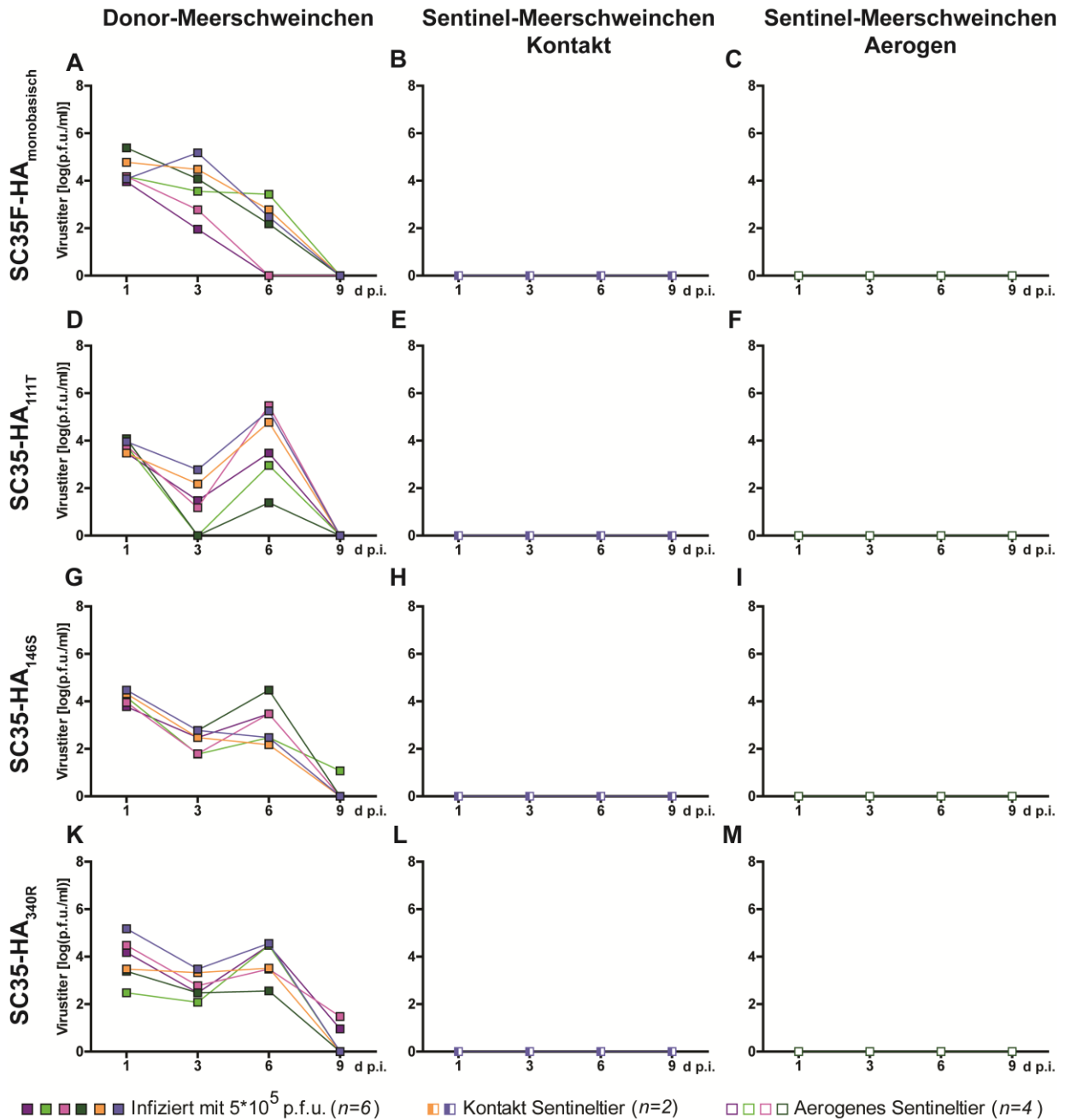


Abbildung 21: Virustiter der Nasenspülungen von Meerschweinchen, die mit den Einzelpunktmutanten SC35F-HA_{monobasisch}, SC35-HA_{111T}, SC35-HA_{146S} und SC35-HA_{340R}.

Zur Untersuchung der Transmission wurden weibliche Hartley Meerschweinchen mit verschiedenen Einzelpunktmutanten sowie dem SC35F-HA_{monobasisch} Virus infiziert. Die in A, D, G und K dargestellten Ergebnisse stellen die Titer der Nasenspülungen aus Donor-Meerschweinchen der Transmissionsversuche dar (gefüllte Quadrate in lila, hellgrün, pink, dunkelgrün, orange und blau; $n=6$). Die in B, E, H und L dargestellten Ergebnisse zeigen die Titer der Nasenspülungen von Sentinel-Meerschweinchen aus Versuchen zur Kontakttransmission (halb gefüllte Quadrate in orange und blau; $n=2$). Die in C, F, I und M dargestellten Ergebnisse zeigen die Titer der Nasenspülungen von Sentinel-Meerschweinchen aus Versuchen zur Aerogenentransmission (leere Quadrate in lila, hellgrün, pink und dunkelgrün; $n=4$). Alle Titer sind in logarithmischer Auftragung dargestellt. Die Aerogenen Sentineltiere wurden in Transmissionskäfigen mit ca. 10 cm Abstand zu den Donor-Meerschweinchen platziert, wobei ein Luftstrom von den Donor-Meerschweinchen zu den Sentinel-Meerschweinchen gerichtet war. Die Kontakt Sentinel-Meerschweinchen wurden direkt in denselben

Ergebnisse

Käfig mit einem infizierten Meerschweinchen gesetzt. Die Nasenspülungen wurden an den Tagen 1, 3, 6 und 9 p.i. durchgeführt. Die Virustiter der Nasenspülungen wurden mittels Plaque Test ermittelt.

In keinem der Sentinel-Meerschweinchen die dem SC35F-HA_{monobasisch} Virus ausgesetzt waren, konnten Virustiter in den Nasenspülungen detektiert werden (Abbildung 21B, C). Durch die beobachtete, stetige Reduktion der Virustiter über die Versuchszeit wurde deutlich, dass das SC35F-HA_{monobasisch} Virus im Gegensatz zu SC35 nicht aktiv im oberen Respirationstrakt des Meerschweinchen replizieren konnte. An Tag 9 p.i. waren in Meerschweinchen, die mit SC35F-HA_{monobasisch} Virus infiziert waren keine Virustiter in den Nasenspülungen mehr nachweisbar. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das SC35F-HA_{monobasisch} Virus weder in der Lage ist über direkten Kontakt (Abbildung 21B) noch über Aerogene (Abbildung 21C) zu transmittieren. Das SC35F-HA_{monobasisch} Virus hat somit keinen Transmissionsvorteil gegenüber dem parentalen SC35 Virus.

Um den Beitrag der einzelnen SC35F-spezifischen Mutationen im HA Protein in Bezug auf die Transmissibilität zu untersuchen, wurden Meerschweinchen mit den Einzelpunktmutanten SC35-HA_{111T}, SC35-HA_{146S} und SC35-HA_{340R} infiziert und in Transmissionsversuchen eingesetzt. Wie bereits oben beschrieben, wurden die virusausscheidenden Donor-Meerschweinchen auch in diesen Versuchen mit $5 \cdot 10^5$ p.f.u. infiziert (Abbildung 21D, G, K). Um den Infektionsverlauf der Donortiere sowie eine mögliche Infektion der Sentineltiere zu überwachen, wurden Nasenspülungen aller Meerschweinchen durchgeführt.

Die Einzelpunktmutanten zeigen zumindest in einigen der infizierten Tiere eine geringe aktive Replikation im oberen Respirationstrakt des Meerschweinchen. Die Virustiter der Nasenspülungen aus Meerschweinchen, die mit SC35-HA_{111T} Virus infiziert wurden (Abbildung 21D) waren an Tag 6 p.i. durchschnittlich mindestens so hoch wie an Tag 1 p.i. (zwischen 3,8 und 4,1 \log_{10} (p.f.u./ml)), was darauf schließen lässt, dass das SC35-HA_{111T} Virus in einigen infizierten Tieren aktiv im oberen Respirationstrakt replizieren kann. An Tag 9 p.i. war kein Virus mehr in den Nasenspülungen nachweisbar.

Das SC35-HA_{111T} Virus replizierte vergleichsweise etwas besser im oberen Respirationstrakt des Meerschweinchen als das SC35-HA_{146S} Virus. In Donor-Meerschweinchen, die mit SC35-HA_{146S} Virus infiziert waren, wurden Titer in Nasenspülungen von an Tag 1 p.i. zwischen 3,8 und 4,5 \log_{10} (p.f.u./ml) detektiert. Die Titer in den Nasenspülungen dieser infizierten Meerschweinchen sind an Tag 3 p.i. um etwa eine Logstufe reduziert und stiegen an Tag 6 p.i. noch einmal an. An Tag 9 p.i. war noch Virus in der Nasenspülung in einem Meerschweinchen nachweisbar (Abbildung 21G).

Auch das SC35-HA_{340R} Virus war in der Lage aktiv im oberen Respirationstrakt des Meerschweinchen zu replizieren. Die Virustiter der Nasenspülungen Meerschweinchen, die

mit SC35-HA_{340R} infizierten waren, waren durchschnittlich an Tag 6 p.i. bei $3,9 \log_{10}(\text{p.f.u./ml})$ so hoch wie die Titer an Tag 1 p.i. ($3,9 \log_{10}(\text{p.f.u./ml})$) (Abbildung 21K).

Für alle drei Einzelpunktmutanten konnte gezeigt werden, dass diese in der Lage sind im oberen Respirationstrakt des Meerschweinchens zu replizieren. Im Gegensatz zu den zuvor getesteten Einzelgenreassortanten konnte nach Infektion mit den Einzelpunktmutanten trotz Replikation im oberen Respirationstrakt keine Transmission, weder über direkten Kontakt noch über Aerogene, festgestellt werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Transmissionsstudien, dass alle SC35- und SC35F-spezifischen Viren nicht über Aerogene transmittieren können. Dahingegen waren die Einzelgenreassortanten SC35-PB1_{SC35F} und SC35-HA_{SC35F} in der Lage über direkten Kontakt im Meerschweinchen zu transmittieren. Die verantwortlichen Mutationen, die zu einer Erhöhung der Transmission über direkten Kontakt beitragen sind PB1_{L13P}, sowie die drei SC35F-spezifischen HA Mutationen HA_{I111T}, HA_{A146S} und HA_{G340R} in Kombination.

4.3.2. Untersuchungen der Viruslast in Homogenisaten der Trachea und Lunge von Meerschweinchen infiziert mit SC35 und SC35F rekombinanten Viren

Um die Virusreplikation der rekombinanten SC35 und SC35F Viren auch im unteren Respirationstrakt zu untersuchen, wurden drei weitere Meerschweinchen infiziert. Da die höchsten Virustiter in den Nasenspülungen durchschnittlich an Tag 6 p.i. detektiert wurden (Abbildung 20 und Abbildung 21), wurde dieser Zeitpunkt für eine Untersuchung der viralen Titer der Lungen und der Trachea ausgewählt.

An Tag 6 p.i. wurde nach Euthanasie der Meerschweinchen ein Teil der Trachea und Teile der Lungen entnommen. Aus diesen respiratorischen Organproben wurden Homogenisate hergestellt, die im Anschluss mittels Plaque Test auf den Virustiter hin untersucht wurden. In den Homogenisaten aus Trachea und Lunge (Lunge oben rechts, Lunge unten rechts, Lunge oben links, Lunge unten links) infizierter Meerschweinchen ($n=3$ pro Virus) und nicht infizierter Raumkontrolltieren ($n=1$ pro Versuch) konnten, außer in einem Fall, keine viralen Titer nachgewiesen werden (Ergebnisse werden nicht gezeigt). Die Ausnahme davon stellte das Lungenhomogenisat aus einem der drei Meerschweinchen dar, die mit SC35-PB1_{SC35F} infiziert wurden. In diesem Tier konnte in dem oberen rechten Lungenflügel Virus in beträchtlichen Mengen ($3,6 \cdot 10^3$ p.f.u./g) nachgewiesen werden. Die Detektionsgrenze dieses Versuchs liegt bei 30 plaquebildenden Viruspartikeln pro 1000 μl Organhomogenisat.

Zusammenfassend mit den Transmissionsstudien lassen diese Ergebnisse vermuten, dass die Viren entweder nur im oberen Respirationstrakt des Meerschweinchens replizieren, da die Nasenspülungen an Tag 6 p.i. meist die höchste Viruslast haben.

Ergebnisse

Aus den Ergebnissen zur Untersuchung der Viruslast in den Nasenspülungen und den Organhomogenisaten infizierter Meerschweinchen lässt sich schlussfolgern, dass die rekombinanten SC35 und SC35F Viren zumindest an Tag 6 p.i. hauptsächlich im Nasen-Rachenraum und nicht in der Lunge oder Trachea replizieren.

5. Diskussion

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse aus Kapitel 4 der verschiedenen Themengruppen diskutiert und in Kontext zu Ergebnissen vorhergehender Arbeiten gesetzt.

5.1. Charakterisierung der rekombinanten SC35 und SC35F Viren

Die wiederholten Ausbrüche von H7 Viren in Geflügel und die in den letzten Jahren stetig ansteigenden Infektionszahlen von Menschen mit Viren diesen Subtypus zeigen die Dringlichkeit eines besseren Verständnisses von aviären H7 HPAIV. Bisher sind HPAIV des H7 Subtyps nicht effizient im Menschen transmissibel. Es wird allerdings befürchtet, dass diese Viren aufgrund der nicht vorhandenen *proofreading* Aktivität der Polymerase sowie der Möglichkeit zur Reassortierung mit anderen IAV Subtypen die Fähigkeit zur effizienten Mensch-zu-Mensch Transmission erhalten könnten. Durch die immunologische Naivität der humanen Bevölkerung gegenüber diesen H7 Subtypen könnte es durch die Evolution dieser Viren zu einer neuen IAV Pandemie mit verheerenden Mortalitätsraten kommen (3, 27, 28, 94, 103). In vorhergehenden Studien wurden experimentell bereits Virusdeterminanten beschrieben, die eine Erhöhung der Pathogenität oder der Transmission im Tiermodell auslösen (28, 103, 185, 270).

Zur Untersuchung eines humanähnlichen Adaptationsmodell eines HPAIV des H7 Subtyps wurde das SC35F Virus verwendet. Dieses Virus wurde bereits in den 1990er Jahren generiert. Dazu wurde das aviär-adaptierte SC35 Virus durch mehrere Passagen von Lungenhomogenisat an Frettchen adaptiert bis eine Mortalität von 100 % in Frettchen auftrat. Dieses für Frettchen letale Virus beschreibt das SC35F Virus. Das Frettchen gilt aufgrund ihrer Rezeptorverteilung und der humanähnlichen Symptome als Gold Standard zur Untersuchung und Vorhersage der Symptome und Transmission von IAV im Menschen. Somit kann das SC35F Virus als Modellvirus zur Untersuchung der Mensch-zu-Mensch Transmission verwendet werden.

Interessanterweise wurde keine der zuvor beschriebenen Pathogenitäts- und Transmissionsdeterminanten wie PB2_{E627K} oder PB2_{D701N} während der Sequenzierung des viralen SC35F Genoms gefunden. Bei den detektierten, frettchenadaptiven Mutationen in SC35F im Vergleich zu SC35 handelt es sich um folgende sechs Mutationen auf Aminosäuresequenzebene: PB2_{H357N}, PB1_{L13P}, HA_{I111T}, HA_{A146S}, HA_{G340R} und NA_{A328S}. Da das Virus über mehrere Passagen an Frettchen adaptiert wurde, ist anzunehmen, dass zumindest einige der SC35F-spezifischen Mutationen säugeradaptive Determinanten sind.

Interessanterweise konnten bereits zuvor im mausadaptierten SC35M Virus drei der SC35F-spezifischen Mutationen detektiert werden (PB1_{L13P}, HA_{G340R} und NA_{A328S}) (188). Es scheint daher, dass diese drei gemeinsamen und unabhängig voneinander, während des Passagierens im Säuger, entstandenen Mutationen in SC35M und SC35F nicht speziessondern säugerspezifisch sind. Zu Beginn dieser Studie waren die Einflüsse der detektierten SC35F Mutationen in Bezug auf mögliche Änderungen in Bezug auf die Bindespezifität, die NA oder vRNP-Aktivität noch komplett unbekannt. Um die Mutationen des SC35F Virus zu charakterisieren, wurde das parentale, aviäre SC35 Virus direkt mit SC35F Einzelpunktmutanten und Eingelgenreassortanten verglichen. Diese SC35- und SC35F-spezifischen Viren wurden dann auf Aktivitäten der viralen Polymerase, der Neuraminidase und der Bindespezifität des Hämagglutinins sowie auf die Pathogenität im Mausmodell und die Transmission im Meerschweinchenmodell hin untersucht. Auf die dabei erhaltenen Ergebnisse wird im Verlauf der Diskussion ausführlich eingegangen.

5.2. PB2_{H357N} führt zur erhöhten Polymeraseaktivität in humanen Zellen

Es wird vermutet, dass bei der Adaptation aktivitätssteigernde Mutationen in der viralen Polymerase auftreten, welche die Adaptation an den Säuger ermöglichen. Derartige Mutationen in der Polymerase von HPAIVs können dazu beitragen die Virulenz dieser Viren im Mausmodell zu steigern (188).

Nach Sequenzanalysen wurden zwei SC35F-spezifische Mutationen (PB2_{H357N} und PB1_{L13P}) in der Polymerase im Vergleich zum parentalen Stamm SC35 festgestellt (Kapitel 4.1.1). Um potenzielle Änderungen der Polymeraseaktivitäten von SC35 und SC35F zu untersuchen, wurde ein dualer Luciferase Test durchgeführt (Kapitel 3.4.1 und 4.1.4). Während der Analysen konnte gezeigt werden, dass die Polymeraseaktivität durch die SC35F-spezifische PB2_{H357N} Mutation im vRNP Rekonstitutionsversuch signifikant erhöht wurde. Als Vergleich dazu diente die Polymeraseaktivität von SC35. Die SC35F-spezifische PB1_{L13P} Mutation alleine im SC35 Hintergrund konnte jedoch keine signifikante Erhöhung der Polymeraseaktivität auslösen. Die Mutationen PB2_{H357N} und PB1_{L13P} im SC35 Hintergrund in Kombination führten jedoch zu einer signifikanten Erhöhung der Polymeraseaktivität. Aus diesen Resultaten kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Polymeraseaktivität von SC35 in Säugerzellen natürlicherweise niedrig ist. Vermutlich wird die Erhöhung der Polymeraseaktivität von SC35F daher hauptsächlich durch die Mutation an Position 357 im PB2 vermittelt, wobei die PB1_{L13P} Mutation nur geringfügig zur Erhöhung der Polymeraseaktivität von SC35F beiträgt. Interessanterweise wurde die PB2_{H357N} Mutation bereits in einer vorangegangenen Arbeit in einem H1N1 IAV aus der 2009 Pandemie

(A/Sichuan/1/2009 (pH1N1)) beschrieben (198). Ähnlich wie in den für diese Arbeit durchgeführten Luciferasetests wurde hier ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Polymeraseaktivität bei Vorhandensein der PB2_{H357N} Mutation festgestellt (198). In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass die PB2_{H357N} Mutation in einem H3 IAV in der Bindedomäne (*cap binding domain*) lokalisiert ist (199, 271). Ein Vergleich der Sequenzen der PB2 Proteine von H3 IAV A/Victoria/3/1975 (H3N2) und SC35F bestätigte, dass die PB2 Proteinnomenklatur dieser H3 und H7 Viren identisch ist. Somit befindet sich auch die PB2_{H357N} Mutation des SC35F Virus in der Cap-Bindedomäne. Es wird vermutet, dass Mutationen in der Cap Bindedomäne die Bindeaffinität zu den 5'-Capstrukturen der zellulären prä-mRNA verändern (13). Eine geringere Bindung der Capdomäne kann zu einer geringeren viralen mRNA und Proteinsynthese führen (199). Es wurde bereits beschrieben, dass die Einführung des Asparagins (N) an der aa Position 357 des PB2-Proteins anstelle von Tryptophan (357W) oder Tyrosin (357Y) im pH1N1 Hintergrund eine Abschwächung der Capbindung auslöst (199). Viren mit wirtsadaptiven Mutationen, die in der Lage sind die Polymeraseaktivität zu erhöhen, zeigen oft ebenfalls eine bessere Fitness im neuen Wirt (199). Es wird vermutet, dass Mutationen in den Polymeraseuntereinheiten den Beginn der Adaptation eines aviären IAV an ein Säugetier markieren (188). Die PB1_{L13P} Mutation wurde zuvor nur in Zusammenhang mit dem SC35M Virus beschrieben, wobei auch hier keine signifikant erhöhte Polymeraseaktivität festgestellt werden konnte (188). In einem anderen IAV Hintergrund konnte für die PB1_{Q15H} Mutation, lokalisiert in der Nähe der PB1_{L13P} Mutation, gezeigt werden, dass diese in der Nähe der PA Bindschleife (*binding cleft*) liegt (272). Durch eine Mutation an aa Position 13 könnte somit auch die Bindung an die PA Untereinheit der viralen Polymerase geändert werden.

5.3. Die SC35F-spezifische NA_{A328S} Mutation beeinflusst nicht die Neuraminidaseaktivität

Für eine effiziente Replikation eines IAV ist die Balance zwischen Rezeptorbindung (HA Protein) und der Rezeptorabspaltung (NA Protein) von größter Relevanz (273).

Während der Sequenzierung des SC35F Genoms konnte im Vergleich zu SC35 die Mutation NA_{A328S} detektiert werden. Daraufhin wurde die Neuraminidaseaktivität der SC35 und SC35F-spezifischen NA Proteine bestimmt. Die Versuche zur Erythrozytenelution (Kapitel 4.1.5.1) zeigten, dass die SC35- und SC35F-spezifischen NA in Bezug auf ihre Elutionsaktivität keine signifikanten Unterschiede aufwiesen. In diesem Elutionstest wird die Fähigkeit der NA zur Freisetzung der an Erythrozyten gebundene Virionen über eine definierte Zeit gemessen (261).

Des Weiteren wurde ein zusätzlicher Test zur Untersuchung der Neuraminidaseaktivität durchgeführt. Der 4-MUNANA Test nutzt die Fähigkeit der Neuraminidase fluoreszierendes 4-MU von 4-MUNANA abspalten zu können (262). Wie bereits zuvor im Erythrozytenelutionstest konnten auch hier keine signifikanten Unterschiede in der Neuraminidaseaktivität der SC35- und SC35F-spezifischen NA detektiert werden.

Die Untersuchungen zur Neuraminidaseaktivität zeigen, dass der NA_{A328S} Austausch keinen Einfluss auf die Freisetzung der replizierten Viren durch die Neuraminidase hat. Literaturrecherchen zufolge wurde zwar die SC35F-spezifische Mutation an Position 328 bisher nicht weiter beschrieben, allerdings wurde eine direkt angrenzende Mutation an Position 329 beschrieben. Diese tritt entweder als NA_{E329K} oder NA_{D329N} auf (274, 275). Die Mutation an dieser aa Position wurde in Verbindung mit dem *Antigendrift* gebracht, da gezeigt werden konnte, dass diese Mutation auf der Oberfläche des Proteins liegt und so möglicherweise als Antigen für Antikörper fungieren kann (274). Die NA_{A328S} Mutation könnte somit bei der Adaptation des SC35-Virus an das Frettchen dazu gedient haben, der Immunantwort des neuen Wirtes zu entkommen. Um dies bestätigen zu können, sind allerdings weitere Untersuchungen nötig.

Die Balance des HA und NA Proteins kann durch Änderungen in der Rezeptorbindespezifität gestört werden (273). Ist die Kombination von HA und NA nicht ideal, könnte dies eine natürliche Selektion für das Virus darstellen (276). Da die Bindespezifität der SC35 und SC35F rekombinanten Viren unverändert ist, ist die Balance zwischen NA und HA ungestört. Aufgrund der unveränderten Bindespezifität des HA musste die Aktivität der NA nicht geändert werden, womit die gefundenen Ergebnisse der unveränderten Neuraminidaseaktivität zu erwarten waren. Eine Aussage über die Balance des HA und NA Proteins im kompletten SC35F Virus lässt sich leider nicht treffen, da bisher keine Untersuchungen hierzu im BSL-4 Labor durchgeführt werden konnten.

5.4. Die SC35F-spezifischen HA Mutationen beeinflussen nicht die Rezeptorbindung

Es wird vermutet, dass für Viren mit pandemischem Potential eine Änderung der Bindespezifität von α 2,3-verknüpften zu α 2,6-verknüpften Sialinsäuren notwendig ist (27). Die α 2,6-Präferenz der frühen Isolate der pandemischen IAV von 1918, 1957, 1968 und 2009 stützen diese Vermutung (277, 278).

Nach einem direkten Vergleich der HA Sequenz des parentalen SC35 mit dem SC35F HA Protein konnten drei SC35F-spezifische Mutationen detektiert werden. Es handelte sich hierbei um die aa Austausche HA_{I111T}, HA_{A146S} und HA_{G340R}. Um zu untersuchen, ob diese

Mutationen eine Auswirkung auf die Bindspezifitäten der rekombinanten Viren haben, wurden das parentale Virus SC35, die Einzelpunktmutanten SC35-HA_{111T}, SC35-HA_{146S}, SC35-HA_{340R} sowie die Einzelgenreassortante SC35-HA_{SC35F} in einem HA Test mit modifizierten Putenerythrozyten auf ihre Präferenz der Bindung an α 2,3- oder α 2,6-verknüpfte Sialinsäuren hin untersucht. Dazu wurden initial alle Sialinsäuren auf der Oberfläche der Erythrozyten mittels VCNA entfernt und ein Teil dieser desialylierten Erythrozyten als Kontrolle verwendet während ein anderer Teil dieser desialylierten Erythrozyten mit α 2,3- beziehungsweise α 2,6-Sialyltransferase resialyliert wurde (Kapitel 3.5.8).

So konnte gezeigt werden, dass das SC35 Virus eine Bindung an α 2,3-verknüpfte Sialinsäuren bevorzugt. Diese Bindepräferenz bleibt auch nach Einfügen der einzelnen SC35F Mutationen im HA oder der drei HA Mutationen in Kombination mit derselben Bindungsstärke an α 2,3-verknüpfte Sialinsäuren erhalten (Kapitel 4.1.6.2.). Die drei SC35F-spezifischen Mutationen im HA ändern somit nicht die Bindspezifität der SC35 und SC35F rekombinanten Viren. Eine verstärkte Bindepräferenz an α 2,6-verknüpfte Sialinsäuren wurde bereits zuvor nach Adaptation anderer HPAIV (H5N1) an Frettchen beobachtet, woraufhin die SC35F-spezifischen Mutationen im HA auf ihre Bindspezifität untersucht wurden (28, 103). Die verstärkte Bindung an α 2,6-verknüpfte Sialinsäuren wurde zuvor im Frettchenmodell zwar als erforderlich, nicht jedoch als Voraussetzung für Aerogentransmission beschrieben (175, 279).

Durch Sequenzalignments konnte gezeigt werden, dass die HA_{111T} Mutation in der Nähe der Rezeptorbindestelle und die HA_{A146S} Mutation direkt neben der 145 aa Position lokalisiert ist, welche die Basis der Rezeptorbindetasche bildet (267). Daher ist die unveränderte Rezeptorbindespezifität von SC35-HA_{111T} und SC35-HA_{146S} an α 2,3-verknüpfte Sialinsäuren ein unerwartetes Ergebnis dieser Studie (267).

Nach direkten HA Aminosäuresequenzvergleichen des SC35F Virus mit dem A/Netherlands/219/2003 (H7N7) Virus mit bekannter Rezeptorbindestelle konnten die spezifischen SC35F Mutationen im HA Protein lokalisiert werden (Abbildung 11). Hierbei zeigte sich, dass die HA_{111T} und die HA_{A146S} Mutationen in der Nähe der Rezeptorbindestelle lokalisiert sind (267). Des Weiteren wurde zuvor die aa Position 153, in der Nähe der SC35F-spezifischen HA_{A146S} Mutation, als ein Teil der Rezeptorbindetasche beschrieben (267). Da die beiden Mutationen I111T und A146S in der Quartärstruktur des HA Proteins in der Nähe der Rezeptorbindestelle liegen, kann durch eine Mutation an einer der beiden Positionen eine Änderung der Rezeptorbindungspräferenz ausgelöst werden. Die G340R Mutation im HA ist in der multi-BCS lokalisiert (251, 268). Multi-BCS können durch ubiquitär exprimierte Wirtszellproteasen in HA₁ und HA₂ gespalten werden. Diese Wirtszellproteasen erkennen

das sogenannte minimale Spaltmotiv R-X-K/R-R (Vey et al 1992). Das SC35 Virus hat hierbei das Spaltmotiv R-G-R-R, wohingegen das SC35F Virus das Spaltmotiv R-R-R-R aufweist. Bisher ist nicht bekannt, dass Mutationen im minimalen Spaltmotiv die Erkennung und Spaltbarkeit ändern (280).

5.5. Die SC35F-spezifischen HA Mutationen erhöhen die Pathogenität im Mausmodell

HPAIV können ohne vorherige Adaptation in BALB/c Mäusen auf die Pathogenität und den Organ-/Gewebetropismus untersucht werden (281-283). Zur Charakterisierung der rekombinanten SC35 und SC35F Viren *in vivo*, wurde unter anderem die MLD₅₀ jedes Virus in BALB/c Mäusen bestimmt. Wie bereits zuvor beschrieben, wurden dazu in dieser Arbeit Mäuse intranasal mit einer Virusdosis zwischen 10² p.f.u. und 10⁶ p.f.u. infiziert (Kapitel 4.1.8). Die MLD₅₀ Werte wurden mittels der Reed und Muench Methode berechnet (263). Wie aus Abbildung 15 ersichtlich wird, sind fast alle rekombinanten SC35 und SC35F Viren in BALB/c Mäusen mit einer MLD₅₀ von mindestens 10⁵ p.f.u. nur niedrigpathogen. Die Gewichtsverläufe der infizierten Mäuse zeigen einen starken Einbruch der Gewichte bis etwa Tag 4 p.i., allerdings erholen sich die Mäuse meist schnell wieder von der Infektion und nähern sich danach wieder ihrem Ausgangsgewicht an (Gewicht am Tag der Infektion = 100 %) (Abbildung 12). Obwohl das SC35-PB1_{SC35F} Virus nach einer Infektion mit 10⁶ p.f.u. zwar einen stark erhöhten Gewichtsverlust von zwei Mäusen auslöste, der die Euthanasie dieser Tiere zur Folge hatte, war auch dieses Virus, wie die meisten anderen rekombinanten SC35 und SC35F Viren, in BALB/c Mäusen niedrigpathogen. Die einzige Ausnahme bildete hierbei das rekombinante Virus SC35-HA_{SC35F}, für das eine MLD₅₀ von 10^{1,74} p.f.u. ermittelt wurde. Das Virus SC35-HA_{SC35F} ist somit 18.000-fach virulenter als das WT Virus SC35. Die hohe Virulenz, die dieses Virus nach einer intranasalen Infektion in Mäusen auslöst, ist vergleichbar so hoch wie die Virulenz des A/Thailand/KAN-1/04 (H5N1) Virus, einem humanen H5N1 Isolat, das letale Folgen für den infizierten Patienten hatte (284, 285).

Während der Infektionsversuche konnte beobachtet werden, dass BALB/c Mäuse bei niedrigen Virusdosen neurologische Symptome aufwiesen. Für eine eindeutige Aussage müssten weitere, spezifischere Versuche durchgeführt werden. Die Korrelation einer erhöhten Gewichtsabnahme bei einer höheren Virusdosis ist gut ersichtlich in Abbildung 13A. Interessanterweise ist eine solche Dosisabhängigkeit nicht aus der Überlebensrate der Mäuse, die mit SC35-HA_{SC35F} infiziert waren, ersichtlich. Es wird vermutet, dass die neurologischen Symptome, die diese rekombinante Einzelgenreassortante auch nach Applikation geringer Virusdosen auslöste, eine Ursache für die Virusdosis unabhängige

Mortalität waren. Nur in Kombination der drei SC35F-spezifischen HA Mutationen (HA_{111T}; HA_{A146S}; HA_{G340R}) im SC35 Hintergrund mit einer multi-BCS konnte die Pathogenität und die Virulenz signifikant erhöht werden. Eine Infektion von Mäusen mit den Einzelpunktmutanten mit den SC35F-spezifischen HA Mutationen resultierten in MLD₅₀ Werten zwischen 10⁵ p.f.u. (SC35-HA_{340R}) und 10^{5,5} p.f.u. (SC35-HA_{111T} und SC35-HA_{146S}).

Das komplette SC35F Virus konnte nicht auf die Virulenz und Pathogenität im BALB/c Mausmodell untersucht werden, da dieses Virus als BSL-4 Pathogen eingestuft wurde. Allerdings wurde uns behördlich ermöglicht ein rekombinantes Virus mit allen SC35F-spezifischen Mutationen, allerdings ohne multi-BCS, zu generieren. Dieses SC35F-HA_{monobasisch} Virus wurde als BSL-3 Pathogen eingestuft.

Aufgrund der niedrigen Pathogenität, die das SC35F-HA_{monobasisch} Virus in BALB/c Mäusen aufwies, konnte gezeigt werden, dass die multi-BCS eine essenzielle Rolle in der Pathogenität der rekombinanten SC35 und SC35F Viren spielt.

Bereits zuvor konnten verminderte Virulenzen in Mäusen, die mit H5 und H7 Viren infiziert wurden festgestellt werden, nachdem die multi-BCS artifiziell entfernt wurde (188, 286). Diese Beobachtungen spiegeln auch die Ergebnisse dieser Doktorarbeit wieder. Diese zeigen, dass die SC35F-spezifischen HA Mutationen im SC35 Hintergrund die Virulenz in Mäusen nur in Kombination mit einer multi-BCS um mehrere Potenzen erhöhen konnten. Die Entfernung der multi-BCS in Kombination mit allen sechs SC35F-spezifischen Mutationen resultierte in einem niedrigpathogenen Virus (SC35F-HA_{monobasisch}). Interessant wäre die Untersuchung der Pathogenität des kompletten SC35F Virus in BALB/c Mäusen, wobei eine solche Untersuchung allerdings nur in einem BSL-4 Labor möglich ist.

5.6. Die SC35F-spezifischen HA Mutationen erhöhen die viralen Titer in den Lungen infizierter BALB/c Mäuse

Wie bereits oben beschrieben kann der Organ- und Gewebetropismus von HPAIVs in Mäusen ohne vorherige Mausadaptation bestimmt werden (281-283).

Daher wurden in dieser Arbeit die SC35F Einzelgenreassortanten und Einzelpunktmutanten bezüglich ihres Organotropismus im Mausmodell charakterisiert (Kapitel 4.2.2). Für diese Infektionen wurden Mäuse mit einer Virusdosis von 10⁵ p.f.u. oder 10⁶ p.f.u. infiziert. Diese Virusdosen wurden basierend auf den MLD₅₀ Werten gewählt.

Es konnte gezeigt werden, dass mit SC35, den Einzelgenreassortanten und dem SC35-HA_{SC35F} Virus infizierte Mäuse die höchsten Lungentiter an Tag 3 p.i. aufwiesen. An Tag 6 p.i. waren alle Titer in den Lungen im Vergleich zu Tag 3 p.i. reduziert. Die Titer in Lungen der Mäuse infiziert mit SC35-HA_{SC35F} waren im Vergleich zu den Lungen von Mäusen infiziert

Diskussion

mit den anderen Einzelgenreassortanten an Tag 3 p.i. leicht erhöht. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Infektion mit dem SC35-HA_{SC35F} Virus bei der gleichen applizierten Virusdosis in höheren Lungentitern resultiert (Abbildung 16). Bei Untersuchungen der viralen Lungentiter von Mäusen, die mit den Einzelpunktmutanten (SC35-HA_{111T}, SC35-HA_{146S}, SC35-HA_{340R}) infiziert wurden, konnten an Tag 3 p.i. keine Unterschiede den Lungentitern gezeigt werden. An Tag 6 p.i. jedoch, waren die Lungentiter von Mäusen, die mit den Viren SC35-HA_{340R} infiziert worden waren, deutlich erhöht im Gegensatz zu Lungentitern von Mäusen, die mit SC35-HA_{111T} und SC35-HA_{146S} infiziert wurden (Abbildung 17). Diese erhöhte Viruslast spiegelte sich ebenfalls den Gewichtsverläufen der Mäuse, die mit SC35-HA_{340R} infiziert wurden, wider (Abbildung 14A). Interessanterweise waren die Lungen von Mäusen, die mit SC35-HA_{340R} infiziert waren auch an Tag 6 p.i. fast so hoch wie an Tag 3 p.i..

Für ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen müssten weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden.

Bereits zuvor konnte durch die Forschergruppe von Peter Palese gezeigt werden, dass eine einzelne Mutation im IAV Genom die Replikation in der Mauslunge erhöhen und somit die Virus clearance vermindern kann (200). Diese Beobachtungen konnten in dieser Arbeit mit der SC35F-spezifischen HA Mutation G340R gemacht werden. In Lungen von Mäusen, die an Tag 6 p.i. untersucht wurden, konnten die höchsten Virustiter detektiert werden. Signifikanzberechnungen zeigten eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu Lungen von Mäusen, die mit SC35-HA_{111T} wurden.

Die SC35F-spezifische Mutation G340R ist in der multi-BCS lokalisiert. Wie bereits oben erwähnt kann die multi-BCS unter anderem durch Furin sowie Furin-ähnliche Enzyme am Furin-Erkennungsmotiv R-X-K/R-R erkannt und gespalten werden (280). Das parentale SC35 Virus besitzt das Furin-Erkennungsmotiv R-G-R-R, wohingegen das HA des SC35F Virus das Motiv R-R-R-R aufweist. Diese SC35F-spezifische Mutation G340R in der Spaltstelle löst eine leicht erhöhte Virulenz ($MLD_{50} = 10^5$ p.f.u.) im Gegensatz zum parentalen SC35 ($MLD_{50} = 10^6$ p.f.u.) aus. Allerdings ist bisher nicht bekannt, dass eine Änderung eines Glyzin in ein Arginin an Position 340 im HA von H7 HPAIVs auslöst (280). In den Mutanten SC32 und SC35 konnten genau dieselben Spaltmotive wie in SC35 und SC35F beobachtet werden, wobei die Spaltbarkeit der Viren stets als gleich hoch eingestuft wurde (280).

5.7. Die SC35F-spezifischen Mutationen in PB2 und HA tragen zu einer systemischen Infektion im Mausmodell bei

Zur Untersuchung des Organotropismus der SC35 und SC35F rekombinanten Viren wurden in dieser Arbeit neben den Lungen auch Gehirne der infizierten Mäuse entnommen (Kapitel 4.2.2). Nach einer Homogenisierung der Gehirne wurden die viralen Titer mittels Plaque Test im Überstand der Homogenisate detektiert. Die Ergebnisse (Abbildung 16) zeigen keine viralen Titer im Gehirn von BALB/c Mäusen nach einer Infektion mit dem WT Virus SC35. Hingegen konnte an Tag 6 p.i. Virus in Mausgehirnen nachgewiesen werden, die mit den Einzelgenreassortanten SC35-PB2_{SC35F} und SC35-HA_{SC35F} infiziert wurden. Eine der drei mit SC35-PB2_{SC35F} infizierten Mäuse wies einen Gehirntiter von $2,2 \log_{10}(\text{p.f.u./g})$ auf. Wohingegen der Virustiter in einer der drei SC35-HA_{SC35F} infizierten Mäuse eine leicht erhöhte Viruslast im Gehirn von $2,52 \log_{10}(\text{p.f.u./g})$ betrug. Interessanterweise konnte während der Untersuchungen der Einzelpunktmutanten festgestellt werden, dass an Tag 3 p.i. in zwei der drei infizierten Mäuse und an Tag 6 p.i. in einer der drei mit SC35-HA_{340R} infizierten Mäuse Virustiter im Gehirn nachgewiesen werden konnten. An Tag 3 p.i. betrug die Virustiter 2,7 bzw. $6,84 \log_{10}(\text{p.f.u./g})$, an Tag 6 p.i. war der Titer im Gehirn mit $2,63 \log_{10}(\text{p.f.u./g})$ leicht reduziert.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die SC35F-spezifischen Mutationen PB2_{H357N} und HA_{G340R} einen Einfluss auf den Organotropismus in infizierten Mäusen haben und zu einer systemischen Infektion führen. Nur in BALB/c Mäusen infiziert mit SC35F rekombinanten Viren mit den Mutationen in PB2_{H357N} und HA_{G340R} konnten virale Titer in Gehirnhomogenisaten detektiert werden. Daraus lässt sich schließen, dass diese Mutationen zu einer Änderung des Organotropismus in infizierten Mäusen beitragen. In einer anderen Studie konnte bereits zuvor gezeigt werden, dass in einem H5N1 Virus der aa Austausch an E222K im HA Protein eines H5N1 Virus die Ausbreitung des Virus in das Gehirn auslösen konnte (287). Zusammenfassen konnte gezeigt werden, dass nur durch die Einbringung der SC35F-spezifischen Mutationen im PB2 oder HA Protein systemische Infektionen in Form von viralen Titern im Gehirn in infizierten Mäusen ausgelöst wurden.

5.8. Infektion mit SC35 und SC35F rekombinanten Viren resultiert in einer erhöhten Lungeninfiltration durch Immunzellen

Neben den Virustitern in den Lungen von Mäusen, die mit den rekombinanten IAV infiziert waren, eröffnet die Lungenpathologie Einsicht in die Immunzellinfiltration sowie den Gewebetropismus des Virus. Zur Untersuchung der Infiltration der Lungen von BALB/c

Mäusen nach einer Infektion mit den rekombinanten SC35 und SC35F Viren wurden histopathologische Dünnschnitte der Mauslungen angefertigt. Diese Dünnschnitte wurden mittels HE und gegen das virale Antigen gefärbt (Kapitel 4.2.3). Die Schnitte zeigten, dass nach Infektion mit den in dieser Arbeit untersuchten H7 Viren generell die Immunezellinfiltration sowie das virale Antigen um die Bronchioli erhöht ist. Interessanterweise konnte in Mäusen, die mit SC35-HA_{SC35F} und SC35-HA_{340R} infiziert wurden, an Tag 6 p.i. nicht nur eine Immunezellinfiltration und Infektion um die Bronchioli, sondern zusätzlich im gesamten Alveolargewebe gezeigt werden (Abbildung 19). Die Infiltration der Lungen von Mäusen, die mit SC35-HA_{SC35F} und SC35-HA_{340R} infiziert waren, nimmt tendenziell von Tag 3 zu Tag 6 p.i. zu. Nur für diese beiden Viren konnte eine erhöhte Immunezellinfiltration sowie ein infiziertes Alveolargewebe an Tag 6 p.i. gezeigt werden. Da in den Untersuchungen zur Rezeptorspezifität keine Unterschiede in SC35 oder SC35F-spezifischen Viren festgestellt wurden, müssten zum besseren funktionalen Verständnis der veränderten Infiltration weitere Versuche durchgeführt werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass besonders die Bereiche um die Bronchioli der Mäuse Immunezellinfiltriert, sowie mit Virus infiziert sind. Zudem wurde in Mäusen infiziert mit SC35-HA_{SC35F} und SC35-HA_{340R} eine Infektion des Alveolargewebes an Tag 6 p.i. verzeichnet. Interessanterweise scheinen die Mutationen I111T und A146S im HA zu einer schnelleren Klärung des Virus aus den Lungen infizierter Mäuse beizutragen.

5.9. Erhöhte Kontakttransmission im Meerschweinchen durch SC35F-spezifische Mutationen PB1_{L13P} und HA_{I111T/A146S/G340R}

Durch den Erwerb von säugeradaptiven Mutationen können HPAIVs die Fähigkeit erlangen über Aerogene zu transmittieren (27, 28, 94, 103). Aerogentransmission beschreibt die Übertragung von Viren durch die Luft in Form von Tröpfchen oder Aerosolen, ohne eine genaue Größe der virushaltigen Flüssigkeitstropfen zu definieren. Dahingegen können Viren auch über Schmierinfektionen übertragen werden, was die Transmission durch direkten Kontakt beschreibt.

Zur Untersuchung der Transmission durch Aerogene oder direkten Kontakt wurden in dieser Arbeit weibliche Auszuchtstamm Hartley Meerschweinchen verwendet. Zuerst wurden die Donortiere mit einer Virusdosis von $5 \cdot 10^5$ p.f.u. der Einzelgenreassortanten sowie des parentalen SC35 Virus infiziert (Kapitel 4.3.1.1 und 4.3.1.2). Direkt nach der Infektion wurden die Sentinel-Meerschweinchen entweder direkt in den Käfig, oder in einen durch Gitter von den infizierten Tieren abgetrennten Käfig in den Versuch integriert. Die Ergebnisse der Nasenspülungen zeigen, dass von allen in dieser Arbeit getesteten rekombinanten SC35 und

SC35F Viren nur das SC35-PB1_{SC35F} und das SC35-HA_{SC35F} Virus über direkten Kontakt im Meerschweinchenmodell transmittieren konnten. Mit keiner der untersuchten Einzelgenreassortanten oder dem parentalen SC35 Virus konnte eine Aerogentransmission im Meerschweinchen festgestellt werden (Abbildung 20). Interessanterweise konnte für das SC35F-HA_{monobasisch} Virus keine Transmission, weder über Aerogene noch über direkten Kontakt, nachgewiesen werden. In diesem Virus wurde die multi-BCS entfernt, alle anderen SC35F-spezifischen Mutationen sind im viralen Genom enthalten. Die multi-BCS scheint in diesem H7N7 Virus in Bezug auf die Transmission durch direkten Kontakt eine entscheidende Rolle zu spielen. Dies konnte zudem durch eine reduzierte Replikation des SC35F-HA_{monobasisch} Virus im Zellsystem bei der Virusanzucht gezeigt werden. In den Studien um Tumpey und Kollegen wurde gefunden, dass schon zwei Mutationen im HA Protein (D225G und D190E) die Transmissionseigenschaften eines H1N1 Virus im Frettchenmodell herabsetzen können (288). Ebenfalls konnte unabhängig voneinander durch die zwei verschiedenen Gruppen um Fouchier und Kawaoka im Jahr 2012 ein Erwerb der Aerogentransmissibilität durch nur vier Mutationen im HA eines H5N1 HPAIV Virus im Frettchenmodell gezeigt werden (28, 103). Zum einen wurden die Mutationen HA_{H103Y}, HA_{T156A}, HA_{Q222L} und HA_{G224S} in Kombination, zum anderen die Mutationen HA_{N158D}, HA_{N224K}, HA_{Q226L} und HA_{T318I} in Kombination als essenziell für die Aerogentransmission von H5N1 Viren identifiziert (28, 103). Nach Alignments der beiden H5 HA Proteine, konnte gezeigt werden, dass es sich aufgrund der unterschiedlichen Nummerierung trotz allem bei der Q222L und Q226L Mutation um ein und dieselbe Mutation handelt. Interessanterweise ist diese Mutation an Position 222 bzw. 226 immer in Kombination mit einer zwei aa entfernten Mutation in der Lage die Binde-spezifität an α 2,3-verknüpfte in eine Präferenz an α 2,6-verknüpfte Sialinsäuren zu ändern. Eine Änderung der Bindepräferenz wird als Voraussetzung für die Aerogentransmission betrachtet (27, 28, 103). Hierbei handelt es sich um die Mutationen Q222L in Kombination mit G224S oder N224K in Kombination mit Q226L (28, 103).

Es konnte gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit gefundenen SC35F-spezifischen Mutationen nicht mit den Aminosäureaustauschen der beiden Publikationen übereinstimmen (28, 103). Interessanterweise war keines der rekombinanten SC35 und SC35F Viren in der Lage über Aerogene zu transmittieren. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass das SC35F Virus noch nicht komplett an das Frettchen adaptiert ist, was sich durch die fehlende Rezeptorbindespezifität für α 2,6-verknüpfte Sialinsäuren erklären ließe. Leider ist die Anzahl der durchgeführten Passagen zum Erhalt von SC35F nicht bekannt (249). Es wäre möglich, dass durch die Entstehung weiterer Mutationen (wie Q222L und G224S oder N224K und Q226L) im HA des Änderung der Rezeptorbindespezifität und somit der

Aerogentransmission ausgelöst würde, wie bereits zuvor in anderen Studien gezeigt werden konnte (28, 103). Eine Änderung der Rezeptorspezifität an α 2,6-verknüpfte Sialinsäuren könnte in einem HPAIV Virus eine neue IAV Pandemie mit unabsehbaren Folgen auslösen. Dies weist auf die Gefahr hin, die von säugeradaptierten H7 HPAIV ausgeht. Deshalb wurden alle HPAIV, die an α 2,6-verknüpfte Sialinsäuren binden oder auch nur im Verdacht stehen an α 2,6-verknüpfte Sialinsäuren binden könnten aufgrund von Biosicherheitsgründen als BSL-4 Pathogene eingestuft.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass bei keinem in dieser Arbeit getesteten rekombinanten H7N7 Viren Aerogentransmission beobachtet werden konnte. Allerdings erhöhten die SC35F-spezifischen Mutationen PB1_{L13P} oder HA_{1111T/A146S/G340R} im SC35 Hintergrund die Transmission durch direkten Kontakt.

5.10. SC35 und SC35F rekombinanten Viren replizieren präferenziell im oberen Respirationstrakt des Meerschweinchens

Zur Untersuchung des Tropismus der rekombinanten SC35 und SC35F Viren im Respirationstrakt des Meerschweinchens wurden die Trachea, sowie verschiedene Teile der Lunge infizierter Meerschweinchen an Tag 6 p.i. entnommen und untersucht (Kapitel 4.3.2).

Wie erwartet, wurden in keinem der mit SC35 WT oder SC35 und SC35F rekombinanten Viren infizierten Meerschweinchen klinische Symptome wie Fieber, Lethargie oder Gewichtsverlust beobachtet. Ein Fehlen von klinischen Symptomen nach H7N7 Infektion von Meerschweinchen konnte nicht vor der Versuchsdurchführung nicht antizipiert werden, da bisher noch keine experimentellen H7N7 HPAIV Infektionen und Transmissionsstudien in Hartley Meerschweinchen veröffentlicht wurden. Ähnliche Beobachtungen fehlender klinischer Anzeichen wurden bereits in Meerschweinchen nach Infektionen mit H5N1 LPAIV und HPAIV gezeigt (240, 289, 290).

Zur Kontrolle des Infektionsverlaufes in Donortieren, sowie zur Überprüfung einer Infektion der Sentineltiere, wurden Nasenspülungen an den Meerschweinchen durchgeführt. In den an Tag 1, 3, 6 und 9 p.i. durchgeführten Nasenspülungen konnten hohe virale Titer detektiert werden, wobei durchschnittlich die höchsten viralen Titer an Tag 6 p.i. gemessen wurden. Aufgrund der höchsten Virusdosis an Tag 6 p.i. wurde dieser Tag zur Untersuchung der viralen Titer in Trachea und Lunge gewählt. Allerdings konnte nur in einem mit SC35-PB1_{13P} infizierten Meerschweinchen und nur im rechten oberen Lungenabschnitt dieses Tieres virale, infektiöse Partikel nachgewiesen werden. Alle anderen untersuchten Teile der Lunge, sowie die Trachea dieses Meerschweinchens waren virusnegativ. Ebenfalls war nach

Infektion mit den anderen rekombinanten SC35 und SC35F Viren in keinem anderen Meerschweinchen Virus in der Trachea und der Lunge nachweisbar.

Meerschweinchen exprimieren im oberen Respirationstrakt sowohl α 2,3-verknüpfte als auch α 2,6-verknüpfte Sialinsäuren im Nasaltrakt sowie in der Trachea (291). Im Gegensatz dazu werden in der Lunge von Meerschweinchen, d.h. dem unteren Respirationstrakt, hauptsächlich α 2,6-verknüpfte Sialinsäuren exprimiert (291). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das SC35 parentale Virus, sowie die SC35 und SC35F rekombinanten Viren, ausschließlich an α 2,3-gebundene Sialinsäuren binden (Tabelle 5). Da α 2,3-verknüpfte Sialinsäuren nur zu geringen Mengen in der Lunge des Meerschweinchens exprimiert werden, könnten die fehlenden Virustiter in der Lunge durch die geringe Menge an Rezeptoren für das Virus erklärt werden. Zudem ist möglich, dass der Entnahmezeitpunkt der Organe zu spät war. In den Gruppen um Lowen und Sun konnte bereits zuvor für andere IAV Subtypen gezeigt werden, dass in die viralen Titer in Lunge und Trachea niedriger als im Nasen-/Rachenraum sind und dass das Virus schneller aus der Lunge sowie der Trachea geklärt wird. Es konnte gezeigt werden, dass eine Virus *clearance* in diesen Organen der infizierten Meerschweinchen meist bis Tag 5 p.i. stattfindet (231, 291). Zur vollständigen Untersuchung des Tropismus der rekombinanten SC35 und SC35F Viren im Respirationstrakt des Meerschweinchens müssten weitere Entnahmen der Trachea und der Lunge an Tag 1 und Tag 3 p.i. erfolgen. Hierdurch könnte festgestellt werden, ob die SC35 und SC35F rekombinanten Viren in der Trachea und in der Lunge von Meerschweinchen replizieren können. Des Weiteren könnten im Meerschweinchen, wie bereits für Frettchengewebe beschrieben, Bindungsstudien der rekombinanten SC35 und SC35F Viren an Gewebesektionen der Nasenmuschel, der Bronchien und des Alveolargewebes durchgeführt werden (260). Durch diese Untersuchungen könnte eine genauere Aussage zum Gewebetropismus der in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Viren getroffen werden. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die rekombinanten SC35 und SC35F Viren zwar effizient bis Tag 6 p.i. im Nasaltrakt infizierter Meerschweinchen replizieren können. An Tag 6 p.i. konnte jedoch kein Virus in der Trachea oder in der Lunge infizierter Meerschweinchen nachgewiesen werden, was auf eine schnellere Klärung der Viren oder eine nicht effiziente Replikation im unteren Respirationstrakt hinweisen könnte.

6. Zusammenfassung

Hochpathogene aviäre Influenzaviren (HPAIV) können aus ihrem natürlichen Reservoir, den Wasservögeln, durch Interspeziesübertragung auf den Säuger übertragen werden und dort milde bis letale Infektionen hervorrufen. Bis heute sind die molekularen Mechanismen der Adaptation und Transmission von HPAIV jedoch weitestgehend unbekannt. Um während der Adaptation von HPAIV an den Säuger für diese wichtige virale Determinanten zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit ein fretchenadaptiertes H7N7 HPAIV (SC35F) als Modellsystem verwendet (249).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich das parentale, nicht-säugeradaptierte H7N7 HPAIV SC35 von dessen fretchenadaptierter Virusvariante SC35F in sechs Aminosäuren unterscheidet. Diese SC35F-spezifischen Mutationen kommen in den viralen Polymeraseproteinen sowie den Oberflächenglykoproteinen des Virus vor (PB2_{H357N}, PB1_{L13P}, HA_{I111T}, HA_{A146S}, HA_{G340R} und NA_{A328S}). Die SC35F-spezifische PB2_{H357N} Mutation, sowie diese in Kombination mit PB1_{L13P} führten zu einer erhöhten Polymeraseaktivität von SC35F im Vergleich zu SC35 in einer humanen Zelllinie. Im Gegensatz dazu lösten die SC35F-spezifischen Mutationen im Hämagglutinin (HA) HA_{I111T}, HA_{A146S} und HA_{G340R} keine Veränderungen hinsichtlich der Rezeptorbindung an aviäre α 2,3- bzw. humane α 2,6-verknüpfte Sialinsäuren aus. Auch die SC35F-spezifische Mutation NA_{A328S} in der Neuraminidase (NA) hatte keinen Einfluss auf die virale Neuraminidaseaktivität.

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass nur die SC35F-spezifischen Mutationen HA_{I111T}, HA_{A146S} und HA_{G340R} im genomischen SC35 Hintergrund die Virulenz erhöhen. Die höchste Virulenz wurde in Mäusen, die mit SC35-HA_{SC35F} infiziert waren, nachgewiesen. Das SC35-HA_{SC35F} Virus trägt die drei SC35F-HA Mutationen (HA_{I111T}, HA_{A146S} und HA_{G340R}) in Kombination. Die Virulenz dieses SC35-HA_{SC35F} Virus war im Vergleich zum parentalen SC35 Virus etwa 18.000-fach erhöht.

Des Weiteren wurden in dieser Arbeit die SC35F-spezifischen Mutationen hinsichtlich ihres Beitrags zur Kontakt- und Aerogenübertragbarkeit des H7N7 HPAIV im Meerschweinchenmodell untersucht. Die SC35F-HA Mutationen (HA_{I111T}, HA_{A146S} und HA_{G340R}) in Kombination, sowie die PB1_{L13P} Mutation im PB1 im SC35 HPAIV Hintergrund waren jeweils in der Lage die Kontakttransmission von Meerschweinchen-zu-Meerschweinchen zu vermitteln. Die Kontakttransmission des SC35-PB1_{SC35F} HPAIV betrug

Zusammenfassung

etwa 17 % im Vergleich zum parentalen SC35 HPAIV mit 0%. Dagegen wurde das SC35-HA_{SC35F} HPAIV relativ erfolgreich in 50 % der Fälle über direkten Kontakt von Meerschweinchen-zu-Meerschweinchen transmittiert. Keine der untersuchten SC35F-spezifischen Mutationen konnte die Transmission durch Aerogene im Meerschweinchenmodell vermitteln.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit erfolgreich säugeradaptive Mutationen identifiziert und charakterisiert werden, welche die Virulenz und Kontakttransmission von H7N7 HPAIV in Kleintiermodellen vermitteln. Die adaptive Mutation PB2_{H357N} und die beiden SC35F-spezifischen Mutationen PB2_{H357N} und PB1_{L13P} führten zu einer erhöhten Polymeraseaktivität in humanen Zellen. Die PB1_{L13P} Mutation trug ebenfalls zu einer erhöhten H7N7 HPAIV Kontakttransmission im Meerschweinchen bei, ohne jedoch die MLD₅₀ im Mausmodell zu beeinflussen. Dagegen führten die adaptiven Mutationen im HA sowohl zu einer erhöhten Virulenz in der Maus, als auch zu einer verbesserten Transmission im Meerschweinchen durch direkten Kontakt. Diese Befunde sind besonders wichtig, um eine mögliche epidemische bzw. pandemische Gefahr für die humane Bevölkerung ausgehend von neuauftretenden HPAIV besser abzuschätzen, so dass entsprechende Gegenmaßnahmen rasch eingeleitet werden können.

7. Summary

The natural reservoir of highly pathogenic avian influenza viruses (HPAIV) are wild and aquatic birds. Occasionally, interspecies transmission from birds to mammals can occur leading to disease in mammals of various severity. However, the molecular mechanisms involved in H7N7 HPAIV pathogenicity in mammals as well as those required for both adaptation and transmission in the mammalian host remain largely unknown. To investigate viral determinants during adaptation of HPAIV to mammals, in this thesis, a ferret-adapted H7N7 HPAIV (SC35F) was used as a model system (249).

Here, six amino acid mutations in the ferret-adapted virus variant SC35F in comparison to the parental non-mammalian adapted virus SC35 were identified. These SC35F-specific mutations are located in the viral polymerase and in the viral glycosurface proteins (PB2_{H357N}, PB1_{L13P}, HA_{I111T}, HA_{A146S}, HA_{G340R} and NA_{A328S}).

The SC35F-specific mutation PB2_{H357N} alone and in combination with PB1_{L13P} significantly increases viral polymerase activity in human cells. In contrast, the presence of the three SC35F-specific mutations HA_{I111T}, HA_{A146S} and HA_{G340R} in the hemagglutinin (HA) did not alter the HA binding specificity in terms of receptor binding to avian α 2,3- or human α 2,6-linked sialic acids. Similarly, the SC35F-specific NA_{A328S} mutation in the neuraminidase (NA) had no influence on the NA activity.

Further, it could be shown that only the SC35F-specific mutations HA_{I111T}, HA_{A146S} and HA_{G340R} in the SC35 genomic background mediate increased virulence in mice. The highest virulence was detected in mice infected with the SC35-HA_{SC35F} virus. This virus contains the three SC35F-HA mutations (HA_{I111T}, HA_{A146S}, and HA_{G340R}) in combination. In comparison to the parental SC35 virus, virulence of the SC35-HA_{SC35F} virus was about 18,000-fold increased.

Additionally, the contribution of the SC35F-specific mutations to contact and airborne transmissibility in a guinea pig model was investigated. The SC35F-HA mutations (HA_{I111T}, HA_{A146S} and HA_{G340R}) in combination, as well as the PB1_{L13P} mutation in the SC35 HPAIV genomic background were able to mediate contact transmission in guinea pigs. The rate of contact transmission of the SC35-PB1_{SC35F} HPAIV was about 17 % in comparison to the parental SC35 HPAIV with 0 %. However, the SC35-HA_{SC35F} HPAIV was transmitted efficiently with a rate of 50 % from guinea pig to guinea pig by direct contact. None of the

Summary

here investigated SC35F-specific mutations were able to mediate airborne transmission in the guinea pig model.

In summary, in this thesis, mammalian adaptive mutations that mediate virulence and contact transmission of H7N7 HPAIV in small animal models were successfully identified and characterized. The adaptive mutation PB2_{H357N} and the two SC35F-specific mutations PB2_{H357N} and PB1_{L13P} enhanced viral polymerase activity in human cells. The PB1_{L13P} mutation increased H7N7 HPAIV contact transmission in guinea pigs without affecting the MLD₅₀ in mice. In contrast, the adaptive mutations in HA increased virulence in mice and contact transmission in guinea pigs. These findings are especially important for the assessment of a potential epidemic and pandemic threat for humans arising from newly emerging H7N7 HPAIV. Furthermore, this knowledge will be key for the planning of countermeasures.

8. Literaturverzeichnis

1. Presti RM, *et al.* (2009) Quarantil, Johnston Atoll, and Lake Chad viruses are novel members of the family Orthomyxoviridae. *J Virol* 83(22):11599-11606.
2. Hause BM, *et al.* (2014) Characterization of a novel influenza virus in cattle and Swine: proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family. *MBio* 5(2):e00031-00014.
3. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, & Kawaoka Y (1992) Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 56(1):152-179.
4. Tong S, *et al.* (2012) A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(11):4269-4274.
5. Tong S, *et al.* (2013) New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog* 9(10):e1003657.
6. Knipe DMH, Peter M. (2007) *Fields Virology, Fifth Edition.*
7. Nelson MI & Holmes EC (2007) The evolution of epidemic influenza. *Nat Rev Genet* 8(3):196-205.
8. Jagger BW, *et al.* (2012) An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science* 337(6091):199-204.
9. Yamayoshi S, Watanabe M, Goto H, & Kawaoka Y (2016) Identification of a Novel Viral Protein Expressed from the PB2 Segment of Influenza A Virus. *J Virol* 90(1):444-456.
10. Chen W, *et al.* (2001) A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med* 7(12):1306-1312.
11. Modrow SF, D.; Truyen, U.; Schätzl, H. (2010) *Molekulare Virologie.*
12. Bouvier NM & Palese P (2008) The biology of influenza viruses. *Vaccine* 26 Suppl 4:D49-53.
13. Dias A, *et al.* (2009) The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature* 458(7240):914-918.
14. Wise HM, *et al.* (2012) Identification of a novel splice variant form of the influenza A virus M2 ion channel with an antigenically distinct ectodomain. *PLoS Pathog* 8(11):e1002998.
15. Tauber S, Ligertwood Y, Quigg-Nicol M, Dutia BM, & Elliott RM (2012) Behaviour of influenza A viruses differentially expressing segment 2 gene products in vitro and in vivo. *J Gen Virol* 93(Pt 4):840-849.
16. Selman M, Dankar SK, Forbes NE, Jia JJ, & Brown EG (2012) Adaptive mutation in influenza A virus non-structural gene is linked to host switching and induces a novel protein by alternative splicing. *Emerg Microbes Infect* 1(11):e42.
17. Muramoto Y, Noda T, Kawakami E, Akkina R, & Kawaoka Y (2013) Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA. *J Virol* 87(5):2455-2462.
18. Gen U-M-M (2013; Zugriff am 28.06.2016) <http://www.uniprot.org/uniprot/R4ISK0>.
19. Gen U-N-N (2013; Zugriff am 28.06.2016) <http://www.uniprot.org/uniprot/K4J371>.
20. Flick R & Hobom G (1999) Interaction of influenza virus polymerase with viral RNA in the 'corkscrew' conformation. *J Gen Virol* 80 (Pt 10):2565-2572.
21. Naffakh N, Tomoiu A, Rameix-Welti MA, & van der Werf S (2008) Host restriction of avian influenza viruses at the level of the ribonucleoproteins. *Annu Rev Microbiol* 62:403-424.
22. Arranz R, *et al.* (2012) The structure of native influenza virion ribonucleoproteins. *Science* 338(6114):1634-1637.
23. Moeller A, Kirchdoerfer RN, Potter CS, Carragher B, & Wilson IA (2012) Organization of the influenza virus replication machinery. *Science* 338(6114):1631-1634.
24. Klumpp K, Ruigrok RW, & Baudin F (1997) Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure. *EMBO J* 16(6):1248-1257.
25. Resa-Infante P & Gabriel G (2013) The nuclear import machinery is a determinant of influenza virus host adaptation. *Bioessays* 35(1):23-27.
26. Lamb RA & Choppin PW (1981) Identification of a second protein (M2) encoded by RNA segment 7 of influenza virus. *Virology* 112(2):729-737.
27. Horimoto T & Kawaoka Y (2005) Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nat Rev Microbiol* 3(8):591-600.
28. Herfst S, *et al.* (2012) Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. *Science* 336(6088):1534-1541.
29. Neumann G, Noda T, & Kawaoka Y (2009) Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* 459(7249):931-939.

30. Karlas A, *et al.* (2010) Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature* 463(7282):818-822.
31. Konig R, *et al.* (2010) Human host factors required for influenza virus replication. *Nature* 463(7282):813-817.
32. Meliopoulos VA, *et al.* (2012) Host gene targets for novel influenza therapies elucidated by high-throughput RNA interference screens. *FASEB J* 26(4):1372-1386.
33. Shi Y, Wu Y, Zhang W, Qi J, & Gao GF (2014) Enabling the 'host jump': structural determinants of receptor-binding specificity in influenza A viruses. *Nat Rev Microbiol* 12(12):822-831.
34. Chu VC & Whittaker GR (2004) Influenza virus entry and infection require host cell N-linked glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(52):18153-18158.
35. de Vries E, *et al.* (2012) Influenza A virus entry into cells lacking sialylated N-glycans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(19):7457-7462.
36. Nicholls JML, J.; Garcia; J.-M. (2012) *Influenza Virus Sialidase - A Drug Discovery Target* (Springer Basel) p 178.
37. Lakadamyali M, Rust MJ, & Zhuang X (2004) Endocytosis of influenza viruses. *Microbes Infect* 6(10):929-936.
38. Sun X & Whittaker GR (2013) Entry of influenza virus. *Adv Exp Med Biol* 790:72-82.
39. Compans RWO, M. B. A. (Ed.) (2014) *Influenza Pathogenesis and Control* (Springer).
40. Grove J & Marsh M (2011) The cell biology of receptor-mediated virus entry. *J Cell Biol* 195(7):1071-1082.
41. Mellman I, Fuchs R, & Helenius A (1986) Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu Rev Biochem* 55:663-700.
42. Cain CC, Sipe DM, & Murphy RF (1989) Regulation of endocytic pH by the Na⁺,K⁺-ATPase in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(2):544-548.
43. Cross KJ, Burleigh LM, & Steinhauer DA (2001) Mechanisms of cell entry by influenza virus. *Expert Rev Mol Med* 3(21):1-18.
44. Klenk HD, Rott R, Orlich M, & Blodorn J (1975) Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology* 68(2):426-439.
45. Helenius A (1992) Unpacking the incoming influenza virus. *Cell* 69(4):577-578.
46. Hay AJ, Wolstenholme AJ, Skehel JJ, & Smith MH (1985) The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *EMBO J* 4(11):3021-3024.
47. Whittaker GR, Kann M, & Helenius A (2000) Viral entry into the nucleus. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:627-651.
48. Cros JF, Garcia-Sastre A, & Palese P (2005) An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein. *Traffic* 6(3):205-213.
49. Mattaj JW & Englmeier L (1998) Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu Rev Biochem* 67:265-306.
50. Krug RM (1981) Priming of influenza viral RNA transcription by capped heterologous RNAs. *Curr Top Microbiol Immunol* 93:125-149.
51. Boivin S, Cusack S, Ruigrok RW, & Hart DJ (2010) Influenza A virus polymerase: structural insights into replication and host adaptation mechanisms. *J Biol Chem* 285(37):28411-28417.
52. Resa-Infante P, Jorba N, Coloma R, & Ortin J (2011) The influenza virus RNA synthesis machine: advances in its structure and function. *RNA Biol* 8(2):207-215.
53. Deng T, Sharps J, Fodor E, & Brownlee GG (2005) In vitro assembly of PB2 with a PB1-PA dimer supports a new model of assembly of influenza A virus polymerase subunits into a functional trimeric complex. *J Virol* 79(13):8669-8674.
54. Hutchinson EC & Fodor E (2012) Nuclear import of the influenza A virus transcriptional machinery. *Vaccine* 30(51):7353-7358.
55. Hutchinson EC, Orr OE, Man Liu S, Engelhardt OG, & Fodor E (2011) Characterization of the interaction between the influenza A virus polymerase subunit PB1 and the host nuclear import factor Ran-binding protein 5. *J Gen Virol* 92(Pt 8):1859-1869.
56. Gabriel G, Herwig A, & Klenk HD (2008) Interaction of polymerase subunit PB2 and NP with importin alpha1 is a determinant of host range of influenza A virus. *PLoS Pathog* 4(2):e11.
57. Tarendeau F, *et al.* (2007) Structure and nuclear import function of the C-terminal domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *Nat Struct Mol Biol* 14(3):229-233.
58. Rossman JS & Lamb RA (2011) Influenza virus assembly and budding. *Virology* 411(2):229-236.

59. Das K, Aramini JM, Ma LC, Krug RM, & Arnold E (2010) Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets. *Nat Struct Mol Biol* 17(5):530-538.
60. Palese P & Compans RW (1976) Inhibition of influenza virus replication in tissue culture by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA): mechanism of action. *J Gen Virol* 33(1):159-163.
61. Stallknecht DE & Shane SM (1988) Host range of avian influenza virus in free-living birds. *Vet Res Commun* 12(2-3):125-141.
62. Webster RG, Yakhno M, Hinshaw VS, Bean WJ, & Murti KG (1978) Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology* 84(2):268-278.
63. Kida H, Yanagawa R, & Matsuoka Y (1980) Duck influenza lacking evidence of disease signs and immune response. *Infect Immun* 30(2):547-553.
64. Hinshaw VS, Webster RG, & Turner B (1979) Water-bone transmission of influenza A viruses? *Intervirology* 11(1):66-68.
65. Ito T, *et al.* (1995) Perpetuation of influenza A viruses in Alaskan waterfowl reservoirs. *Arch Virol* 140(7):1163-1172.
66. Ellstrom P, *et al.* (2008) Sampling for low-pathogenic avian influenza A virus in wild Mallard ducks: oropharyngeal versus cloacal swabbing. *Vaccine* 26(35):4414-4416.
67. Gorman OT, *et al.* (1991) Evolution of influenza A virus nucleoprotein genes: implications for the origins of H1N1 human and classical swine viruses. *J Virol* 65(7):3704-3714.
68. Nidom CA, *et al.* (2010) Influenza A (H5N1) viruses from pigs, Indonesia. *Emerg Infect Dis* 16(10):1515-1523.
69. Huang Y, *et al.* (2015) Human infection with an avian influenza A (H9N2) virus in the middle region of China. *J Med Virol* 87(10):1641-1648.
70. Krog JS, *et al.* (2015) Influenza A(H10N7) virus in dead harbor seals, Denmark. *Emerg Infect Dis* 21(4):684-687.
71. Fereidouni S, Munoz O, Von Dobschuetz S, & De Nardi M (2016) Influenza Virus Infection of Marine Mammals. *Ecohealth* 13(1):161-170.
72. NCBI - Abdel-Moneim AS, Shehab,G.M. and Abu-Elsaad,A.S. (2011; Zugriff am 30.06.2016) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ADO14369.1>.
73. CDC (2014; Zugriff am 30.06.2016) <http://www.cdc.gov/flu/about/viruses/transmission.htm>.
74. Chen H, *et al.* (2014) Clinical and epidemiological characteristics of a fatal case of avian influenza A H10N8 virus infection: a descriptive study. *Lancet* 383(9918):714-721.
75. Wahlgren J (2011) Influenza A viruses: an ecology review. *Infect Ecol Epidemiol* 1.
76. Parrish CR, Murcia PR, & Holmes EC (2015) Influenza virus reservoirs and intermediate hosts: dogs, horses, and new possibilities for influenza virus exposure of humans. *J Virol* 89(6):2990-2994.
77. Steinhauer DA & Holland JJ (1987) Rapid evolution of RNA viruses. *Annu Rev Microbiol* 41:409-433.
78. Holland J, *et al.* (1982) Rapid evolution of RNA genomes. *Science* 215(4540):1577-1585.
79. Drake JW & Holland JJ (1999) Mutation rates among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(24):13910-13913.
80. Belser JA, Szretter KJ, Katz JM, & Tumpey TM (2009) Use of animal models to understand the pandemic potential of highly pathogenic avian influenza viruses. *Adv Virus Res* 73:55-97.
81. Ma W, Kahn RE, & Richt JA (2008) The pig as a mixing vessel for influenza viruses: Human and veterinary implications. *J Mol Genet Med* 3(1):158-166.
82. Capua I TC (2009) *Clinical traits and pathology of avian influenza infections, guidelines for farm visit and differential diagnosis*. (Springer, Milan) Avian influenza and newcastle disease—a field and laboratory manual, 3rd edn. Ed.
83. Swayne D, Suarez, D.L., Sims, L.D. (2013) *Influenza - Diseases of poultry*. (Wiley, Ames) 13th edn Ed.
84. Pasick J, *et al.* (2007) Susceptibility of Canada Geese (*Branta canadensis*) to highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). *Emerg Infect Dis* 13(12):1821-1827.
85. Maurer-Stroh S, Lee RT, Gunalan V, & Eisenhaber F (2013) The highly pathogenic H7N3 avian influenza strain from July 2012 in Mexico acquired an extended cleavage site through recombination with host 28S rRNA. *Virology* 453(1):10-19.
86. Pasick J, *et al.* (2005) Intersegmental recombination between the haemagglutinin and matrix genes was responsible for the emergence of a highly pathogenic H7N3 avian influenza virus in British Columbia. *J Gen Virol* 86(Pt 3):727-731.

87. Suarez DL, *et al.* (2004) Recombination resulting in virulence shift in avian influenza outbreak, Chile. *Emerg Infect Dis* 10(4):693-699.
88. Khatchikian D, Orlich M, & Rott R (1989) Increased viral pathogenicity after insertion of a 28S ribosomal RNA sequence into the haemagglutinin gene of an influenza virus. *Nature* 340(6229):156-157.
89. Orlich M, Gottwald H, & Rott R (1994) Nonhomologous recombination between the hemagglutinin gene and the nucleoprotein gene of an influenza virus. *Virology* 204(1):462-465.
90. Garcia M, Crawford JM, Latimer JW, Rivera-Cruz E, & Perdue ML (1996) Heterogeneity in the haemagglutinin gene and emergence of the highly pathogenic phenotype among recent H5N2 avian influenza viruses from Mexico. *J Gen Virol* 77 (Pt 7):1493-1504.
91. Horimoto T, *et al.* (1995) Origin and molecular changes associated with emergence of a highly pathogenic H5N2 influenza virus in Mexico. *Virology* 213(1):223-230.
92. Perdue ML, Garcia M, Senne D, & Fraire M (1997) Virulence-associated sequence duplication at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses. *Virus Res* 49(2):173-186.
93. Banks J, *et al.* (2001) Changes in the haemagglutinin and the neuraminidase genes prior to the emergence of highly pathogenic H7N1 avian influenza viruses in Italy. *Arch Virol* 146(5):963-973.
94. Belser JA, Bridges CB, Katz JM, & Tumpey TM (2009) Past, present, and possible future human infection with influenza virus A subtype H7. *Emerg Infect Dis* 15(6):859-865.
95. Jeong OM, *et al.* (2009) Experimental infection of chickens, ducks and quails with the highly pathogenic H5N1 avian influenza virus. *J Vet Sci* 10(1):53-60.
96. Gilsdorf A, *et al.* (2006) Two clusters of human infection with influenza A/H5N1 virus in the Republic of Azerbaijan, February-March 2006. *Euro Surveill* 11(5):122-126.
97. Subbarao K, *et al.* (1998) Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* 279(5349):393-396.
98. Horimoto T & Kawaoka Y (2001) Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. *Clin Microbiol Rev* 14(1):129-149.
99. Fouchier RA, *et al.* (2004) Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(5):1356-1361.
100. Taubenberger JK & Morens DM (2008) The pathology of influenza virus infections. *Annu Rev Pathol* 3:499-522.
101. Claas EC, de Jong JC, van Beek R, Rimmelzwaan GF, & Osterhaus AD (1998) Human influenza virus A/HongKong/156/97 (H5N1) infection. *Vaccine* 16(9-10):977-978.
102. WHO (2016; Zugriff am 01.07.2016) Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A(H5N1) reported to WHO, 2003-2016.
103. Imai M, *et al.* (2012) Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature* 486(7403):420-428.
104. Bouvier NM & Lowen AC (2010) Animal Models for Influenza Virus Pathogenesis and Transmission. *Viruses* 2(8):1530-1563.
105. Yu H, *et al.* (2013) Human infection with avian influenza A H7N9 virus: an assessment of clinical severity. *Lancet* 382(9887):138-145.
106. Kreijtz JH, *et al.* (2013) Low pathogenic avian influenza A(H7N9) virus causes high mortality in ferrets upon intratracheal challenge: a model to study intervention strategies. *Vaccine* 31(43):4995-4999.
107. Mail P (2016; Zugriff am 12.07.2016) H7N9, June 2016; <http://www.promedmail.org/?archiveid=20120506.1124681>.
108. Liu J, *et al.* (2014) H7N9: a low pathogenic avian influenza A virus infecting humans. *Curr Opin Virol* 5:91-97.
109. WHO (2013; Zugriff am 08.09.2016) Overview of the emergence and characteristics of the avian influenza A(H7N9) virus.
110. WHO (2014; Zugriff am 01.07.2016) Jährliche Todesfälle Influenza; <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>.
111. WHO (2014; Zugriff am 01.07.2016) Saisonale Influenza; <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>.
112. Lowen AC, Mubareka S, Steel J, & Palese P (2007) Influenza virus transmission is dependent on relative humidity and temperature. *PLoS Pathog* 3(10):1470-1476.

113. Cauchemez S, Valleron AJ, Boelle PY, Flahault A, & Ferguson NM (2008) Estimating the impact of school closure on influenza transmission from Sentinel data. *Nature* 452(7188):750-754.
114. Shaman J & Kohn M (2009) Absolute humidity modulates influenza survival, transmission, and seasonality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(9):3243-3248.
115. Tamerius JD, et al. (2013) Environmental predictors of seasonal influenza epidemics across temperate and tropical climates. *PLoS Pathog* 9(3):e1003194.
116. Lowen AC & Steel J (2014) Roles of humidity and temperature in shaping influenza seasonality. *J Virol* 88(14):7692-7695.
117. Soebiyanto RP, et al. (2014) The role of temperature and humidity on seasonal influenza in tropical areas: Guatemala, El Salvador and Panama, 2008-2013. *PLoS One* 9(6):e100659.
118. Welt (2015; Zugriff am 01.07.2016) <http://www.welt.de/wirtschaft/article138039867/Grippewelle-kostet-deutsche-Wirtschaft-2-2-Milliarden.html>.
119. Johnson NP & Mueller J (2002) Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic. *Bull Hist Med* 76(1):105-115.
120. Simonsen L, et al. (1998) Pandemic versus epidemic influenza mortality: a pattern of changing age distribution. *J Infect Dis* 178(1):53-60.
121. Kobasa D, et al. (2007) Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus. *Nature* 445(7125):319-323.
122. Morens DM, Taubenberger JK, & Fauci AS (2008) Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *J Infect Dis* 198(7):962-970.
123. Aminov RI (2010) A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front Microbiol* 1:134.
124. Smith GJ, et al. (2009) Dating the emergence of pandemic influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(28):11709-11712.
125. Reid AH, Taubenberger JK, & Fanning TG (2004) Evidence of an absence: the genetic origins of the 1918 pandemic influenza virus. *Nat Rev Microbiol* 2(11):909-914.
126. Reid AH, Fanning TG, Hultin JV, & Taubenberger JK (1999) Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus hemagglutinin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(4):1651-1656.
127. Taubenberger JK (2006) The origin and virulence of the 1918 "Spanish" influenza virus. *Proc Am Philos Soc* 150(1):86-112.
128. Taubenberger JK & Morens DM (2010) Influenza: the once and future pandemic. *Public Health Rep* 125 Suppl 3:16-26.
129. Jennings LC, Monto AS, Chan PK, Szucs TD, & Nicholson KG (2008) Stockpiling prepandemic influenza vaccines: a new cornerstone of pandemic preparedness plans. *Lancet Infect Dis* 8(10):650-658.
130. Fraser C, et al. (2009) Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early findings. *Science* 324(5934):1557-1561.
131. WHO (2009; Zugriff am 01.07.2016) 2009 pH1N1 - Weekly epidemiological record, July 24th 2009; <http://www.who.int/wer/2009/wer8430/en/>.
132. Vaillant L, La Ruche G, Tarantola A, Barboza P, & epidemic intelligence team at In VS (2009) Epidemiology of fatal cases associated with pandemic H1N1 influenza 2009. *Euro Surveill* 14(33).
133. WHO (2010; Zugriff am 01.07.2016) Pandemic (H1N1) 2009 - update 112; http://www.who.int/csr/don/2010_08_06/en/.
134. Dawood FS, et al. (2012) Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study. *Lancet Infect Dis* 12(9):687-695.
135. WHO (2010; Zugriff am 01.07.2016) H1N1 in post-pandemic period; http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2010/h1n1_vpc_20100810/en/.
136. Su YC, et al. (2015) Phylodynamics of H1N1/2009 influenza reveals the transition from host adaptation to immune-driven selection. *Nat Commun* 6:7952.
137. WHO (2016; Zugriff am 02.07.2016) Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A(H5N1) reported to WHO; http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/H5N1_cumulative_table_archives/en/.

138. Lin YP, *et al.* (2000) Avian-to-human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses: relationship between H9N2 and H5N1 human isolates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(17):9654-9658.
139. MacMahon KL, *et al.* (2008) Protecting poultry workers from exposure to avian influenza viruses. *Public Health Rep* 123(3):316-322.
140. Du L, Li Y, Gao J, Zhou Y, & Jiang S (2012) Potential strategies and biosafety protocols used for dual-use research on highly pathogenic influenza viruses. *Rev Med Virol* 22(6):412-419.
141. Anonymous (2012) Avian influenza and the dual-use research debate. *Lancet Infect Dis* 12(3):167.
142. Webster RG (2012) Mammalian-transmissible H5N1 influenza: the dilemma of dual-use research. *MBio* 3(1).
143. Hunter P (2012) H5N1 infects the biosecurity debate. Governments and life scientists are waking up to the problem of dual-use research. *EMBO Rep* 13(7):604-607.
144. Fauci AS & Collins FS (2012) Benefits and risks of influenza research: lessons learned. *Science* 336(6088):1522-1523.
145. Kuehn BM (2012) International debate erupts over research on potentially dangerous bird flu strains. *JAMA* 307(10):1009, 1011-1002.
146. Kawaoka Y (2012) H5N1: Flu transmission work is urgent. *Nature* 482(7384):155.
147. Lessler J, *et al.* (2009) Incubation periods of acute respiratory viral infections: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 9(5):291-300.
148. Cox NJ & Fukuda K (1998) Influenza. *Infect Dis Clin North Am* 12(1):27-38.
149. Moser MR, *et al.* (1979) An outbreak of influenza aboard a commercial airliner. *Am J Epidemiol* 110(1):1-6.
150. Cate TR (1987) Clinical manifestations and consequences of influenza. *Am J Med* 82(6A):15-19.
151. Likos AM, *et al.* (2007) Influenza viremia and the potential for blood-borne transmission. *Transfusion* 47(6):1080-1088.
152. Beigel JH, *et al.* (2005) Avian influenza A (H5N1) infection in humans. *N Engl J Med* 353(13):1374-1385.
153. de Jong MD, *et al.* (2006) Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med* 12(10):1203-1207.
154. Liu Q, Zhou YH, & Yang ZQ (2016) The cytokine storm of severe influenza and development of immunomodulatory therapy. *Cell Mol Immunol* 13(1):3-10.
155. Osterholm MT (2005) Preparing for the next pandemic. *Foreign Aff* 84(4):24-+.
156. Metersky ML, Masterton RG, Lode H, File TM, Jr., & Babinchak T (2012) Epidemiology, microbiology, and treatment considerations for bacterial pneumonia complicating influenza. *Int J Infect Dis* 16(5):e321-331.
157. Wang GF, Li W, & Li K (2010) Acute encephalopathy and encephalitis caused by influenza virus infection. *Curr Opin Neurol* 23(3):305-311.
158. Tsai JP & Baker AJ (2013) Influenza-associated neurological complications. *Neurocrit Care* 18(1):118-130.
159. Halpin TJ, *et al.* (1982) Reye's syndrome and medication use. *JAMA* 248(6):687-691.
160. Middleton PJ, Alexander RM, & Szymanski MT (1970) Severe myositis during recovery from influenza. *Lancet* 2(7672):533-535.
161. Finland M, Parker F, Barnes M, & Joliffe L (1945) Acute Myocarditis in Influenza A Infections *The American Journal of the Medical Sciences* (4):455-468.
162. WHO (2005; Zugriff am 28.11.2016) WHO recommendations on the use of rapid testing for influenza diagnosis.
163. WHO (2014; Zugriff am 12.07.2016) WHO surveillance case definitions for ILI and SARI; http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/ili_sari_surveillance_case_definition/en/.
164. GmbH MH (2015; Zugriff am 01.07.2016) Fachinformation, Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels, Influvac® Saison 2015/2016.
165. MSD SP (2015; Zugriff am 12.07.2016) VAXIGRIP® 2015/2016.
166. RKI (2015; Zugriff am 01.07.2016) Saisonale Influenzaimpfung: Häufig gestellte Fragen und Antworten.
167. CDC (2016; Zugriff am 09.09.2016) What You Should Know About Flu Antiviral Drugs. (CDC).
168. Wang C, Takeuchi K, Pinto LH, & Lamb RA (1993) Ion channel activity of influenza A virus M2 protein: characterization of the amantadine block. *J Virol* 67(9):5585-5594.

169. Moscona A (2005) Oseltamivir resistance--disabling our influenza defenses. *N Engl J Med* 353(25):2633-2636.
170. Kohno S, *et al.* (2011) Intravenous peramivir for treatment of influenza A and B virus infection in high-risk patients. *Antimicrob Agents Chemother* 55(6):2803-2812.
171. Baranovich T, *et al.* (2013) T-705 (favipiravir) induces lethal mutagenesis in influenza A H1N1 viruses in vitro. *J Virol* 87(7):3741-3751.
172. Subbarao K & Katz J (2000) Avian influenza viruses infecting humans. *Cell Mol Life Sci* 57(12):1770-1784.
173. Chen GW, *et al.* (2006) Genomic signatures of human versus avian influenza A viruses. *Emerg Infect Dis* 12(9):1353-1360.
174. Rott R (1992) The pathogenic determinant of influenza virus. *Vet Microbiol* 33(1-4):303-310.
175. Maines TR, *et al.* (2011) Effect of receptor binding domain mutations on receptor binding and transmissibility of avian influenza H5N1 viruses. *Virology* 413(1):139-147.
176. Chutinimitkul S, *et al.* (2010) Virulence-associated substitution D222G in the hemagglutinin of 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus affects receptor binding. *J Virol* 84(22):11802-11813.
177. Ha Y, Stevens DJ, Skehel JJ, & Wiley DC (2001) X-ray structures of H5 avian and H9 swine influenza virus hemagglutinins bound to avian and human receptor analogs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(20):11181-11186.
178. Rogers GN, *et al.* (1985) Host-mediated selection of influenza virus receptor variants. Sialic acid- α 2,6Gal-specific clones of A/duck/Ukraine/1/63 revert to sialic acid- α 2,3Gal-specific wild type in ovo. *J Biol Chem* 260(12):7362-7367.
179. Deom CM, Caton AJ, & Schulze IT (1986) Host cell-mediated selection of a mutant influenza A virus that has lost a complex oligosaccharide from the tip of the hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(11):3771-3775.
180. Mir-Shekari SY, Ashford DA, Harvey DJ, Dwek RA, & Schulze IT (1997) The glycosylation of the influenza A virus hemagglutinin by mammalian cells. A site-specific study. *J Biol Chem* 272(7):4027-4036.
181. Rudneva IA, Ilyushina NA, Timofeeva TA, Webster RG, & Kaverin NV (2005) Restoration of virulence of escape mutants of H5 and H9 influenza viruses by their readaptation to mice. *J Gen Virol* 86(Pt 10):2831-2838.
182. Steinhauer DA (1999) Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology* 258(1):1-20.
183. Bottcher-Friebertshausen E, Klenk HD, & Garten W (2013) Activation of influenza viruses by proteases from host cells and bacteria in the human airway epithelium. *Pathog Dis* 69(2):87-100.
184. Sun X, Belser JA, & Tumpey TM (2016) A novel eight amino acid insertion contributes to the hemagglutinin cleavability and the virulence of a highly pathogenic avian influenza A (H7N3) virus in mice. *Virology* 488:120-128.
185. Chen Q, *et al.* (2015) Adaptive amino acid substitutions enhance the virulence of an H7N7 avian influenza virus isolated from wild waterfowl in mice. *Vet Microbiol* 177(1-2):18-24.
186. Kamal RP, Katz JM, & York IA (2014) Molecular determinants of influenza virus pathogenesis in mice. *Curr Top Microbiol Immunol* 385:243-274.
187. Schrauwen EJ & Fouchier RA (2014) Host adaptation and transmission of influenza A viruses in mammals. *Emerg Microbes Infect* 3(2):e9.
188. Gabriel G, *et al.* (2005) The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(51):18590-18595.
189. Gabriel G, *et al.* (2011) Differential use of importin- α isoforms governs cell tropism and host adaptation of influenza virus. *Nat Commun* 2:156.
190. Hudjetz B & Gabriel G (2012) Human-like PB2 627K influenza virus polymerase activity is regulated by importin- α 1 and - α 7. *PLoS Pathog* 8(1):e1002488.
191. Gabriel G, *et al.* (2007) Differential polymerase activity in avian and mammalian cells determines host range of influenza virus. *J Virol* 81(17):9601-9604.
192. Mehle A & Doudna JA (2009) Adaptive strategies of the influenza virus polymerase for replication in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(50):21312-21316.
193. Subbarao EK, London W, & Murphy BR (1993) A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *J Virol* 67(4):1761-1764.
194. Naffakh N, Massin P, Escriou N, Crescenzo-Chaigne B, & van der Werf S (2000) Genetic analysis of the compatibility between polymerase proteins from human and avian strains of influenza A viruses. *J Gen Virol* 81(Pt 5):1283-1291.

195. Shinya K, *et al.* (2004) PB2 amino acid at position 627 affects replicative efficiency, but not cell tropism, of Hong Kong H5N1 influenza A viruses in mice. *Virology* 320(2):258-266.
196. Hatta M, *et al.* (2007) Growth of H5N1 influenza A viruses in the upper respiratory tracts of mice. *PLoS Pathog* 3(10):1374-1379.
197. Steel J, Lowen AC, Mubareka S, & Palese P (2009) Transmission of influenza virus in a mammalian host is increased by PB2 amino acids 627K or 627E/701N. *PLoS Pathog* 5(1):e1000252.
198. Zhu W, *et al.* (2012) Mutations in polymerase genes enhanced the virulence of 2009 pandemic H1N1 influenza virus in mice. *PLoS One* 7(3):e33383.
199. Liu Y, *et al.* (2013) Structural and functional characterization of K339T substitution identified in the PB2 subunit cap-binding pocket of influenza A virus. *J Biol Chem* 288(16):11013-11023.
200. Conenello GM, Zamarin D, Perrone LA, Tumpey T, & Palese P (2007) A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence. *PLoS Pathog* 3(10):1414-1421.
201. Krumbholz A, *et al.* (2011) Current knowledge on PB1-F2 of influenza A viruses. *Med Microbiol Immunol* 200(2):69-75.
202. Marathe BM, Leveque V, Klumpp K, Webster RG, & Govorkova EA (2013) Determination of neuraminidase kinetic constants using whole influenza virus preparations and correction for spectroscopic interference by a fluorogenic substrate. *PLoS One* 8(8):e71401.
203. Otte A, *et al.* (2015) Adaptive Mutations That Occurred during Circulation in Humans of H1N1 Influenza Virus in the 2009 Pandemic Enhance Virulence in Mice. *J Virol* 89(14):7329-7337.
204. Gen F, *et al.* (2013) Attenuation of an influenza A virus due to alteration of its hemagglutinin-neuraminidase functional balance in mice. *Arch Virol* 158(5):1003-1011.
205. Pappas C, *et al.* (2008) Single gene reassortants identify a critical role for PB1, HA, and NA in the high virulence of the 1918 pandemic influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(8):3064-3069.
206. Tumpey TM, *et al.* (2004) Pathogenicity and immunogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(9):3166-3171.
207. Nguyen HT, Fry AM, & Gubareva LV (2012) Neuraminidase inhibitor resistance in influenza viruses and laboratory testing methods. *Antivir Ther* 17(1 Pt B):159-173.
208. Hai R, *et al.* (2013) Influenza A(H7N9) virus gains neuraminidase inhibitor resistance without loss of in vivo virulence or transmissibility. *Nat Commun* 4:2854.
209. Smith W. ACH, Laidlaw P.P. (1933) A virus obtained from influenza patients. *Lancet* 222(5732): 66 - 68.
210. Barnard DL (2009) Animal models for the study of influenza pathogenesis and therapy. *Antiviral Res* 82(2):A110-122.
211. Alberts R, *et al.* (2010) Gene expression changes in the host response between resistant and susceptible inbred mouse strains after influenza A infection. *Microbes Infect* 12(4):309-318.
212. Boon AC, *et al.* (2009) Host genetic variation affects resistance to infection with a highly pathogenic H5N1 influenza A virus in mice. *J Virol* 83(20):10417-10426.
213. Srivastava B, *et al.* (2009) Host genetic background strongly influences the response to influenza a virus infections. *PLoS One* 4(3):e4857.
214. Ibricevic A, *et al.* (2006) Influenza virus receptor specificity and cell tropism in mouse and human airway epithelial cells. *J Virol* 80(15):7469-7480.
215. van Riel D, *et al.* (2007) Human and avian influenza viruses target different cells in the lower respiratory tract of humans and other mammals. *Am J Pathol* 171(4):1215-1223.
216. Hirst GK (1947) Studies on the Mechanism of Adaptation of Influenza Virus to Mice. *J Exp Med* 86(5):357-366.
217. Brown EG (1990) Increased virulence of a mouse-adapted variant of influenza A/FM/1/47 virus is controlled by mutations in genome segments 4, 5, 7, and 8. *J Virol* 64(9):4523-4533.
218. Glaser L, Conenello G, Paulson J, & Palese P (2007) Effective replication of human influenza viruses in mice lacking a major alpha2,6 sialyltransferase. *Virus Res* 126(1-2):9-18.
219. Itoh Y, *et al.* (2009) In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature* 460(7258):1021-1025.
220. Kobasa D, *et al.* (2004) Enhanced virulence of influenza A viruses with the haemagglutinin of the 1918 pandemic virus. *Nature* 431(7009):703-707.
221. Dybing JK, Schultz-Cherry S, Swayne DE, Suarez DL, & Perdue ML (2000) Distinct pathogenesis of hong kong-origin H5N1 viruses in mice compared to that of other highly pathogenic H5 avian influenza viruses. *J Virol* 74(3):1443-1450.

222. Garigliany MM, *et al.* (2010) Influenza A strain-dependent pathogenesis in fatal H1N1 and H5N1 subtype infections of mice. *Emerg Infect Dis* 16(4):595-603.
223. Perrone LA, Plowden JK, Garcia-Sastre A, Katz JM, & Tumpey TM (2008) H5N1 and 1918 pandemic influenza virus infection results in early and excessive infiltration of macrophages and neutrophils in the lungs of mice. *PLoS Pathog* 4(8):e1000115.
224. Wolk KE, *et al.* (2008) Influenza A virus inhibits alveolar fluid clearance in BALB/c mice. *Am J Respir Crit Care Med* 178(9):969-976.
225. Schulman JL & Kilbourne ED (1963) Experimental Transmission of Influenza Virus Infection in Mice. II. Some Factors Affecting the Incidence of Transmitted Infection. *J Exp Med* 118:267-275.
226. Schulman JL & Kilbourne ED (1963) Experimental Transmission of Influenza Virus Infection in Mice. I. The Period of Transmissibility. *J Exp Med* 118:257-266.
227. Schulman JL (1967) Experimental transmission of influenza virus infection in mice. 3. Differing effects of immunity induced by infection and by inactivated influenza virus vaccine on transmission of infection. *J Exp Med* 125(3):467-478.
228. Schulman JL (1967) Experimental transmission of influenza virus infection in mice. IV. Relationship of transmissibility of different strains of virus and recovery of airborne virus in the environment of infector mice. *J Exp Med* 125(3):479-488.
229. Schulman JL (1968) The use of an animal model to study transmission of influenza virus infection. *Am J Public Health Nations Health* 58(11):2092-2096.
230. Schulman JL (1970) Effects of immunity on transmission of influenza: experimental studies. *Prog Med Virol* 12:128-160.
231. Lowen AC, Mubareka S, Tumpey TM, Garcia-Sastre A, & Palese P (2006) The guinea pig as a transmission model for human influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(26):9988-9992.
232. Mubareka S, *et al.* (2009) Transmission of influenza virus via aerosols and fomites in the guinea pig model. *J Infect Dis* 199(6):858-865.
233. Lowen AC, *et al.* (2009) Blocking interhost transmission of influenza virus by vaccination in the guinea pig model. *J Virol* 83(7):2803-2818.
234. Lowen AC, Steel J, Mubareka S, & Palese P (2008) High temperature (30 degrees C) blocks aerosol but not contact transmission of influenza virus. *J Virol* 82(11):5650-5652.
235. Phair JP, Kauffman CA, Jennings R, & Potter CW (1979) Influenza virus infection of the guinea pig: immune response and resistance. *Med Microbiol Immunol* 165(4):241-254.
236. Tang X & Chong KT (2009) Histopathology and growth kinetics of influenza viruses (H1N1 and H3N2) in the upper and lower airways of guinea pigs. *J Gen Virol* 90(Pt 2):386-391.
237. Van Hoeven N, *et al.* (2009) Pathogenesis of 1918 pandemic and H5N1 influenza virus infections in a guinea pig model: antiviral potential of exogenous alpha interferon to reduce virus shedding. *J Virol* 83(7):2851-2861.
238. Steel J, *et al.* (2010) Transmission of pandemic H1N1 influenza virus and impact of prior exposure to seasonal strains or interferon treatment. *J Virol* 84(1):21-26.
239. Kwon YK, Lipatov AS, & Swayne DE (2009) Bronchointerstitial pneumonia in guinea pigs following inoculation with H5N1 high pathogenicity avian influenza virus. *Vet Pathol* 46(1):138-141.
240. Gao Y, *et al.* (2009) Identification of amino acids in HA and PB2 critical for the transmission of H5N1 avian influenza viruses in a mammalian host. *PLoS Pathog* 5(12):e1000709.
241. Bouvier NM, Lowen AC, & Palese P (2008) Oseltamivir-resistant influenza A viruses are transmitted efficiently among guinea pigs by direct contact but not by aerosol. *J Virol* 82(20):10052-10058.
242. Francis T, Jr. (1934) Transmission of Influenza by a Filterable Virus. *Science* 80(2081):457-459.
243. Call SA, Vollenweider MA, Hornung CA, Simel DL, & McKinney WP (2005) Does this patient have influenza? *JAMA* 293(8):987-997.
244. Eccles R (2002) An explanation for the seasonality of acute upper respiratory tract viral infections. *Acta Otolaryngol* 122(2):183-191.
245. Hayden FG, *et al.* (2000) Inhaled zanamivir for the prevention of influenza in families. Zanamivir Family Study Group. *N Engl J Med* 343(18):1282-1289.
246. Matsuoka Y, Lamirande EW, & Subbarao K (2009) The ferret model for influenza. *Curr Protoc Microbiol* Chapter 15:Unit 15G 12.
247. Shope RE (1934) The Infection of Ferrets with Swine Influenza Virus. *J Exp Med* 60(1):49-61.

248. Belser JA, *et al.* (2016) Mammalian Pathogenesis and Transmission of H7N9 Influenza Viruses from Three Waves, 2013-2015. *J Virol* 90(9):4647-4657.
249. Scheiblaue H, Kendal AP, & Rott R (1995) Pathogenicity of influenza A/Seal/Mass/1/80 virus mutants for mammalian species. *Arch Virol* 140(2):341-348.
250. Webster RG, *et al.* (1981) Characterization of an influenza A virus from seals. *Virology* 113(2):712-724.
251. Li SQ, Orlich M, & Rott R (1990) Generation of seal influenza virus variants pathogenic for chickens, because of hemagglutinin cleavage site changes. *J Virol* 64(7):3297-3303.
252. Technologies A (2016; Zugriff am 15.07.2016) QuikChange Primer Design.
253. Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster RG, & Perez DR (2001) Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol* 146(12):2275-2289.
254. Stech J, *et al.* (2008) Rapid and reliable universal cloning of influenza A virus genes by target-primed plasmid amplification. *Nucleic Acids Res* 36(21):e139.
255. Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, Hobom G, & Webster RG (2000) A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(11):6108-6113.
256. Gauth CR & Smith TF (1968) Replication and plaque assay of influenza virus in an established line of canine kidney cells. *Appl Microbiol* 16(4):588-594.
257. Matrosovich M, Matrosovich T, Garten W, & Klenk HD (2006) New low-viscosity overlay medium for viral plaque assays. *Virology* 343:63.
258. Shubladze AK & Soloviev VD (1945) Agglutination of erythrocytes by influenza virus. *Am Rev Sov Med* 3:130-133.
259. Soloviev VD, Shubladze AK, & Meltzer NI (1945) Agglutination of erythrocytes by grippe (influenza) virus. *Am Rev Sov Med* 3:134.
260. Otte A, *et al.* (2016) Evolution of 2009 H1N1 influenza viruses during the pandemic correlates with increased viral pathogenicity and transmissibility in the ferret model. *Sci Rep* 6:28583.
261. Castrucci MR & Kawaoka Y (1993) Biologic importance of neuraminidase stalk length in influenza A virus. *J Virol* 67(2):759-764.
262. Matrosovich M, Zhou N, Kawaoka Y, & Webster R (1999) The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J Virol* 73(2):1146-1155.
263. Reed LHaM, H. (1938) "A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene* 27:493-497.
264. Fodor E (2013) The RNA polymerase of influenza a virus: mechanisms of viral transcription and replication. *Acta Virol* 57(2):113-122.
265. Nobusawa E, Ishihara H, Morishita T, Sato K, & Nakajima K (2000) Change in receptor-binding specificity of recent human influenza A viruses (H3N2): a single amino acid change in hemagglutinin altered its recognition of sialyloligosaccharides. *Virology* 278(2):587-596.
266. Ito T, *et al.* (1997) Receptor specificity of influenza A viruses correlates with the agglutination of erythrocytes from different animal species. *Virology* 227(2):493-499.
267. Yang H, Carney PJ, Donis RO, & Stevens J (2012) Structure and receptor complexes of the hemagglutinin from a highly pathogenic H7N7 influenza virus. *J Virol* 86(16):8645-8652.
268. Senne DA, *et al.* (1996) 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* 40(2):425-437.
269. Ilyushina NA, *et al.* (2010) Adaptation of pandemic H1N1 influenza viruses in mice. *J Virol* 84(17):8607-8616.
270. Gabriel G, Czudai-Matwich V, & Klenk HD (2013) Adaptive mutations in the H5N1 polymerase complex. *Virus Res* 178(1):53-62.
271. Guilligay D, *et al.* (2008) The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2. *Nat Struct Mol Biol* 15(5):500-506.
272. Ping J, *et al.* (2011) Genomic and protein structural maps of adaptive evolution of human influenza A virus to increased virulence in the mouse. *PLoS One* 6(6):e21740.
273. Wagner R, Matrosovich M, & Klenk HD (2002) Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Rev Med Virol* 12(3):159-166.
274. Sandbulte MR, *et al.* (2011) Discordant antigenic drift of neuraminidase and hemagglutinin in H1N1 and H3N2 influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(51):20748-20753.

275. Air GM, Els MC, Brown LE, Laver WG, & Webster RG (1985) Location of antigenic sites on the three-dimensional structure of the influenza N2 virus neuraminidase. *Virology* 145(2):237-248.
276. Rudneva IA, *et al.* (1996) Phenotypic expression of HA-NA combinations in human-avian influenza A virus reassortants. *Arch Virol* 141(6):1091-1099.
277. Matrosovich M, *et al.* (2000) Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *J Virol* 74(18):8502-8512.
278. Maines TR, *et al.* (2009) Transmission and pathogenesis of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses in ferrets and mice. *Science* 325(5939):484-487.
279. Chen LM, *et al.* (2012) In vitro evolution of H5N1 avian influenza virus toward human-type receptor specificity. *Virology* 422(1):105-113.
280. Vey M, *et al.* (1992) Hemagglutinin activation of pathogenic avian influenza viruses of serotype H7 requires the protease recognition motif R-X-K/R-R. *Virology* 188(1):408-413.
281. Punit-Penalosa JA, *et al.* (2015) Pathogenesis and Transmission of Novel Highly Pathogenic Avian Influenza H5N2 and H5N8 Viruses in Ferrets and Mice. *J Virol* 89(20):10286-10293.
282. Sun H, *et al.* (2011) Pathogenicity in quails and mice of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses isolated from ducks. *Vet Microbiol* 152(3-4):258-265.
283. de Wit E, *et al.* (2005) Protection of mice against lethal infection with highly pathogenic H7N7 influenza A virus by using a recombinant low-pathogenicity vaccine strain. *J Virol* 79(19):12401-12407.
284. Puthavathana P, *et al.* (2005) Molecular characterization of the complete genome of human influenza H5N1 virus isolates from Thailand. *J Gen Virol* 86(Pt 2):423-433.
285. Otte A, *et al.* (2011) Differential host determinants contribute to the pathogenesis of 2009 pandemic H1N1 and human H5N1 influenza A viruses in experimental mouse models. *Am J Pathol* 179(1):230-239.
286. Hatta M, Gao P, Halfmann P, & Kawaoka Y (2001) Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* 293(5536):1840-1842.
287. Manz B, Matrosovich M, Bovin N, & Schwemmler M (2010) A polymorphism in the hemagglutinin of the human isolate of a highly pathogenic H5N1 influenza virus determines organ tropism in mice. *J Virol* 84(16):8316-8321.
288. Tumpey TM, *et al.* (2007) A two-amino acid change in the hemagglutinin of the 1918 influenza virus abolishes transmission. *Science* 315(5812):655-659.
289. Jiao P, *et al.* (2014) D701N mutation in the PB2 protein contributes to the pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses but not transmissibility in guinea pigs. *Front Microbiol* 5:642.
290. Tabynov K, Sansyrbay A, Sandybayev N, & Mambetaliyev M (2014) The pathogenicity of swan derived H5N1 virus in birds and mammals and its gene analysis. *Virol J* 11:207.
291. Sun Y, *et al.* (2010) Guinea pig model for evaluating the potential public health risk of swine and avian influenza viruses. *PLoS One* 5(11):e15537.

9. Verzeichnisse der Abbildungen und Tabellen

9.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Influenzaviruspartikels.	2
Abbildung 2: Replikationszyklus von IAV.	7
Abbildung 3: Replikation, <i>cap snatching</i> , Transkription und Translation des viralen Genoms.	10
Abbildung 4: Wirtsspektrum von Influenza A Viren.	13
Abbildung 5: Die Geschichte der Generation des SC35F Virus; eine Illustration.	33
Abbildung 6: Versuchsaufbau im Luftstromschrank zur Untersuchung der Transmission von Influenza A Viren im Meerschweinchen.	72
Abbildung 7: Zeitlicher Verlauf in Transmissionsversuchen im Meerschweinchen.	73
Abbildung 8: vRNP-Aktivität von SC35 und SC35F rekombinanten Viren.	83
Abbildung 9: Ermittelte Neuraminidaseaktivität von NA _{328A} und NA _{328S} durch Neuraminidase Elution.	85
Abbildung 10: Mittels 4-MUNANA Test ermittelte Neuraminidaseaktivität SC35- und SC35F-spezifischer Viren mit NA _{328A} oder NA _{328S}	86
Abbildung 11: Lokalisierung der SC35F-spezifischen Mutationen in einem beispielhaften HA Proteinmodell.	87
Abbildung 12: Gewichtsverläufe und Überlebensraten infiziert mit rekombinanter SC35 und SC35F Viren (niedrige Virulenz) in BALB/c Mäusen.	92
Abbildung 13: Überlebensraten von BALB/c Mäusen nach Infektion mit verschiedenen Dosen von SC35-HA _{SC35F}	93
Abbildung 14: Gewichtsverläufe und Überlebensraten von BALB/c Mäusen infiziert mit SC35F Einzelpunktmutanten.	94
Abbildung 15: MLD ₅₀ von SC35 und SC35F rekombinanten Viren in BALB/c Mäusen.	96

Abbildung 16: Lungentiter und Gehirntiter von BALB/c Mäusen nach Infektion mit SC35F Einzelgenreassortanten.....	98
Abbildung 17: Lungentiter und Gehirntiter von BALB/c Mäusen nach Infektion mit den SC35-SC35F Einzelpunktmutanten.....	100
Abbildung 18: HE-Färbungen von Lungen infizierter BALB/c Mäusen nach Infektion mit SC35 und SC35F rekombinanten H7N7 Viren.....	102
Abbildung 19: Immunohistochemisch gefärbte Lungenschnitte aus BALB/c Mäusen nach Infektion mit rekombinanten SC35 und SC35F H7N7 Viren.....	104
Abbildung 20: Virustiter der Nasenspülungen von Meerschweinchen, die mit den Einzelgenreassortanten SC35, SC35-PB2 _{SC35F} , SC35-PB1 _{SC35F} , SC35-NA _{SC35F} und SC35-HA _{SC35F} infiziert wurden.	108
Abbildung 21: Virustiter der Nasenspülungen von Meerschweinchen, die mit den Einzelpunktmutanten SC35F-HA _{monobasisch} , SC35-HA _{111T} , SC35-HA _{146S} und SC35-HA _{340R} ...	112

9.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die Proteine des IAV mit Nummerierung der Gensegmente, der Proteingrößen und den Funktionen der Proteine.	3
Tabelle 2: Nukleotid- und Aminosäuresequenzunterschiede zwischen SC35 und SC35F (H7N7)	79
Tabelle 3: Die Aminosäuresequenzmutationen von SC35M und SC35F im Vergleich zu SC35 (H7N7).....	80
Tabelle 4: Generierte rekombinante SC35 und SC35F Viren.....	81
Tabelle 5: Bindenspezifität von SC35 und SC35F rekombinanten Viren in modifizierten PE. .	90

10. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Alanin
aa	<i>amino acid</i> ; Aminosäure
AAA _n	Poly (A)-Schwanz/ Polyadenylierung des 3' Endes von prä-mRNA
ad	an/zu
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintryphosphat
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
C-	Carboxyterminal / Carboxy-Terminus
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> ; Zentren zur Krankheitskontrolle und Prävention
CE Zellen	<i>chicken embryo cells</i> ; Zellen aus Hühnerembryonen
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cpe	<i>cytopathic effect</i> ; zytopathischer Effekt
cRNA	<i>copy RNA</i> ; komplementäre RNA
d	<i>day</i> ; Tag
d	Gramm
Da	Dalton
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DMEM	Dulbecco's modified Eagles medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-NPT
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i> Bakterien
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EID ₅₀ /ml	Ei-infektiöse Dosis 50 pro Milliliter
FCS	fötale Kälber Serum
FPV	fowl plaque virus
FTH	Forschungstierhaltung
G	Glycin
H	Histidin
h	Stunde
H1-16	Hämagglutinin Subtypen H1 bis H16
H ₂	Wasserstoff

Abkürzungsverzeichnis

H ₂ O, dd	Doppelt destilliertes Wasser
HA Test	Hämagglutinations Test
HA	Hämagglutinin
HA ₀	Vorläuferprotein des HA
HAI	Hämagglutinationsinhibitions-Titer
HAU	<i>hemagglutination unit</i> ; Hämagglutinationstiter
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEK293T	<i>human embryonic kidney cells</i> ; Nierenzellen aus humanem Embryo mit SV40 large T-Antigen
HPAIV	<i>highly pathogenic avian influenza virus</i> ; hochpathogenes aviäres IAV
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> ; Meerrettichperoxidase
Hz	Hertz
I	Isoleucin
i.c.	intrazerebral
i.k.	intrakardial
i.m.	intramuskulär
i.n.	intranasal
i.v.	intravenös
IAV	Influenza A Virus
IHC-P	immunhistochemische Färbung für Paraffin eingebettete Proben
IFN	Interferon
ILI	<i>influenza like illness</i> ; grippeähnliche Erkrankung
k.A.	keine Angabe
kb	Kilobase
kDA	Kilodalton
kg	Kilogramm
L	Leucin
l	Liter
log	Logarithmus
LPAIV	<i>low pathogenic avian influenza virus</i> ; niedrigpathogenes aviäres IAV
M	Molar
M1/ M2	Matrixprotein-1/ -2
multi-BCS	<i>multibasic cleavage site</i> ; multibasische Spaltstelle
mg	Milligramm
min	Minute
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
MLD ₅₀	Maus letale Dosis 50
mM	Millimolar

Abkürzungsverzeichnis

MOI	Multiplizität der Infektion (<i>multiplicity of infection</i>)
mono-BCS	<i>monobasic cleavage site</i> ; monobasische Spaltstelle
mol	Stoffmenge
mRNA	messenger RNA
N-	Aminoterminal/ Amino-Terminus
N	Asparagin
N	Stickstoff
N1-N9	Neuraminidase Subtypen N1 bis N9
NA	Neuraminidase
NaCl	Natriumchlorid
NEP	<i>nuclear export protein</i> ; Nukleares Exportprotein
NLS	<i>nuclear localization signal</i> ; Kernlokalisierungssignal
nm	Nanometer
NP	Nukleoprotein
NS1/ NS3	Nichtstrukturprotein 1/ Nichtstrukturprotein 3
nt	Nukleotid
ORT	oberer Respirationstrakt
P	Prolin
p.f.u.	<i>plaque forming units</i> ; Plaque bildende Einheiten, Angabe zum Virustiter
p.i.	<i>post infection</i> ; nach Infektion
PA	<i>polymerase acidic protein</i> ; Saures Polymeraseprotein
PB1	<i>polymerase basic protein 1</i> ; Basisches Polymeraseprotein 1
PB2	<i>polymerase basic protein 2</i> ; Basisches Polymeraseprotein 2
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> ; Phosphatgepufferte Salzlösung
PC6	proprotein convertase 6
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pH1N1	pandemisches H1N1
R	Arginin
r.b.	retrobulbär
rH	<i>relative humidity</i> ; relative Luftfeuchtigkeit (in %)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
rpm	<i>revolutions per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
RT	<i>reverse transcription</i> ; Reverse Transkriptase
s	Sekunde
S	Serin
SPF	<i>specific pathogen free</i> ; frei von spezifischen Pathogenen

Abkürzungsverzeichnis

T	Threonin
U	<i>unit</i> , Einheit der Enzymaktivität
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
URT	unterer Respirationstrakt
V	Volt
vRNA	virale RNA
vRNP	virales Ribonukleoprotein
WHO	<i>World Health Organization</i> ; Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
xg	Erdbeschleunigung, Angabe der Zentrifugationsgeschwindigkeit

11. Veröffentlichungen, Vorträge und Posterpräsentationen

Veröffentlichungen

Teile der Ergebnisse aus vorliegender Arbeit werden in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

Dreier C., Resa-Infante P., Thiele S., Preuß A., Klenk H.-D., Gabriel G. (2017). „Determinants of highly pathogenic H7N7 avian influenza viruses.“

Manuskript in Vorbereitung.

Dreier C., Bertram S., Thiele S., Preuß A., Klenk H.-D., Gabriel G. (2017)

„Transmission of highly pathogenic H7N7 avian influenza viruses in guinea pigs.“

Manuskript in Vorbereitung.

Weitere Veröffentlichungen während der Dissertation:

Otte A., Marriott A. C., **Dreier C.**, Dove B., Mooren K., Klingen T. R., Sauter M., Thompson K-A., Bennett A., Klingel K., van Riel D., McHardy A. C., Carroll M. W., Gabriel G. (2016) “Evolution of 2009 H1N1 influenza viruses during the pandemic correlates with increased viral pathogenicity and transmissibility in the ferret model.” *Sci Rep.* 2016 Jun 24;6:28583.

Engels G., Hierweger A. M., Hoffmann J., Thieme R., Thiele S., Bertram S., **Dreier, C.**, Resa-Infante P., Jacobsen H., Thiele K., Alawi M., Indenbirken D., Grundhoff A., Siebels S., Fischer N., Stojanovska V., Muzzio D., Jensen F., Karimi K., Mittrücker H.-W., Arck P. C. und Gabriel G. “Pregnancy-Related Immune Adaptation Promotes the Emergence of Highly Virulent H1N1 Influenza Virus Strains in Allogeneically Pregnant Mice”. *CELL HOST MICROBE.* 2017 Mar 8;3:2017.02.020

Bertram S., Thiele S., **Dreier C.**, Resa-Infante P., Preuß A., van Riel D., Mok C., Peiris M., Schwalm F., Klenk H.-D. und Gabriel G. (2017).

„H7N9 influenza A virus exhibit importin- α 7 mediated replication in the mammalian respiratory tract.” *Am J Pathol.* 2017 Feb 8. pii: S0002-9440(17)30067-6.

Bertram S., Thiele S., Asantewaa Asante I., Walendy-Gnirß K., **Dreier C.**, Preuß A., Pilnitz-Stolze G., Müller U., Thanisch S., Herder V., Gerhauser I., Schmidt-Chanasit J., Jansen S., Schattling B., van Riel D., Stalin Raj V., Arck P., Koopmans M., Friese M., Vapalahti O., Gabriel M., Cadar D., Baumgärtner W. and Gabriel G.

„Differential Zika virus pathogenesis in an immunocompetent allogeneic mouse pregnancy model.“ *Manuskript eingereicht.*

Vorträge auf Fachtagungen und Institutsseminaren

Fett gedruckt: präsentierender Author

Dreier C., Resa-Infante P., Gabriel G. (2013)

„Role of the importin- α 1 gene in influenza virus replication and pathogenicity.“ *Heinrich-Pette-Institut, PhD Seminar - Vortrag im Rahmen des Doktorandenseminars, Hamburg, Deutschland.*

Dreier C., Resa-Infante P., Gabriel G. (2014)

„Animal models in influenza research.“

3rd Young Scientist Retreat des Heinrich-Pette-Instituts, Ammersbek, Deutschland.

Dreier C., Resa-Infante P., Gabriel G. (2014)

„Viral Determinants of H7N7 HPAIV - Pathogenicity and Transmission.“

Heinrich-Pette-Institut, PhD Seminar - Vortrag im Rahmen des Doktorandenseminars, Hamburg, Deutschland.

Dreier C., Resa-Infante P., Gabriel G. (2015)

„Viral Determinants of H7N7 HPAIV - Pathogenicity and Transmission.“

Heinrich-Pette-Institut, PhD Seminar – Vortrag im Rahmen des Doktorandenseminars, Hamburg, Deutschland.

Dreier C., Resa-Infante P., Gabriel G. (2015)

„Viral Determinants of H7N7 HPAIV - Pathogenicity and Transmission.“

LCI Retreat, Jesteburg, Deutschland.

Dreier C., Resa-Infante P., Gabriel G. (2015)

„Viral Determinants of H7N7 HPAIV - Pathogenicity and Transmission.“

Scientific Retreat des Heinrich-Pette-Instituts, Hamburg, Deutschland.

Posterpräsentationen

Dreier C., Resa-Infante P., Gabriel G. (2013)

„Role of the Importin- α 1 Gene in Influenza A virus Replication and Pathogenicity“

Evaluierung der Arbeitsgruppe am Heinrich-Pette-Institut, Hamburg, Deutschland.

Dreier C., Resa-Infante P., Otte A., Preuß A., van Riel D., Bertram S., Klenk H.-D. and Gabriel G. (2016)

„Determinants of Highly Pathogenic H7N7 Avian Influenza Virus - Pathogenicity and Transmission“

Options IX for the Control of Influenza, Konferenz, Chicago, USA.

Dreier C., Resa-Infante P., Otte A., Preuß A., van Riel D., Bertram S., Klenk H.-D. and Gabriel G. (2016)

„Determinants of Highly Pathogenic H7N7 Avian Influenza Virus Pathogenicity and Transmission“

5th International Influenza Meeting, Konferenz, Münster, Deutschland.

Dreier C., Resa-Infante P., Bertram S., Gabriel G. (2016)

„Role of the Importin- α 1 Gene in Influenza A Virus Replication and Pathogenicity“

Scientific Retreat des Heinrich-Pette-Instituts, Hamburg, Deutschland.

Walendy-Gnirß K., Bertram S., Schiecke A., Preuß A., **Dreier C.**, Herwig A. and Gabriel G.

„The Siberian Hamster as a New Model to Study Seasonal Impact on Influenza A Virus Pathogenicity“

Scientific Retreat des Heinrich-Pette-Instituts, Hamburg, Deutschland.

Dreier C., Resa-Infante P., Preuß A., van Riel D., Thiele S., Klenk H.-D. and Gabriel G.
(2016)

„Ferret-adapted H7N7 HPAIV Pathogenicity and Transmissibility in Small Animal Models”
Evaluierung der Arbeitsgruppe am Heinrich-Pette-Institut, Hamburg, Deutschland.

Otte A., Marriott A. C., **Dreier C.**, Dove B., Mooren K., Klingen T. R., Sauter M., Thompson K-A., Bennett A., Klingel K., van Riel D., McHardy A. C., Carroll M. W., Gabriel G.

„Evolution of 2009 H1N1 influenza viruses during the pandemic correlates with increased viral pathogenicity and transmissibility in the ferret model”
Evaluierung der Arbeitsgruppe am Heinrich-Pette-Institut, Hamburg, Deutschland.

12. Eidesstattliche Versicherung

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

„Untersuchungen zur Pathogenese und Transmission eines frettchenadaptierten H7N7 Influenza A Virus“

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

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

Hamburg, den 13.12.2016

Wissenschaftlicher Werdegang

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

Stipendien

2012 – 2015	Leibniz Center Infection Forschungsprojekt mit Stipendium für 3 Jahre
2011	INTERSTIP Stipendium der Hochschule Mannheim für den Forschungsaufenthalt in Kanada
2011	Reisekostenförderung PROMOS durch den DAAD zur Durchführung der Masterarbeit in Kanada

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Frau Prof. Dr. Gülşah Gabriel für die freundliche Bereitstellung dieses hochinteressanten Themas herzlich danken. Darüber hinaus verdanke ich Gülşah Gabriel viele anregende Diskussionen, stetige Motivation, Hilfe und Rat in jeder Situation und stets ein offenes Ohr für wissenschaftliche Fragen.

Patricia Resa-Infante danke ich für die Hilfestellung während meinen ersten Schritten auf dem Weg zur Doktorarbeit, für die unermüdlichen Diskussionen, für die Hilfsbereitschaft und die Erklärungen und das Fachwissen, das sie gerne mit mir teilte. Muchas gracias para todos, Pat!

Dr. Annika Herwig danke ich herzlich für die Übernahme der Co-Betreuung meiner Doktorarbeit und für die motivierenden Worte und anregenden Diskussionen.

Prof. Dr. Gülşah Gabriel und Dr. Annika Herwig danke ich ganz besonders für die schriftliche Begutachtung dieser Arbeit.

Prof. Dr. Jörg Ganzhorn, Prof. Dr. Julia Kehr, Prof. Dr. Gülşah Gabriel und Dr. Annika Herwig möchte ich herzlich für die Übernahme der Prüfungskommission der Disputation danken.

Dr. Anna Otte möchte ich herzlich für die Einarbeitung in das Meerschweinchenmodell sowie die Logistik darum herum bedanken.

Bei Dr. Swantje Thiele möchte ich mich herzlich für die interessanten Diskussionen, die wertvollen Ratschläge und das geduldige Korrekturlesen meiner Manuskripte und Poster und vor allem meiner Doktorarbeit bedanken. Das habe ich nie als selbstverständlich hingenommen, vielen herzlichen Dank dafür!

Bei Dr. Stephanie Bertram möchte ich mich herzlich für ihr stets offenes Ohr, die geduldige Beantwortung meiner Fragen und für die Unterstützung bedanken! Außerdem weiß ich sehr zu schätzen, dass sie trotz der knapp bemessenen Zeit meine Doktorarbeit kritisch gelesen und korrigiert hat. Vielen herzlichen Dank!

Bei Prof. Dr. Debby van Riel vom Erasmus Medical Center Rotterdam möchte ich mich herzlich für die vielen Gespräche und Tipps, die unzähligen Beantwortungen meiner Fragen zu Versuchen sowie für die Bereitstellung der Viren bedanken.

Danksagung

Herrn Prof. Hans-Dieter Klenk möchte ich für das Gegenlesen der Manuskripte und noch mehr für die Bereitstellung der SC35 und SC35F Viren herzlich danken.

Annette Preuß und Gundula Pilnitz-Stolze möchte ich herzlich für die hervorragende experimentelle Unterstützung der durchgeführten Versuche während dieser Arbeit danken. Mein besonderer Dank gilt hierbei Annette, die die unzähligen langen Arbeitseinheiten im BSL-3 Labor stets mit Humor untermalt und tatkräftig mit angepackt hat. Vielen herzlichen Dank dafür!

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Dr. Géraldine Engels besonders für ihre unermüdliche Hilfe in allen Lebenslagen, die Zuverlässigkeit und die Ratschläge bedanken. Vielen herzlichen Dank auch für die aufbauenden Worte an trüben Tagen, die Geduld und für die vielen lustigen Stunden und geteilten Freuden innerhalb und außerhalb des Instituts.

Ich danke außerdem allen Kolleginnen und Kollegen aus der Arbeitsgruppe Virale Zoonosen und Adaptation des HPis für ihre Unterstützung, die Wochenenddienste als BSL-3 Backup und für interessante wissenschaftliche und auch absolut unwissenschaftliche Unterhaltungen.

Ein großer Dank geht an meine Familie, die mich während der letzten Jahre immer mit Wort und Tat unterstützt, an mich geglaubt und motiviert hat. Vielen Dank für alles!

Dem Leibniz Center Infection (LCI) und allen dahinter stehenden Personen danke ich herzlich für die Chance, ein Teil dieses einzigartigen Forschungsverbundes zu sein.