Aus dem Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. Klenk
In Zusammenarbeit mit dem Robert Koch-Institut in Berlin
Präsident: Prof. Dr. Kurth

Charakterisierung der Typ I IFN-antagonistischen Eigenschaften des Influenza B Virus

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Bianca Dauber

aus Miltenberg

Marburg, 2005

Angenommen am Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg am 03.05.2006. Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Maisch
Referent: Priv.-Doz. Dr. Wolff
Koreferent: Prof. Dr. Bauer
Koreferent: Prof. Dr. Haller

INHALTVERZEICHNIS

1.	**EINLEITUNG**	**1**
1.1	**Das Influenza Virus**	**1**
1.1.1	Taxonomie	1
1.1.2	Morphologie	1
1.1.3	Genomorganisation und kodierte Proteine	2
1.1.4	Replikation	6
1.1.5	Pathogenese und Epidemiologie der Influenza A und B Viren	9
1.2	**Das Typ I Interferon System**	**11**
1.2.1	Transkriptionelle Aktivierung des IFN-ß Gens	13
1.2.2	IFN-a/ß Signalweg	14
1.2.3	Antivirale Wirkung IFN-induzierter Proteine	15
1.2.4	Induktion von IFN-a/ß in plasmazytoiden Dendritischen Zellen (pDCs)	17
1.3	**Virale Antagonisten des Typ I IFN-Systems**	**17**
1.3.1	IFN-antagonistisches Potential des NS1 Proteins der Influenza A und B Viren	20
1.4	**Reverse Genetik bei Influenza Viren**	**23**
1.5	**Fragestellung**	**26**
2.	**MATERIAL UND METHODEN**	**27**
2.1	**Material**	**27**
2.2	**Methoden**	**39**
2.2.1	Zellkultur	39
2.2.2	Arbeiten mit Influenza A und B Viren	41
2.2.3	Konstruktion von Plasmiden	44
2.2.4	Herstellung rekombinanter Influenza B/Lee Viren	55
2.2.5	Zellbiologische und molekularbiologische Methoden	57
2.2.6	Proteinanalytische Arbeiten	60
3.	**ERGEBNISSE**	**66**
3.1	**Etablierung eines revers-genetischen Systems zur Erzeugung und Analyse rekombinanter Influenza B Viren**	**66**
3.1.1	Subklonierung der Segmente des Influenza B/Lee/40 Virus	67
3.1.2	Erzeugung rekombinanter Influenza B/Lee Viren	70
3.2	**Identifikation des NS1 Proteins als Typ I IFN-Antagonisten**	**71**
3.2.1	Erzeugung eines NS1-defizienten Influenza B Virus (B/ΔNS1 Virus)	71
3.2.2	Die Replikation des B/ΔNS1 Virus ist attenuiert	73
3.2.3	Das B/NS1 Protein verhindert die Virus-vermittelte Aktivierung des IFN-ß Promotors	75
3.2.4	Das B/DNS1 Virus induziert Transkription und Expression von humanem IFN-ß	76
3.2.5	Das B/NS1 Protein inhibiert die Virus-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-3 und seine Assoziation mit dem CREB-bindenden Protein (CBP)	77
3.2.6	Die Infektion mit dem B/ΔNS1 Virus aktiviert die IRF-3 Kinase TBK-1	81
3.3	**Funktionelle Analyse der dsRNA-Bindung des B/NS1 Proteins und dessen Einfluss auf virale Replikation, Antagonisierung von IFN-ß und Inhibition von PKR**	**82**

3.3.1 Erzeugung von rekombinanten Influenza B Viren mit Mutationen in der RNA-Bindungsdomäne des B/NS1 Proteins 83
3.3.2 Der Verlust der dsRNA-Bindungsfähigkeit beeinträchtigt die virale Replikation der B/NS1 Virusmutanten in Wirten mit kompetentem IFN-System 85
3.3.3 Die dsRNA-Bindungskapazität des B/NS1 Proteins ist nicht entscheidend für die Inhibition der IFN-ß Induktion durch die B/NS1 Virusmutanten 87
3.3.4 Der Verlust der dsRNA-Bindungsfähigkeit des B/NS1 Proteins beeinflusst verschiedene Stadien der virusinduzierten IRF-3 Aktivierung 90
3.3.5 Die Bindung von dsRNA durch das B/NS1 Protein ist nötig für die Inhibition der Virus-vermittelten Aktivierung der Proteinkinase R 94
3.3.6 Herstellung eines Influenza B Virus mit C-terminal trunkiertem B/NS1 Protein 95
3.3.7 Die RNA-Bindungsdomäne des B/NS1Proteins ist ausreichend für eine effiziente virale Replikation 97
3.3.8 Die Virusmutante B/NS1-104 ist ein starker Induktor von Typ I IFN 98
3.3.9 Die dsRNA-Bindungsdomäne des B/NS1 Proteins ist ausreichend für die Inhibition der Proteinkinase R 100
3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse 101

4. DISKUSSION 104
4.1 Übersicht über die Ziele der Arbeit 104
4.2 Etablierung eines revers-genetischen Systems für Influenza B Viren 104
4.3 Identifizierung des B/NS1 Proteins als IFN-Antagonisten 105
4.4 Die dsRNA-Bindungskapazität des B/NS1 Proteins ist nicht ausschlaggebend für die Inhibition der IFN-ß Induktion aber essentiell für eine effiziente virale Replikation sowie die Inhibition der PKR Aktivierung 110
4.5 Ausblick 118

5. ZUSAMMENFASSUNG 121

6. LITERATURVERZEICHNIS 123

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 136

8. ANHANG 138

1. Einleitung

1.1 Das Influenza Virus

1.1.1 Taxonomie

Das Influenzavirus gehört zur Familie der *Orthomyxoviridae* (griech.: orthos = richtig, myxo = Schleim). Diese Familie umfasst die Influenza Virus Typen A, B und C sowie die Thogotoviren und die Isaviren. Während Influenza A Viren ein sehr breites Wirtsspektrum besitzen und neben dem Menschen auch andere Säuger, wie z.B. Schweine, Pferde und Seehunde sowie eine Vielzahl freilebender und domestizierter Vögel infizieren, kommen natürliche Infektionen mit dem Influenza B Virus nur bei Menschen und vermutlich Seehunden vor. Influenza C Virus Infektionen betreffen Menschen und Schweine, sind jedoch selten und von geringer epidemiologischer Bedeutung. Die verschiedenen Virus Typen lassen sich aufgrund der antigenen Eigenschaften des Nukleoproteins (NP) und des Matrixproteins (M1) unterscheiden. Die Influenza A Viren unterteilt man weiterhin in Subtypen, die sich durch die antigenen Eigenschaften der beiden Oberflächenproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) unterscheiden. Bis jetzt sind 16 verschiedene Hämagglutinine (H1 bis H16) und 9 verschiedene Neuraminidasen (N1 bis N9) bekannt. Die Benennung der Viren folgt einem von der WHO 1980 festgelegten Schema. Auf die Angabe des Virustyps (A, B oder C) folgt die Spezies, aus der das Virus isoliert wurde, der Ort der Erstisolation, die Nummer des Isolats, das Isolationsjahr und bei Influenza A Viren die Angabe des Subtyps. Bsp.: Influenza A/chicken/Hongkong/258/97 (H5N1); bei humanen Influenzaviren entfällt die Angabe der Spezies.

1.1.2 Morphologie

Bei Influenza A und B Viren handelt es sich um membranumhüllte Viren mit 8 Segmenten einzelsträngiger RNA, die negative Polarität besitzen. Die Partikel sind kugelig bis pleomorph mit einem Durchmesser von 80 bis 120 nm. In die von der Wirtszelle abgeleitete Hüllmembran (Kates et al., 1962) sind die zwei Glykoproteine Hämagglutinin und Neuraminidase inseriert. Das Hämagglutinin bildet Homotrimere und vermittelt Rezeptorbindung und Fusion, die Neuraminidase liegt als Homotetramer vor und ist für die Abspaltung endständiger N-Acetyl-Neuraminsäuren verantwortlich.

Ein weiteres Transmembranprotein der Influenza A Viren ist das M2-Protein, von dem wenige Homotetramere vorliegen, die Protonenkanalaktivität besitzen (Pinto et al., 1992, Sugrue & Hay, 1991). Bei Influenza B Viren findet man als weitere integrale Membranproteine das NB Protein und das BM2 Protein, das ebenfalls Ionenkanalaktivität besitzt (Betakova et al., 1996, Odagiri et al., 1999, Paterson et al., 2003). Die Innenseite der Membran ist mit dem Matrixprotein M1 ausgekleidet, welches weiterhin mit den 8 Ribonukleopartikeln (RNPs) assoziiert ist. Diese bestehen aus je einem vRNA-Strang, der in seiner gesamten Länge von Nukleoprotein (NP) bedeckt ist und außerdem einen Polymerasekomplex trägt (Compans et al., 1972). Weiterhin liegt in einer sehr geringen Kopienzahl das nukleäre Exportprotein (NEP/NS2) im Viruspartikel vor (Yasuda et al., 1993). Das Nichtstrukturprotein NS1 wird nicht in das Virus eingebaut, sondern findet sich nur in der infizierten Zelle.

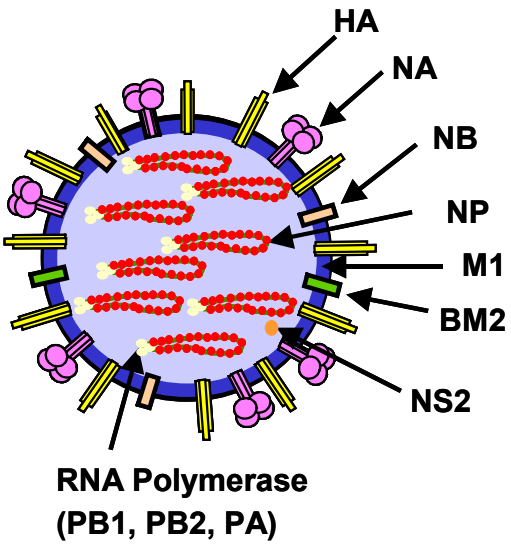


Abb. 1.1: Schematische Darstellung eines Influenza B Virus

1.1.3 Genomorganisation und kodierte Proteine

Die genetische Information der Influenza A und B Viren liegt auf 8 einzelsträngigen RNA-Segmenten von 0,9 bis 2,4 kb Länge, die einer Gesamtlänge von 13,6 kb (FluA) bzw. 14,6 kb (FluB) entsprechen. Die Orientierung der viralen RNA (vRNA) bezeichnet man als negativ, da von ihr Boten-RNA (mRNA) transkribiert wird, die nach Übereinkunft eine positive Orientierung besitzt. Als solche ist die vRNA per se nicht infektiös.

Der kodierende Teil jedes Segments wird von nichtkodierenden Bereichen flankiert. Die ersten 12 (FluA) bzw. 10 (FluB) Nukleotide am 3´-Ende und die ersten 13 (FluA) bzw. 10 (FluB) Nukleotide am 5´-Ende jeder vRNA sind in allen 8 Segmenten der Influenza A bzw. B Viren und auch zwischen verschiedenen Virus-Stämmen konserviert (Desselberger et al., 1980). Diese Bereiche dienen als Influenza-spezifische

Promotorstrukuren (Flick et al., 1996) für Transkription und Replikation durch die virale RNA-abhängige-RNA-Polymerase, die aus den Untereinheiten PB1, PB2 und PA besteht (Abb. 1.2).

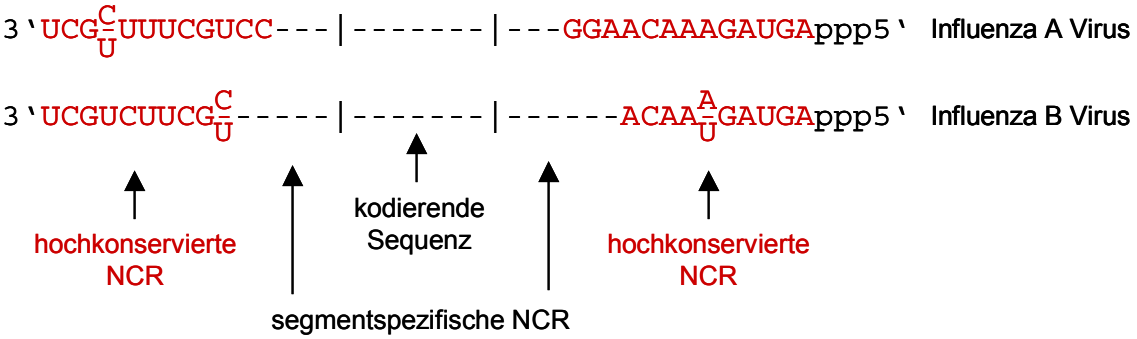


Abb. 1.2: Promotorregionen der vRNA-Segmente. Die terminalen 12 und 13 Nukleotide (Influenza A Virus) bzw. 10 Nukleotide (Influenza B Virus) der nichtkodierenden Bereiche (NCR) der vRNA sind hochkonserviert und dienen als virale Promotoren.

Für die Aktivität der viralen Promotorregion ist die Struktur der vRNA-Enden ausschlaggebend. Nach dem sogenannten „Korkenzieher-Modell" kommt es zu Basenpaarungen zwischen den 3´- und 5´- vRNA-Termini sowie zur Ausbildung von Haarnadelschleifen innerhalb der vRNA-Termini. Diese „Korkenzieher" Strukturen stabilisieren die Interaktion von Promotor und Polymerasekomplex und sind notwendig für Replikation und mRNA Synthese. Dieses Modell gilt auch für die cRNA-Enden (Neumann et al., 2004).

Die Segmente 1, 3, 4 und 5 kodieren jeweils für ein Protein: PB2, PA, HA, NP. Das Segment 2 kodiert für das PB1 Protein sowie bei der Mehrzahl der Influenza A Virus-Stämme für das proapoptotische PB1-F2 Protein, das über einen alternativen Leserahmen transkribiert wird (Chen et al., 2001). Neben dem NA Protein kodiert das Segment 6 der Influenza B Viren für das NB Protein (Shaw et al., 1983). Die beiden kleinsten Segmente sind bei beiden Virustypen bicistronisch organisiert und kodieren für je zwei Proteine: Segment 7 kodiert für das Matrixprotein M1 sowie das M2 Protein (FluA) bzw. das BM2 Protein (FluB). Segment 8 kodiert das Nichstrukturprotein NS1 und das nukleäre Exportprotein NS2/NEP (Inglis & Brown, 1981, Lamb & Lai, 1980). Dabei werden für die Translation der Proteine M2 und NEP gespleißte mRNAs verwendet, während die Transkription der BM2 mRNA aufgrund der Überlappung des M1 Stopkodons mit dem BM2 Startkodon über einen speziellen Stop-Start-

Mechanismus initiiert wird (Horvath et al., 1990). Die Funktionen und Eigenschaften der viralen Proteine sind in Tabelle 1.1 zusammengefasst.

Tab. 1.1: vRNA Segmente und kodierte Proteine der Influenza A und B Viren (Lamb & Krug, 2001)

	A/PR/8/34		B/Lee/40		
Seg.	vRNA (nt)	Kodiertes Protein (aa)	vRNA (nt)	Kodiertes Protein (aa)	Funktionen
1	2341	**PB2** (759)	2396	**PB2** (769)	Untereinheit der viralen RNA-Polymerse, bindet mRNA-caps;
2	2341	**PB1** (757)	2368	**PB1** (752)	Katalytische Untereinheit der viralen RNA-Polymerase, Endonukleaseaktivität;
		PB1-F2 (87)			Mitochondriale Lokalisation, Induktion von Apoptose;
3	2233	**PA** (716)	2304	**PA** (726)	Untereinheit der viralen RNA-Polymerase;
4	1778	**HA** (566)	1882	**HA** (584)	Hämagglutinin,Typ I Membranpr., Rezeptorbindung, Membranfusion, Induktion neutr. Ak
5	1565	**NP** (498)	1841	**NP** (560)	Nukleoprotein, Enkapsidierung von vRNA und cRNA, über NLS Kernlokalisation der RNPs;
6	1413	**NA** (454)	1557	**NA** (466)	Neuraminidase, Typ II Membranprotein
				NB (100)	Strukturprotein
7	1027	**M1** (252)	1191	**M1** (248)	Matrixprotein, wichtig für Morphogenese;
		M2 (97)			Ionenkanal, Ansäuerung der Virionen, Schutz der HA-Konformation;
				BM2 (109)	Ionenkanal
8	890	**NS1** (230)	1096	**NS1** (281)	Post-transkriptionaler Regulator und IFN-Antagonist (FluA), inhibiert PKR Aktivierung;
		NS2/NEP (121)		**NS2/NEP** (122)	nuklearer Exportfaktor

1.1.4 Replikation

Um einen produktiven Vermehrungszyklus zu durchlaufen, sind die Influenza Viren auf eine Vielzahl von Funktionen der Wirtszelle in Nukleus und Zytoplasma angewiesen. So bestehen nur im Kern der Wirtszelle die geeigneten Voraussetzungen für Transkription und Replikation des viralen Genoms durch die virale RNA-Polymerase. Für die Synthese der viralen Proteine sind die Influenza Viren auf die zelluläre Translationsmaschinerie angewiesen. Liegen alle viralen Bestandteile in ausreichender Menge in der Zelle vor, assemblieren diese und das Virion wird aus der Zelle über Knospung freigesetzt (Abb. 1.3).

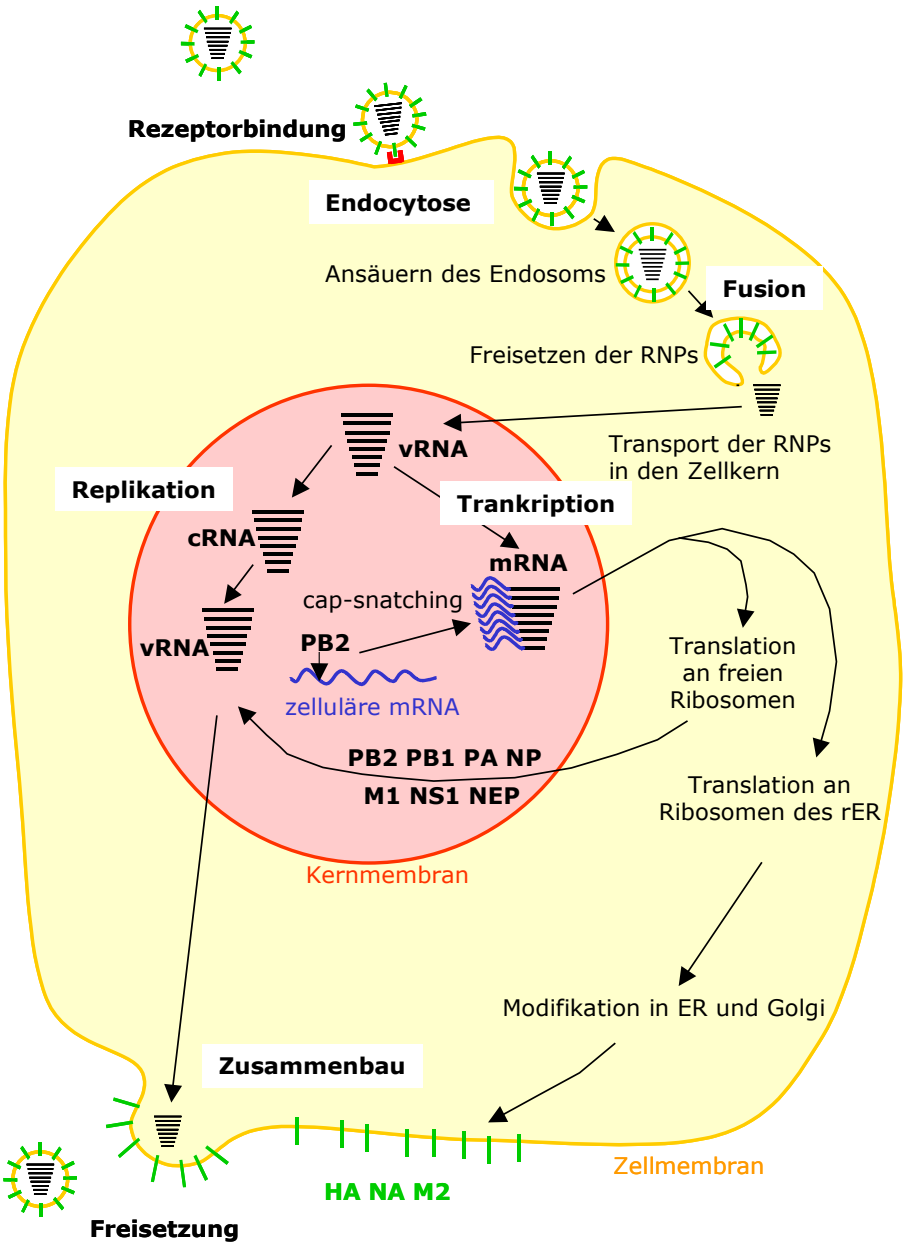


Abb. 1.3: Replikationsschema des Influenza A Virus (nach D. Heuer).

Um in die Zelle zu gelangen, bindet das Virus über sein Oberflächenglykoprotein HA an endständige N-Acetyl-Neuraminsäuren zellulärer Rezeptoren (Skehel & Wiley, 2000). Die Viren werden anschließend über Rezeptor-vermittelte Endozytose internalisiert (Matlin et al., 1981). Die Ansäuerung der späten Endosomen induziert eine Konformationsänderung des HA, so dass das hydrophobe Fusionspeptid der HA2-Untereinheit exponiert wird. Es dringt in die Endosomenmembran ein und durch weitere Umlagerungen im HA kommt es zur Fusion dieser Membran mit der viralen Hüllmembran (Skehel & Wiley, 2000). Gleichzeitig wird im Inneren des Virus der pH-Wert durch Einstrom von Protonen über die M2-Ionenkanäle erniedrigt. Dies löst die Bindung zwischen Matrixpoteinen und den Ribonukleopartikeln (RNPs), die daraufhin über die Fusionsporen ins Zytosol freigesetzt werden können (Helenius, 1992). Bei Influenza B Viren wird dieser Prozess vermutlich über das BM2-Protein vermittelt (Mould et al., 2003). Über die Blockade der Ionenkanalfunktion des M2 durch Amantadin kann die Disassemblierung von Influenza A Viren verhindert werden (Hay, 1992).

Die RNPs gelangen aufgrund der Kernlokalisationssequenzen (NLS) der Nukleoproteine und Polymerasen in den Zellkern, in dem Transkription und Replikation stattfinden (Wang et al., 1997, Whittaker et al., 1996). Das Virus bringt über die RNPs seine eigene RNA-abhängige-RNA-Polymerase in die Zelle ein, die die viralen Gensegmente transkribiert und repliziert. Influenza Viren benutzen einen sehr ungewöhnlichen Weg zur Initiation von virusspezifischer Transkription. Die PB2-Untereinheit der viralen Polymerase erkennt und bindet m^7Gpppm-Caps neusynthetisierter zellulärer mRNAs. Über die Endonukleaseaktivität von PB1 werden die Cap-Strukturen der mRNAs nach einigen Nukleotiden abgespalten, an das 3´-Ende der vRNA angelagert und das freie 3´OH-Ende der Cap-Struktur für die Initiation der Transkription viraler mRNA genutzt (Neumann et al., 2004). Die PB1-Untereinheit verlängert die Nukleotidkette bis zu einer Abfolge von mehreren Uridinen ca. 15 bis 22 Nukleotide vor dem 5´-Ende der vRNA. Dort kommt es zum sogenannten „Stottern“ der Polymerase und somit zur Polyadenylierung (Luo et al., 1991). Die mRNAs für die M2 und NS2/NEP Proteine werden von den zellulären Spleißosomen prozessiert. Die viralen mRNAs gelangen über die Kernporen ins Zytoplasma. Dort werden am rauhen endoplasmatischen Retikulum (rER) die viralen Membranproteine synthetisiert, während die restlichen Proteine an freien Ribosomen translatiert werden. Aufgrund

karyophiler Sequenzen werden die Proteine PB2, PB1, PA, NP, M1 und NS1 in den Kern importiert.

Das Umschalten von Transkription zu Replikation wird vermutlich durch das Nukleoprotein reguliert. Liegt Nukleoprotein in ausreichender Menge im Kern vor, verhindert es entweder das Stottern der Polymerase und somit die Polyadenylierung und/oder es schützt durch Enkapsidierung die neusynthetisierte RNA vor Degradation. Dies ermöglicht die Synthese eines vollständigen Gegenstranges der vRNA. Dieser Gegenstrang (cRNA) dient dann wiederum als Vorlage für die Polymerisation neuer vRNAs. Für beide Vorgänge benötigen die viralen Polymerasekomplexe keinen Primer. Sowohl cRNA als auch vRNA werden im Gegensatz zur mRNA schon während ihrer Synthese vollständig mit Nukleoprotein verpackt (Lamb & Krug, 2001, Neumann et al., 2004). Zusammen mit den Polymerasekomplexen bilden sich neue RNPs, die in der späten Infektionsphase durch Interaktion mit dem Matrixprotein und dem nukleären Exportprotein NEP aus dem Zellkern exportiert werden (O'Neill et al., 1998, Paragas et al., 2001). Der Exportprozess wird dabei von der Raf/MEK/ERK Signalkaskade beeinflusst (Pleschka et al., 2001).

Auch das NS1-Protein gelangt über ein nukleäres Lokalisationssignal in den Kern. Das NS1 Protein der Influenza A Viren inhibiert dort Spleißen und Polyadenylierung von prä-mRNAs sowie den Kernexport zellulärer mRNAs (Chen et al., 1999, Fortes et al., 1994, Nemeroff et al., 1998), eine Fähigkeit, die das homologe Protein der Influenza B Viren vermutlich nicht besitzt (Wang & Krug, 1996). Weiterhin bindet das A/NS1 Protein Bereiche der 5'-NCRs viraler mRNAs und den Translationsinitiationsfaktor eIF4GI (Aragon et al., 2000, Burgui et al., 2003, Park & Katze, 1995). Diese Interaktionen und die nukleäre Retention zellulärer mRNAs führt zu einer verstärkten Translation viraler mRNAs. Eine weitere Funktion des A/NS1 Proteins ist die Inhibition der antiviralen Interferon(IFN)-Antwort (Garcia-Sastre et al., 1998). Diese IFN-antagonistischen Eigenschaften werden in Kap. 1.3.1 näher beschrieben.

Beim Transport der viralen Membranproteine von rER über Golgi-Apparat und Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) an die Zellmembran werden verschiedene Modifikationen, wie N-Glykosylierungen mit komplexen und mannosereichen Zuckerseitenketten sowie Palmitoylierungen, angefügt. (Lamb & Krug, 2001). Die endständigen Neuraminsäuren der komplexen Zucker werden von der Neuraminidase entfernt, um eine Bindung der

HAs an diese Zuckerseitenketten und somit eine Quervernetzung zu vermeiden. Im TGN kann das HA durch die Subtilisin-ähnliche Protease Furin in HA1 und HA2, welche über eine Disufidbrücke verbunden bleiben, gespalten werden, sofern ein multibasisches Spaltmotiv vorhanden ist (Stieneke-Grober et al., 1992). Dies ist allerdings nur bei einigen hochpathogenen Influenza A Virus-Stämmen der Subtypen H5 und H7 der Fall. Das HA der übrigen Subtypen und der Influenza B Viren besitzt ein monobasisches Spaltmotiv und wird daher auf der Zelloberfläche oder nach Freisetzung des Virions durch exogene Proteasen (z.B. Protease Clara oder Plasmin in der Lunge) gespalten (Kido et al., 1999). In Zellkultur kann das HA durch Trypsin gespalten werden. Die Prozessierung des HA ist unabdingbar für die Infektiosität des Virus (Klenk & Garten, 1994), da nur so das Fusionspeptid exponiert werden kann.

Befinden sich die Membranproteine in ausreichender Menge in der Zellmembran, assemblieren dort alle weiteren Virusbestandteile und das Virus kann über Knospung freigesetzt werden. Dabei ist das BM2 Protein wichtig für die Inkorporation der vRNPs in die Virionen (Imai et al., 2004). Das Matrixprotein ist als Bindungspartner von RNPs, HA, NA und Membran die treibende Kraft im Knospungs-Prozess (Gomez-Puertas et al., 2000). Da sich auf der Zelloberfläche Zucker mit endständigen Neuraminsäuren befinden, ist die Neuraminidaseaktivität wichtig, um ein Zurückhalten der neugebildeten Viren an der Zelle zu verhindern (Palese et al., 1974).

1.1.5 Pathogenese und Epidemiologie der Influenza A und B Viren

Influenza A und B Viren sind die Erreger der Virusgrippe. Sie werden durch Aerosole übertragen und infizieren Epithelzellen des oberen und unteren Respirationstraktes. Die allgemeinen Symptome einer unkomplizierten Influenza sind Kopfschmerzen, Schüttelfrost, Husten, Muskel- und Gliederschmerzen und Fieber bis 41°C. Komplikationen kommen vorwiegend bei älteren und immunsupprimierten Personen vor. Bei schwerem Krankeitsverlauf kann es zu einer viralen interstitiellen Lungenentzündung kommen, die bis zu vier Wochen anhalten kann. Auch bakterielle Überinfektionen werden durch das vorgeschädigte Epithel begünstigt. Pneumonie, Meningitis, Enzephalitis, Kreislaufschäden und Myokarditis können im schlimmsten Fall zum Tod führen. Anhand des klinischen Bildes lassen sich Influenza A und B Virus Infektionen nicht unterscheinen. Typisierungen zeigten, dass Influenza A und B Viren

zu unterschiedlichen Anteilen kozirkulieren, wobei in manchen Jahren auch Influenza B Viren dominierten (Tab. 1.2).

Saison	03/04	02/03	01/02	00/01	99/00	98/99	97/98
Typ A (%)	99	86	47	95,5	99,8	67	99
Typ B (%)	1	14	53	4,5	0,2	33	1
Saison	96/97	95/96	94/95	93/94	92/93	91/92	90/91
Typ A (%)	45	97	21	100	16	100	15
Typ B (%)	55	3	79	0	84	0	85

Tab. 1.2: Verteilung von Influenza A und B Viren seit 1990/91 in Deutschland (dominierender Virustyp: rot) (Saisonabschlussbericht der AGI, 2002/03 und 2003/04).

Trotz der möglichen Immunprophylaxe durch Impfungen und der seit kurzem für die Therapie erhältlichen antiviralen Medikamente stellen Influenza Virus Infektionen ein ernstzunehmendes Problem des Gesundheitswesens dar. Allein in Deutschland kam es während des Winterhalbjahres 2002/03 zu geschätzten 4,5 - 5 Millionen Erkrankungen, 1,5 - 2 Millionen Arbeitsunfähigkeiten, 25-30.000 Hospitalisierungen und 12-20.000 Todesfällen (Saisonabschlussbericht der AGI, 2002/03).

Neben den fast alljährlichen Grippeepidemien (interpandemische Influenza), gab es im letzten Jahrhundert auch drei große Pandemien. Pandemien werden durch das Auftreten eines neuen Influenza A Virus Subtyps verursacht, gegen dessen Oberflächenantigene in der Bevölkerung noch keine schützende Immunität vorhanden ist. Somit kann sich das Virus ungehindert ausbreiten. Diese drastische Änderung der antigenen Eigenschaften nennt man „antigenic shift“. Mit der „Spanischen Grippe“, die weltweit über 20 Millionen Tote forderte, wurde die Bevölkerung zum ersten Mal mit einem Virus des Subtyps H1N1 konfrontiert. Das ursprünglich vermutlich rein aviäre H1N1 Virus war unter Beibehaltung aller 8 Segmente auf Schwein und Mensch übertragen worden und hatte durch weitere Mutationen eine erhöhte Pathogenität und die Fähigkeit zur Transmission von Mensch zu Mensch erworben (Taubenberger et al., 1997). Die Pandemie im Jahr 1957 („Asiatische Grippe“) wurde von einem Virus verursacht, das neben 5 Segmenten des H1N1 Virus die neu eingeführten Segmente PB1, HA und NA eines aviären H2N2 Virus besaß (Scholtissek et al., 1978). Eine solche Reassortante entsteht, wenn eine Zelle gleichzeitig mit Viren unterschiedlicher Subtypen infiziert ist und die daraus hervorgehenden Viren Segmente beider Ausgangsviren tragen (Palese,

1977). Auch bei dem Erreger der „Hong-Kong-Grippe“ von 1968 handelte es sich um eine Reassortante. In diesem Fall wurde in das zirkulierende Virus das PB1- und das HA-Segment eines Entenvirus neu eingeführt, wodurch sich der Subtyp H3N2 ergab (Kawaoka et al., 1989). 1977 tauchte erneut ein H1N1 Virus auf, das genetisch den vor 1957 zirkulierenden Viren glich und die Zwischenzeit in gefrorenem Zustand überdauert zu haben scheint. Seit dieser Zeit zirkulieren H3N2 und H1N1 Viren bis in die Gegenwart hinein.

1997 wurden in Hong-Kong aviäre H5N1 Viren direkt von erkranktem Geflügel auf Menschen übertragen, von denen 18 erkrankten und 6 verstarben. Die hohe Pathogenität dieser Viren ist vermutlich auf die spezifischen Eigenschaften mehrerer viraler Proteine zurückzuführen. Neben Mutationen des PB2 Protein und dem multibasischen Spaltmotiv des HA wurde auch die außergewöhnlich hohe Resistenz der H5N1 Viren gegen die antiviralen Zytokine IFN-α, IFN-γ und TNF-α als mögliche Pathogenitätsdeterminante identifiziert (Hatta et al., 2001, Seo et al., 2002). Seit 2003 wurden in Südostasien bislang weitere 108 Erkrankungen und 54 Todesfälle durch H5N1 Viren registriert (WHO, Stichtag: 28. Juni 2005). Sollte das Virus über Mutationen die Fähigkeit zur effektiven Mensch-zu-Mensch Transmission erwerben, könnte dies eine neue Pandemie auslösen.

Da Influenza B Viren weder über verschiedene Subtypen noch über ein tierisches Reservoir verfügen, geht von ihnen höchstwahrscheinlich keine pandemische Gefahr aus. Jedoch spielen für Influenza B Viren, wie auch für Influenza A Viren, Mutationen der Oberflächenproteine eine wichtige Rolle. Können Viren mit veränderten antigenen Epitopen der Immunantwort entgehen, haben sie gegenüber den anderen Viren einen Selektionsvorteil und die Mutationen werden fixiert. Dies führt dazu, dass die zirkulierenden Virusstämme ihre antigenen Eigenschaften kontinuierlich verändern. Dieser Vorgang wird als „antigenic drift“ bezeichnet. Aus diesem Grund müssen die zur Impfung verwendeten Virusstämme im Abstand von ein bis drei Jahren auf Empfehlung der WHO neu an die zirkulierenden Viren angepasst werden.

1.2 Das Typ I Interferon System

Da sich diese Arbeit mit der Interaktion von Influenza B Viren mit dem Typ I Interferon(IFN)-Systems beschäftigt, soll das folgende Kapitel einen kurzen Überblick über das IFN-System und seine Bedeutung im Immunsystem geben. Das Immunsystem lässt sich in zwei Bereiche aufteilen. Die spezifische, adaptive Immunantwort, die mikrobielle Erreger über humorale (Antikörper) bzw. zelluläre (zytotoxische T-Zellen) Mechanismen bekämpft und die evolutionär ältere angeborene Immunantwort, die Pathogen-assoziierte Strukturen (PAMPs = „pathogen associated molecular patterns“) als fremd erkennt und antimikrobielle Mechanismen in Gang setzt. Beispiele solcher Mechanismen sind natürliche Killerzellen, das Komplementsystem und mononukleäre Phagozyten, wie Granulozyten, Monozyten und Makrophagen (Janeway et al., 2001). Auch das Typ I IFN System ist ein wichtiger Teil der angeborenen Immunantwort und ermöglicht es höheren Vertebraten, sehr schnell auf eine Gefährdung durch Pathogene, wie z. B. Viren, zu reagieren. Die überlebenswichtige Bedeutung des IFN-Systems wird durch die Tatsache veranschaulicht, dass Menschen und Mäuse mit einem Defekt des INF-α/ß Signalwegs eine hohe Suszeptibilität gegenüber viralen Infektionen zeigten (Dupuis et al., 2003, Fiette et al., 1995, Muller et al., 1994). Bereits 1957 identifizierten Isaacs und Lindenmann das IFN als einen pH-resistenten Faktor, der von Zellen nach Behandlung mit Hitze-inaktiviertem Influenza A Virus sezerniert wurde und in der Lage war, die Replikation von homo- und heterologen Viren zu inhibieren (Isaacs & Lindenmann, 1957). Mittlerweile sind aus der Familie der humanen Typ I IFN-Gene ein IFN-ß Gen, 13 IFN-α Isotypen und je eine IFN-ω, -ε und -κ Gen bekannt, welche in einem Großteil der Zelltypen induziert werden können (Pestka et al., 2004).

Zusätzlich zur direkten antiviralen Wirkung moduliert IFN-α/ß wichtige Prozesse der Immunantwort, wie die Differenzierung von plasmazytoiden Dendritischen Zellen (pDC) und myeloiden (m)DCs, über DCs gesteuerte Th1/$CD8^+$-T-Zellantwort, Cross-Präsentation und Cross-Priming, verstärkte Expression von kostimulatorischen Faktoren und MHC Molekülen, Aktivierung von NK-Zellen und Induktion der primären Antikörperantwort. IFN-α/ß stellt damit ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort dar (Le Bon et al., 2003, Le Bon et al., 2001, Montoya et al., 2002).

Eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des Typ I IFN-Systems spielen PAMPs wie Lipopolysaccharid (LPS) oder virale doppelsträngige (ds)RNA. Diese können sowohl extrazellulär über TLRs („Toll-like Receptors“) als auch intrazellulär über bestimmte Sensorproteine detektiert werden. Die folgenden Ausführungen fokussieren auf die Initiierung der IFN-Antwort durch intrazelluläre dsRNA, die bei viralen Infektion von Epithelzellen entscheidend ist.

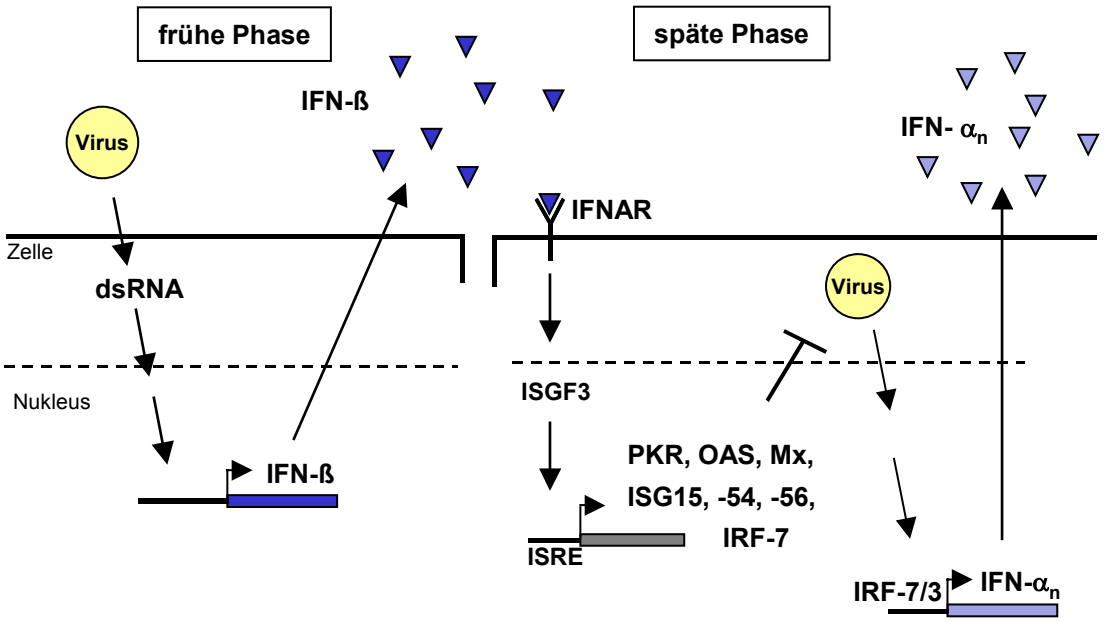


Abb. 1.4: Aktivierung des Typ I IFN-Systems in Epithelzellen durch virale Infektion. Die IFN-Antwort gliedert sich in eine frühe Phase der transkriptionellen Aktivierung von IFN-ß sowie eine späte Phase, in der über IFN-ß-Signalweg stimulierte Gene (ISGs) exprimiert werden. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-7 induziert die IFN-α_n Gene und verstärkt die IFN-Antwort (nach Marie et al.,1998)

Die IFN-Antwort lässt sich in zwei Phasen einteilen (Abb. 1.4). In der frühen Phase kommt es nach Detektion einer viralen Infektion zur transkriptionellen Aktivierung von IFN-ß. In der späten Phase bindet das sezernierte IFN-ß an den $IFN_{\alpha/\beta}$-Rezeptor was die Transkription von Genen induziert, die unter anderem für antivirale Proteine, wie PKR oder OAS kodieren (Samuel, 2001). Die Expression und Aktivierung von IRF-7 führt weiterhin zu einer positiven Verstärkung des Signals durch Induktion von IFN-α Genen (Marie et al., 1998). In den folgenden Abschnitten werden die einzelnen Phasen der IFN-Antwort und die Wirkung einiger antiviraler Proteine detaillierter beschrieben.

1.2.1 Transkriptionelle Aktivierung des IFN-ß Gens

Die Aktivierung des Typ I IFN-Systems (Abb. 1.5) setzt zunächst das Erkennen des in den Organismus eingedrungenen Virus voraus. Charakteristisches Merkmal einer Virusinfektion ist das Auftreten von dsRNA Molekülen in der Zelle. Der Ursprung der dsRNAs liegt bei Reoviren und Retroviren vermutlich in der Ausbildung von Sekundärstrukturen der viralen mRNAs. Bei einzelsträngigen (ss)RNA-Viren könnten dsRNA-Intermediate bei der Synthese der komplementären genomischen und antigenomischen RNAs entstehen, während dsRNA bei dsDNA-Viren vermutlich durch Transkripte gebildet werden kann, die von gegenläufigen Leserahmen entstammen (Jacobs & Langland, 1996, Majde, 2000).

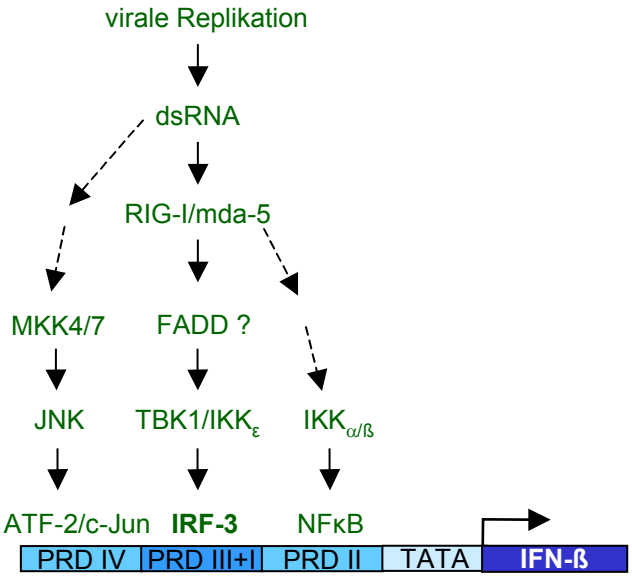


Abb. 1.5: Der IFN-ß Promotor wird durch die koordinierte Bindung der Transkriptionsfaktoren IRF-3, ATF-2/c-Jun und NFκB induziert.

Mögliche Detektoren dieser intrazellulären dsRNAs sind die kürzlich identifizierten DExD/H-box Helicasen RIG-I und mda-5 (Andrejeva et al., 2004, Yoneyama et al., 2004). Diese aktivieren über FADD und/oder andere bislang unbekannte Proteine die ubiquitäre Proteinkinase TBK-1 sowie die induzierbare Kinase IKK_{ε}, welche wiederum den Transkriptionsfaktor IRF-3 durch Phosphorylierung aktivieren (Balachandran et al., 2004, Fitzgerald et al., 2003, McWhirter et al., 2004, Sharma et al., 2003). Die Phosphorylierung von IRF-3 führt zur Homodimerisierung, zur Translokation von IRF-3 in den Nukleus und zu dessen Assoziation mit dem Transkriptionskoaktivator CBP („creb binding protein“). (Lin et al., 1998, Sato et al., 1998, Weaver et al., 1998, Yoneyama et al., 1998). Auch die Transkriptionsfaktoren ATF-2/c-Jun und NFκB

werden im Verlauf einer Virusinfektion von den Kinasen JNK bzw. $IKK_{\alpha/ß}$ aktiviert (Chu et al., 1999). Durch koordinierte Bindung der Transkriptionsfaktoren an spezifische Sequenzen im IFN-ß Promotor, die auch als PRDs („positive regulatory domains“) bezeichnet werden, konstituiert sich ein sogenanntes „Enhanceosom“. Dadurch wird die Transkription des IFN-ß Gens induziert und IFN-ß sezerniert (Du & Maniatis, 1992, Juang et al., 1998, Kim & Maniatis, 1997, Visvanathan & Goodbourn, 1989, Wathelet et al., 1998). IRF-3 und IRF-7 sind dabei entscheidende Transkriptionsfaktoren (Honda et al., 2005, Peters et al., 2002). Zusätzlich zu IFN-ß werden bereits in der frühen Phase das IFN-α_1 Gen sowie einige IRF-3-responsive Gene, wie ISG56, -54 und –15 induziert (Guo et al., 2000b, Sen, 2001).

1.2.2 IFN-α/ß Signalweg

In der späten Phase der IFN-Antwort (Abb. 1.6) führt die Bindung des sezernierten IFN-α/ß an den $IFN_{\alpha/\beta}$-Rezeptor (IFNAR), der aus den Untereinheiten IFNAR1 und IFNAR2c besteht, zur Aktivierung der assoziierten Tyrosinkinasen Jak1 und Tyk2. Diese phosphorylieren die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT2, welche daraufhin Heterodimere bilden und als Komplex mit dem Transkriptionsfaktor IRF-9 (p48) in den Kern translozieren. Dieser auch als ISGF3 bezeichnete Komplex bindet an sogenannte ISRE-Sequenzen („interferon stimulated response elements“) im Promotor von durch IFN-α/β stimulierten Genen und induziert dadurch deren Transkription (Platanias, 2005). Unter diesen über 100 Genprodukten befinden sich viele antivirale Proteine, wie zum Beispiel die Proteinkinase R (PKR), 2’,5’-Oligoadenylatsynthetasen

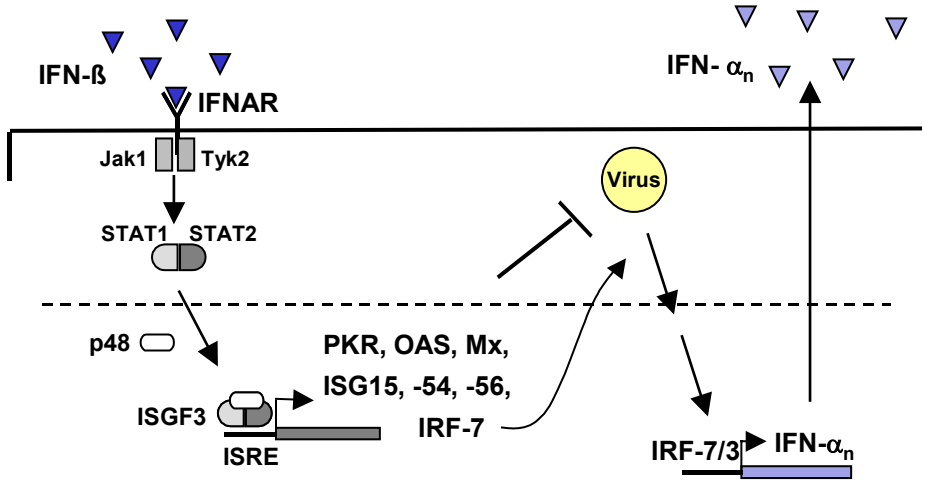


Abb. 1.6: Nach Bindung von IFN-ß wird über den Jak/STAT-Signalweg die Expression IFN-stimulierter Gene induziert. Über IRF-7 werden die IFN-α Gene induziert.

(OAS), Mx-Proteine, ISG56 und ISG15. Der durch diese Proteine in der Zelle etablierte antivirale Status führt zur Inhibition viraler Replikation (Der et al., 1998, Samuel, 2001). Darüber hinaus wird durch den Jak/STAT-Signalweg die Expression des Transkriptionsfaktors IRF-7 induziert, der nach Virus-vermittelter Aktivierung die Transkription weiterer IFN-α Isotypen induziert und somit zu einer positiven Verstärkung des IFN-Signals führt (Marie et al., 1998).

1.2.3 Antivirale Wirkung IFN-induzierter Proteine

Wie bereits angesprochen, induziert IFN-α/ß die Expression einer Vielzahl von antiviralen Proteinen. Für Proteine wie PKR, OAS, Mx-Proteine, ISG56 und ISG15 sind die antiviralen Eigenschaften bekannt, vermutlich gibt es jedoch noch weitere bislang unbekannte antivirale Proteine. Damit verfügt die Zelle über ein breites Repertoire von Mechanismen, um die Replikation unterschiedlicher Viren zu inhibieren. Die Eigenschaften einiger antiviraler Proteine sollen im folgenden genauer beschrieben werden.

Die dsRNA-abhängige Serin/Threonin Proteinkinase R (PKR) spielt eine zentrale Rolle in der antiviralen Antwort, da sie die zelluläre Translationsmaschinerie und somit auch die Synthese viraler Proteine inhibieren kann. Die latent im Zytoplasma vorliegende PKR bindet über zwei dsRNA-Bindungsdomänen im N-Terminus an dsRNA, die während einer viralen Infektion gebildet wird. Dies führt zur Dimerisierung und *trans*-Autophosphorylierung verschiedener Serin und Threonin Seitenketten (Samuel, 2001). Die aktivierte PKR ist so in der Lage, neben anderen Substraten, wie z.B. IκB, auch die α-Untereinheit des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors 2 (eIF2α) an Serin 51 zu phosphorylieren (Pathak et al., 1988). Diese Phosphorylierung verhindert den Austausch des an eIF2α gebundenen GDPs zu GTP, wodurch nicht mehr genügend eIF2α-GTP für die korrekte Konstituierung des Translationsinitiationskomplexes zur Verfügung steht (Samuel, 1993). Dies hat die Inhibition der zellulären und viralen Proteinsynthese zur Folge. Da PKR nicht nur durch IFN-α/ß induziert, sondern auch konstitutiv exprimiert wird, kann dieser antivirale Mechanismus sehr schnell in Gang gesetzt werden (Samuel, 2001).

Ein weiterer durch dsRNA aktivierter antiviraler Mechanismus ist die Degradation von RNA durch das 2',5'-Oligoadenylatsynthetasen(OAS)/RNaseL-System (Samuel, 2001).

Die IFN-induzierbaren OAS, die in drei Varianten unterschiedlicher Größe vorliegen, katalysieren nach Aktivierung durch dsRNA die Synthese von Oligoadenylat-Molekülen, die über 2',5'-Phosphodiesterverbindungen verknüpft sind (2-5A). Diese 2-5A Moleküle aktiveren die konstitutiv exprimierte Endoribonuklease RNaseL, welche daraufhin virale und zelluläre RNAs, einschließlich der ribosomalen RNA, degradiert (Kerr & Brown, 1978, Rebouillat & Hovanessian, 1999).

Die Mx-Proteine gehören zur Familie der Dynamin-ähnlichen GTPasen. Das humane MxAProtein ist im Zytoplasma lokalisiert. Die Expression des MxA Proteins kann die Replikation einiger Viren der Orthomyxoviridae, Paramyxoviridae, Bunyaviridae und Rhabdoviridae inhibieren. Für die Infektion mit Orthomyxo- und Bunyaviren konnte gezeigt werden, dass das MxA Protein den intrazellulären Transport der Ribonukleopartikel inhibiert. Für die anderen Virusfamilien ist der Wirkmechanismus des MxA Proteins noch nicht bekannt (Haller & Kochs, 2002).

ISG15 kodiert für ein Ubiquitin-ähnliches Protein von 15 kD, das durch IFN-α/ß und direkt durch Virusinfektion induziert wird (Der et al., 1998, Haas et al., 1987, Yuan & Krug, 2001). Die Verknüpfung von ISG15 mit Proteinen (ISGylierung) in Virus-infizierten oder IFN-α/ß-stimulierten Zellen wird durch das E1 Enzym UBE1L, das E2 Enzym UbcH8 und eine weitere E3 Ligase vermittelt (Yuan & Krug, 2001, Zhao et al., 2004). Als Zielproteine wurden konstitutiv exprimierte sowie IFN-stimulierte Protein wie z. B. PKR, MxA, Serpin 2a, Jak1, STAT1, PLCγ1 und Erk1/2 identifiziert (Zhao et al., 2005). Die ISGylierung wird negativ reguliert von UBP43 (USP18), einer ISG15 dekonjugierenden Protease. Studien mit UBP43 knock-out Mäusen zeigten, dass eine gesteigerte ISGylierung zu einer Verstärkung des Jak/STAT Signalweges und vermehrter Expression von ISGs führt (Malakhova et al., 2003) sowie die Replikation des Virus der Lymphocytären Choriomeningitis (LCMV) inhibiert (Ritchie et al., 2004). Infektionsversuche mit ISG15 Knock-out Mäusen zeigten jedoch weder eine verstärkte Replikation von LCMV oder Respiratorischen Syncytialviren noch eine gesteigerte Expression von STAT1 Zielgenen (Osiak et al., 2005).

ISG56 wird durch IFN-α/ß oder unabhängig von IFN direkt durch eine virale Infektion induziert (Der et al., 1998, Guo et al., 2000b). Das von ISG56 kodierte p56 Protein inhibiert die Translation durch Interaktion mit der p48 Untereinheit des Translationsinitiationsfaktors eIF-3. Die verringerte Translation könnte antiviral wirken,

eine direkte Inhibition der Replikation konnte jedoch zumindest für VSV und EMCV nicht gezeigt werden (Guo et al., 2000a).

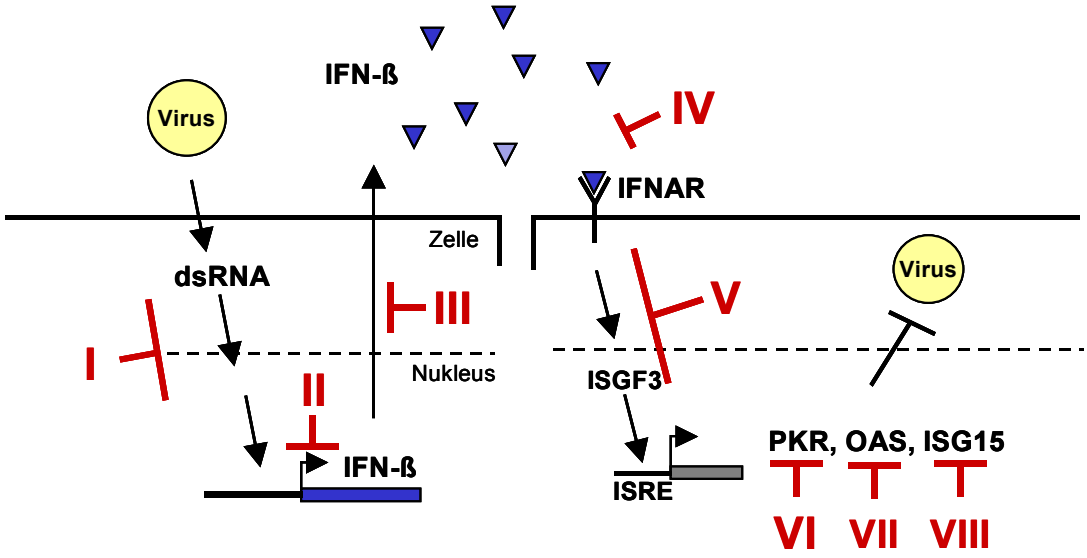
1.2.4 Induktion von IFN-α/ß in plasmazytoiden Dendritischen Zellen (pDCs)

Die oben beschriebene Induktion von IFN-ß in Epithelzellen ist vor allem lokal wirksam und induziert die Etablierung eines antiviralen Status in den betroffenen Zellen, der die virale Replikation einschränkt. Dagegen führt die Induktion von IFN-α/ß in pDCs zur Sekretion großer Mengen IFN-α/ß, die systemisch wirksam sind. Neben intrazellulärer viraler dsRNA gibt es noch weitere Auslöser für die Induktion von IFN-α/ß in pDCs. Extrazelluläre dsRNA kann IFN-ß über die Bindung an TLR3 induzieren (Oshiumi et al., 2003). Auch die Bindung von einzelsträngiger (ss)RNA an die endosomalen Rezeptoren TLR7/TLR8 oder von CpG-DNA an TLR9 in pDCs führt zur Sekretion von IFN-α. Dabei werden über das Adaptorprotein MyD88 Signalwege aktiviert, welche die Transkriptionsfaktoren IRF-7 und/oder IRF-5 aktivieren (Diebold et al., 2004, Heil et al., 2004, Honda et al., 2005, Schoenemeyer et al., 2005). In pDCs wird IRF-7 im Gegensatz zu Epithelzellen konstitutiv exprimiert. Daher kann sehr schnell die Expression großer Mengen IFN-α induziert werden, wodurch pDCs den größten Anteil von IFN-α im Körper produzieren (Barchet et al., 2002, Izaguirre et al., 2003). Dies und die Tatsache, dass pDCs von vielen Viren, wie z. B. Herpes Simplex Virus 1 (Krug et al., 2004), Influenza A Virus (Diebold et al., 2004, Lund et al., 2004), Sendai Virus (Hornung et al., 2004) und Vesikuläres Stomatitis Virus (Lund et al., 2004) aktiviert werden, macht sie zu einem wichtigen antiviralen Alarmsystem.

1.3 Virale Antagonisten des Typ I IFN-Systems

Angesichts der Vielzahl antiviraler Mechanismen ist es nicht verwunderlich, dass sich auch auf Seiten der Viren im Laufe der Koevolution mit ihren jeweiligen Wirten ein breites Spektrum IFN-antagonistischer Strategien ausbildete. Die Effizienz dieser Strategien beeinflusst nicht nur die Replikationkapazität der Viren, sondern ist auch eine wichtige Determinante der Virulenz und des Wirtspektrums. Letztendlich entscheidet das Wechselspiel zwischen Virus und Wirt über Krankheitsverlauf und Pathogenese. Der folgende Abschnitt soll einen kurzen Überblick über die IFN-

antagonistischen Proteine verschiedener RNA- und DNA-Viren geben. Diese sind in der Lage unterschiedliche Phasen der IFN-Antwort, wie die Induktion von IFN-α/ß, den IFN-α/ß Signalweg, oder die Wirkung antiviraler Proteine inhibieren (Abb. 1.7) (Conzelmann, 2005, Garcia-Sastre, 2002, Garcia-Sastre, 2004, Samuel, 2001).



I. Inhibitoren der IFN-ß Induktion: NS1 (Influenza A V.), E3L (Vaccinia V.), P/p24 (Borna V.), VP35 (Ebola V.), ML (Thogoto V.), V (Simian V. 5, hum.Parainfluenza V. 2, Sendai V., Mumps V., Hendra V.), W (Nipah V.), P (Tollwut V.), NS1/NS2 (hum./bov. Respiratorisches Syncytialv.), NS3/4A (Hepatitis C V.), E1A (Adenov.)

II. Generelle Inhibition der Transkription: NSs (Bunyamvera V., Rift-Valley-Fieber V.), M (Vesikuläres Stomatitis V.)

III. Gen. Blockade des Sekretionsweges: 3A (Poliov.)

IV.lösliches IFNAR Homolog: B18R (Vaccinia V.)

V. Inhibition des Jak/STAT-Signalweges: M27 (mur. Cytomegalov.), E1A (Adenov.), EBNA-2 (Epstein-Barr V.), E6/E7 (hum. Papilloma V.), V-Protein (Simian V. 5, Parainfluenza V. 2, Mumps V., Newcastle Disease V., Masern V., Nipah V.), C (Sendai V.)

VI. PKR-Inhibitoren: NS1 (Influenza A V.), E3L/K3L (Vaccinia V.), VAI RNAs (Adenov.), ICP34.5/US11 (Herpes simplex V.), EBER RNAs (Epstein-Barr V.), TAR RNAs (HIV), E2/ NS5A (Hepatitis C V.), σ3 (Reov.);

VII. OAS/RNaseL-Inhibitoren: E3L (Vaccinia V.), NS1 (Influenza A V.)

VIII. Inhibition der ISG15 Konjugation: NS1 (Influenza B V.)

Abb. 1.7: Virale Genprodukte blockieren verschiedene Phasen der IFN-Antwort (Conzelmann, 2005, Dupuis et al., 2003, Garcia-Sastre, 2002, Garcia-Sastre, 2004, Samuel, 2001).

Unter den DNA Viren ist das Vaccinia Virus, ein Vertreter der *Poxviridae*, besonders gut untersucht. Es kodiert für mindestens drei IFN-antagonistische Proteine. Das B18R Protein, ein lösliches Homolog des IFN-α/ß Rezeptors, das im Laufe der Infektion sezerniert wird, fängt IFN-α/ß ab und verhindert damit die Signalweiterleitung über den IFN-α/ß Rezeptor. Das E3L Protein inhibiert durch Sequestrierung von dsRNA sowohl die Induktion von IFN-ß als auch die Aktivierung von PKR und OAS (Jacobs & Langland, 1996). Zusätzlich verhindert das K3L Protein als Substratanalog von PKR die Phosphorylierung von eIF2α (Davies et al., 1992).

Auch aus der Familie der *Herpesviridae* sind verschiedene IFN-antagonistische Strategien bekannt. Herpes Simplex Viren exprimieren das γ34.5 Protein, das über die Rekrutierung von Phosphatasen die Inhibition von eIF2α durch PKR und damit den Translationsblock verhindert (He et al., 1997). Das humane Herpesvirus 8 exprimiert IRF Homologe (vIRF-1, -2, -3, -4), die dominant negativ auf die IFN-Induktion wirken, über Interaktion mit p300 die Transkription ISRE-kontrolierter Gene blockieren und die Aktivierung von PKR verhindern (Burysek & Pitha, 2001, Burysek et al., 1999, Li et al., 2000, Li et al., 1998, Lubyova & Pitha, 2000, Zimring et al., 1998).

Adenoviren kodieren für VAI RNAs, die von PKR gebunden werden aber eine inhibitorische Wirkung haben (Mathews & Shenk, 1991) und für das E1A Protein, das durch Reduktion der STAT1 und IRF-9 Expression und Bindung an STAT1 die Bildung des ISGF3-Komplexes verhindert (Leonard & Sen, 1997, Look et al., 1998).

Auch RNA-Viren verfügen trotz geringerer Kodierungskapazität über IFN-antagonistische Proteine. Eine weit verbreitete Strategie, die von Influenza A Viren (Kap. 1.3.1), Thogoto Viren, Bornaviren, Tollwutviren, Respiratorischen Syncytialviren und Ebola Viren verfolgt wird, ist es die Induktion von IFN-α/ß zu verhindern (Conzelmann, 2005, Hagmaier et al., 2003, Jennings et al., 2005). Beispielsweise inhibiert das Phosphoprotein P (p24) der Bornaviren (Familie *Bornaviridae*) die Induktion des IFN-ß Gens durch Interaktion mit der IRF-3 Kinase TBK-1. Dabei wird es selbst phosphoryliert und blockiert dadurch die Phosphorylierung und Aktivierung von IRF-3 (Unterstab et al., 2005, im Druck).

Die V und C Proteine der *Paramyxovirinae* können sowohl die frühe als auch die späte Phase der IFN-Antwort negativ regulieren. Die V Proteine der meisten Paramyxoviren

interagieren mit den STAT1/STAT2 Komplexen. Sie blockieren den Jak/STAT-Signalweg, indem sie entweder den proteolytischen Abbau von STAT1 oder STAT2 induzieren oder die STAT Phosphorylierung verhindern. Die Gruppe der Respiroviren (Sendai Virus) und Morbilliviren (Masern Virus) exprimieren zusätzlich ein oder mehrere C Proteine. Für das Sendai Virus wurde gezeigt, dass nicht das V Protein sondern die C Proteine diesen Signalweg durch Bindung an STAT1 und Deregulation der STAT1/STAT2 Phosphorylierung inhibieren. Im Falle der Masern Viren wird diese Funktion sowohl von dem C als auch dem V Protein ausgeführt (Garcia-Sastre, 2004, Nagai & Kato, 2004). Zusätzlich können einige Paramyxoviren die Induktion des IFN-ß Gens verhindern. Für die V Proteine des Simian Virus 5, des humanen Parainfluenza Virus 2, des Sendai Virus, des Mumps Virus und des Hendra Virus wurde eine Interaktion mit der DexD/H-box Helicase mda-5 nachgewiesen. Diese Interaktion inhibierte die durch mda-5 vermittelte transkriptionelle Aktivierung des IFN-ß Promotors nach dsRNA Behandlung (Andrejeva et al., 2004).

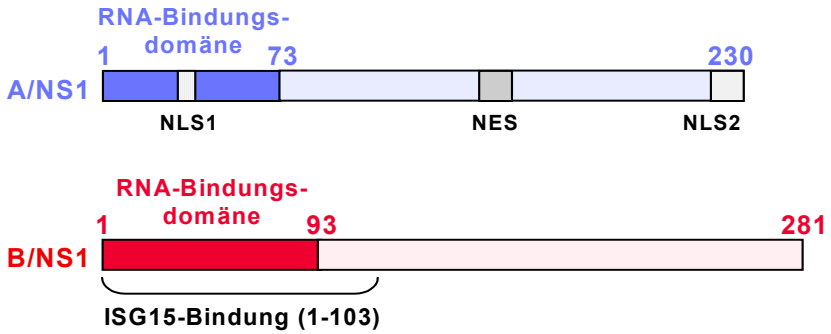
Einen relativ unspezifischen Weg zur IFN-α/ß Inhibition verfolgen die Bunyaviren. Die Nichstrukturproteine NSs des Bunyamvera Virus (Genus Bunyavirus) und des Rift-Valley-Fieber Virus (Genus Phlebovirus) aus der Familie der Bunyaviridae inhibieren den zellulären RNA-Polymerase II Komplex, was eine Blockade der gesamten zellulären Transkription zur Folge hat. Daher führt die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF-3, NFκB und ATF-2/c-Jun zwar zur Bindung Transkriptionskomplexes an das IFN-ß Gen, aber nicht zur Transkription desselben (Billecocq et al., 2004, Thomas et al., 2004).

Die hohe Verbreitung IFN-antagonistischer Aktivitäten zeigt, wie wichtig diese Genprodukte für die Zirkulation der Viren in der Natur sind.

1.3.1 IFN-antagonistisches Potential des NS1 Proteins der Influenza A und B Viren

Das Nichtstrukturprotein 1 des Influenza A Virus (A/NS1) war das erste Protein eines Negativstrang RNA-Virus, das als IFN-Antagonist identifiziert werden konnte. Mittels revers-genetischer Methoden konnte ein NS1-defizientes Influenza A Virus (A/delNS1) generiert werden, dessen Replikation in IFN-kompetenten MDCK Zellen und 10 Tage alten embryonierten Hühnereiern stark attenuiert war. Dagegen replizierte das

A/delNS1 Virus gut in Vero Zellen oder STAT1-Knock-out Mäusen, deren IFN-Antwort blockiert ist (Garcia-Sastre et al., 1998). Der Vergleich von A/delNS1 und WT Virus infizierten Zellen sowie Reportergenstudien zeigten, dass das A/NS1 Protein die Virus-vermittelte Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF-3, IRF-7, NFκB und ATF-2/c-Jun und folglich die Induktion der IFN-α/ß Gene inhibiert (Ludwig et al., 2002, Smith et al., 2001, Talon et al., 2000a, Wang et al., 2000). Die genauere Analyse der IRF-3 Aktivierung zeigte, dass das A/NS1 Protein die Phosphorylierung und die nukleäre Translokation von IRF-3 verhindert (Talon et al., 2000a). Andere Studien führten die IFN-antagonistische Wirkung des A/NS1 Proteins auf dessen Fähigkeit zurück, Polyadenylierung, Spleißen und nukleären Export zellulärer mRNAs und damit auch IFN-ß mRNAs zu inhibieren (Chen et al., 1999, Fortes et al., 1994, Lu et al., 1994, Nemeroff et al., 1998).



	Sequenzidentität <20%	
	A/NS1	B/NS1
bindet dsRNA	+	+
inhibiert IFN-ß Induktion	+	?
inhibiert IRF-3, NFκB, AP1	+	?
inhibiert PKR Aktivierung	*in vitro/in vivo*	*in vitro*
inhibiert ISG15 Konjugation	–	+

Abb. 1.8: Zusammenfassung der IFN-antagonistischen Eigenschaften der NS1 Proteine von Influenza A und B Viren.

Der Auslöser für die transkriptionelle Aktivierung des IFN-ß Gens während einer Influenza Virus Infektion ist das Vorliegen intrazellulärer dsRNAs, welche vermutlich als Seitenprodukt viraler Replikationsprozesse entstehen (Majde, 2000). Das A/NS1 Protein ist in der Lage, neben einzelsträngigen RNA-Spezies, wie zellulärer U6 snRNA, viralen mRNAs und Poly(A)-Sequenzen von mRNAs, auch dsRNA zu binden, wofür

die ersten 72 Aminosäuren sowie die Dimerisierung des Protein notwendig sind (Hatada & Fukuda, 1992, Nemeroff et al., 1995, Park & Katze, 1995, Qian et al., 1995, Qiu & Krug, 1994, Qiu et al., 1995). Deshalb wurde vermutet, dass die Fähigkeit, die IFN-ß Induktion zu inhibieren, ähnlich wie beim dsRNA-bindenden E3L Protein des Vaccinia Virus, auf der Bindung und Maskierung der dsRNAs beruht (Jacobs & Langland, 1996). Dieses dsRNA-Sequestrierungsmodell wurde durch Untersuchungen gestützt, die zeigten, dass die dsRNA-Bindungsdomäne des A/NS1 Proteins ausreichend für eine Inhibition der IFN-Induktion ist und A/NS1 Proteine mit gestörter dsRNA-Bindung in ihrer IFN-antagonistischen Funktion eingeschränkt waren (Donelan et al., 2003, Talon et al., 2000a, Wang et al., 2000).

Auch das Influenza B Virus NS1 Protein ist in der Lage dsRNA *in vitro* zu binden. Die dsRNA-Bindung wird durch die ersten 93 Aminosäuren des dimerisierten B/NS1 Proteins vermittelt (Wang & Krug, 1996). Trotz geringer Sequenzidentität (<20%) der beiden NS1 Proteine lassen computergestützte Strukturvorhersagen auf Grundlage der A/NS1-Kristallstruktur vermuten, dass die N-terminalen RNA-Bindungsdomänen eine ähnlich α-helikale Struktur besitzen (Yuan & Krug, 2001). Ob jedoch das B/NS1 Protein ebenso wie das A/NS1 Protein in der Lage ist, die transkriptionelle Aktivierung von IFN-ß zu verhindern, wurde kontrovers diskutiert. Es war zwar berichtet worden, dass IRF-3 durch eine Influenza B Virus Infektion aktiviert und die IRF-3 abhängigen Gene ISG15 und ISG56 exprimiert wurden, die Induktion des IFN-ß Gens durch WT Influenza B Virus wurde jedoch nicht direkt gezeigt (Kim et al., 2002, Krug et al., 2003). Weiterhin konnte keine nukleäre Retention von mRNAs gezeigt werden (Wang & Krug, 1996). Auf jeden Fall sind Influenza B Viren jedoch in der Lage, in IFN-kompetenten Systemen effizient zu replizieren (Talon et al., 2000b). Dies wurde auf die Fähigkeit des B/NS1 Proteins zurückgeführt, die Konjugation des ISG15 Proteins an dessen Zielproteine zu inhibieren, eine Funktion die das A/NS1 Protein nicht besitzt (Yuan & Krug, 2001).

Das B/NS1 Protein ist weiterhin in der Lage die Aktivierung der dsRNA-abhängigen Proteinkinase R zumindest *in vitro* zu blockieren (Wang & Krug, 1996). Für Influenza A Viren gibt es sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Evidenz für die Inhibition von PKR durch das A/NS1 Protein (Bergmann et al., 2000, Lu et al., 1995). Dabei scheint die dsRNA-Bindung des A/NS1 Proteins für die Inhibition der PKR wichtig zu sein, da temperatursensitive NS1 Virusmutanten bei nichtpermissiver Temperatur weder dsRNA

binden noch die Aktivierung von PKR verhindern können (Hatada et al., 1999). Daneben könnte auch eine direkte Interaktion von A/NS1 und PKR eine Rolle bei der PKR Inhibition spielen (Tan & Katze, 1998). Unabhängig vom NS1 Protein kann PKR auch durch das zelluläre p58IPK Protein inhibiert werden, welches im Verlauf einer Influenza Virus Infektion aktiviert wird (Lee et al., 1990, Lee et al., 1992).

1.4 Reverse Genetik bei Influenza Viren

Einen bedeutenden Fortschritt bei der Bearbeitung vieler fundamentaler virologischer Fragestellungen brachte in den letzten Jahren die Entwicklung von Methoden zur genetischen Veränderung von Viren. Solche revers-genetischen Ansätze ermöglichen die Herstellung von Viren, die Gene enthalten, welche von klonierter cDNA abstammen. Da sich über die cDNA gezielt Mutationen in virale Gene einführen lassen, ist es möglich, die Struktur-Funktionsbeziehungen viraler Proteine sowie die Interaktion von viralen und zellulären Proteinen und ihren Einfluss auf die Pathogenität der Viren zu untersuchen.

Bei der genetischen Veränderung von Negativstrang-RNA Viren liegt das Hauptproblem darin, dass die genomische Nukleinsäure dieser Viren aufgrund ihrer negativen Polarität nach Transfektion in Zellen nicht in der Lage ist, einen Infektionszyklus zu initiieren. Weder vRNA noch cRNA lassen sich direkt für die Translation viraler Proteine nutzen. Von der vRNA muss zuerst mRNA transkribiert werden, wofür die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase benötigt wird, die bei einer Infektion vom Virus selbst in die Zelle mitgebracht wird. Auch für das Umschreiben der vRNA in cRNA bei der Replikation kann die virale Polymerase nicht durch zelluläre Enzyme ersetzt werden. Weiterhin müssen vRNA und cRNA für Transkription und Replikation mit Nukleoprotein enkapsidiert sein. Dies bedeutet, dass RNPs die kleinste infektiöse Einheit darstellen. Aufgrund dieser komplexen Ausgangslage gelang die Etablierung revers-genetische Systeme für Negativstrang-RNA-Viren erst wesentlich später als dies für einige Positivstrang-RNA-Viren oder DNA Viren der Fall war.

Für Influenza A Viren konnten Palese und Mitarbeiter diese Problemstellung als erste in limitierter Form mit einer RNP-Transfektionsmethode lösen (Enami et al., 1990). Dazu wurden synthetische vRNAs durch *in vitro* Transkription von cDNA eines viralen Segments synthetisiert und mit aufgereinigtem PB1, PB2, PA und NP inkubiert. Die so

rekonstituierten RNPs wurden in Zellen transfiziert, die danach mit Influenza A Viren infiziert wurden. Bei der Replikation dieser Helferviren wurden auch die transfizierten RNP repliziert und zufallsgemäß in einige der neu freigesetzten Viren eingebaut. Mit dieser Methode konnte unter anderem das A/delNS1 Virus generiert werden, dessen NS1 Gen deletiert ist (Garcia-Sastre et al., 1998). Bei diesem System bestand jedoch das Problem, dass die Viren, die das rekombinante Segment enthalten gegen einen großen Hintergrund von Helferviren selektioniert werden mussten. Ein Selektionssystem musste sich an den besonderen Eigenschaften des ausgetauschten Segments/Proteins orientieren. Dadurch konnte nur ein beschränktes Spektrum an Mutationen in vier von acht Gensegmenten eingeführt werden.

Diese Limitierung wurde mit der Entwicklung von Systemen aufgehoben, die die Herstellung rekombinanter Influenza A Viren ausschließlich von klonierter cDNA ermöglichen (Fodor et al., 1999, Hoffmann et al., 2000, Neumann et al., 1999). Für das bidirektionale 8-Plasmid System von Hoffmann et al. wurde die genetische Information jedes der acht vRNA Segmente des Influenza A Virus in den Vektor pHW2000 subkloniert (Abb. 1.9). Darin wird die virale cDNA sowohl von dem humanen RNA-Pol I-Promotor und dem murinen RNA-Pol I-Terminator als auch von einem RNA-

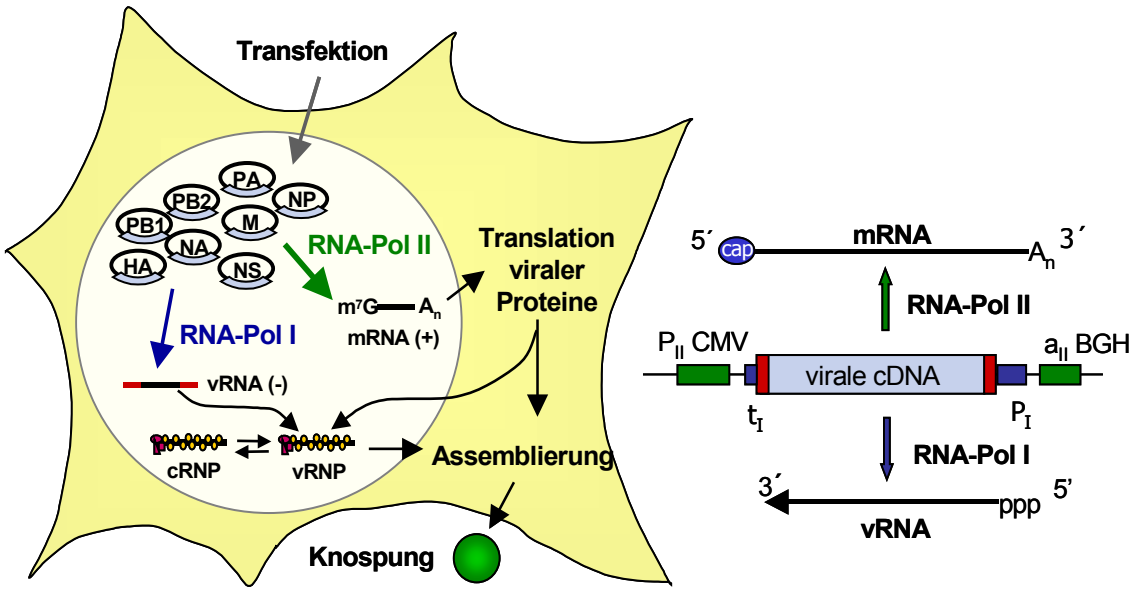


Abb. 1.9: Herstellung rekombinanter Influenza Viren. Nach Transfektion von Plasmiden, die für die 8 viralen Gensegmente kodieren, wird, aufgrund der besonderen Organisation des Vektors, sowohl virale mRNA als auch vRNA durch die RNA-Polymerasen II und I transkribiert. Nach Translation der viralen Proteine und Assemblierung mit den vRNPs werden neugebildete Virionen von der Zelle freigesetzt. Abkürzungen: RNA-Pol I: RNA-Polymerase I; RNA-Pol II: RNA-Polymerase II; P_I: humaner RNA-Pol I-Promotor; t_I: muriner Terminator; P_{II}CMV: Cytomegalievirus RNA-Pol II-Promotor; a_{II} BGH: Polyadenylierungs-signal des bovinen Wachstumshormon („bovine growth hormone“) Gens;

Polymerase II Promotor und einem Polyadenylierungssignal flankiert. Nach Transfektion der acht Plasmide in humane Zellen, können daher durch die zellulären RNA-Polymerasen I und II sowohl vRNA-Segmente als auch mRNAs synthetisiert werden. Durch Translation der mRNA an den zellulären Ribosomen werden alle viralen Proteine exprimiert. Die neusynthetisierte vRNA wird *in situ* mit NP enkapsidiert und bildet mit PB1, PB2 und PA funktionelle RNPs. Ausgehend von diesen *in vivo* rekonstituierten RNPs werden weitere Replikationszyklen initiiert sowie mRNA transkribiert und Protein translatiert. Die vRNPs werden schließlich mit den viralen Proteinen in neue Virionen assembliert, die durch Knospung von der Zelle freigesetzt werden.

Vor Beginn dieser Arbeit war die genetische Veränderungen von Influenza B Viren nur für die zwei Segmente HA und NA mittels eines Helfervirus-abhängigen Systems gelungen (Barclay & Palese, 1995, Rowley et al., 1999). Da ein Helfervirus-unabhängiges Genetik-System zur gezielten Manipulation aller Segmente des Influenza B Virus fehlte, konnten viele wichtige Fragestellungen, wie z. B. Interaktion mit der angeborenen Immunantwort, die Identifizierung von Pathogenitätsdeterminanten, das begrenzte Wirtsspektrum sowie Parallelen und Unterschiede zu Influenza A Viren nur sehr begrenzt untersucht werden. Um mögliche IFN-antagonistische Eigenschaften der Influenza B Viren erfolgreich charakterisieren zu können, war es daher zu Beginn dieser Arbeit von großer Bedeutung ein solches revers-genetisches Systems zur *de novo* Generierung rekombinanter Influenza B Viren ausgehend von Plasmid-DNA zu konstruieren. Dieses System basiert auf dem 8-Plasmidsystem nach Hoffman et al. Ebenso wie für das Influenza A Virus beschrieben, musste dafür die genetische Information der acht Influenza B Virus Segmente in den Vektor pHW2000 subkloniert werden, so dass nach Transfektion der acht Plasmide in humane Zellen rekombinante Influenza B Viren gebildet werden konnte (Abb. 1.9).

1.5 Fragestellung

Das fast alljährliche Auftreten von Influenza Epidemien zeigt, dass Influenza A und B Viren trotz Impfungen und antiviraler Medikamente eine ernsthafte Gefährdung für die Bevölkerung darstellen. Der Ausgang einer Infektion bzw. die Virulenz eines Virus wird unter anderem davon beeinflusst, wie gut sich das Virus gegen das antivirale Typ I IFN-System des Wirtes zur Wehr setzen kann. Detaillierte Kenntnisse dieser Virus-Wirt-Interaktionen sind nicht nur wichtig zum Verständnis der Biologie von Viren, sondern stellen auch eine wichtige Grundlage für die Entwicklung neuer Impfstoffe und antiviraler Substanzen zur Therapie von Virusinfektionen dar. Das Ziel dieser Arbeit war daher die Charakterisierung der Typ I IFN-antagonistischen Eigenschaften des Influenza B Virus Nichtstrukturproteins 1 (B/NS1) unter besonderer Berücksichtigung der funktionellen Bedeutung seiner dsRNA-Bindungskapazität.

Für Influenza A Viren konnte mittels revers-genetischer Methoden das A/NS1 Protein als IFN-Antagonist identifiziert werden (Garcia-Sastre et al., 1998). Weiterhin ist das A/NS1 Protein in der Lage, die Aktivierung der antiviralen dsRNA-abhängigen Proteinkinase R zu verhindern (Bergmann et al., 2000). Diese Eigenschaften des A/NS1 Proteins ermöglichen die Replikation der Influenza A Viren in IFN-kompetenten Wirten. Die Fähigkeit von Influenza B Viren, ebenfalls in IFN-kompetenten Systemen zu replizieren, wirft eine Vielzahl von Fragen auf. Sind Influenza B Viren in der Lage, das IFN-System zu antagonisieren? Wird die potentielle Inhibition des IFN-Systems ähnlich wie bei den Influenza A Viren durch das NS1 Protein vermittelt? Wenn ja, auf welcher Ebene greift das B/NS1 Protein in das IFN-System ein - inhibiert es die IFN-α/ß Induktion, den IFN-α/ß Signalweg oder die antivirale Wirkung IFN-stimulierter Gene? Welchen Einfluss hat dies auf die virale Replikation? Und in wie weit sind strukturelle und funktionelle Eigenschaften des B/NS1 Proteins wie die dsRNA-Bindung oder Protein-Protein-Interaktionen für die IFN-Antagonisierung, die Inhibition antiviraler Proteine wie PKR oder eine effiziente virale Replikation notwendig? Diese Fragestellungen sollten mit revers-genetischen Analysen von Influenza B Viren untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Virusstämme

Influenza B/Lee/40 Virus	erhalten von P. Palese, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY
Influenza B/Maryland/59 Virus	erhalten von P. Palese, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY
Influenza A/Puerto-Rico/8/34 Virus	erhalten von P. Palese, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY
Influenza A/delNS1 Virus	erhalten von A. Egorov, Universität für Bodenkultur, Wien; Garcia-Sastre et al., 1998;

2.1.2 Zelllinien

MDCKII Zellen	„Madin-Darby Canine Kidney“, Epithelzelllinie aus der Niere eines Hundes
MDCK-C3 Zellen	MDCKII Zellen mit stabil integriertem p125-Luc-neoR
293T Zellen	humane Nierenzelllinie
A549 Zellen	humane Epithelzelllinie aus einem Lungenkarzinom

2.1.3 Bakterienstämme

Escherichia coli, Stamm XL1-Blue	*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'*pro AB lacI*^{q}ZΔM15 Tn*10* (Tet^{r})]

2.1.4 Zellkulturmedien, Zusätze und Material

MEM (Minimal Essential Medium)	Gibco/ Invitrogen™, Karlsruhe
D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco/ Invitrogen™, Karlsruhe

OptiMEM	Gibco/ Invitrogen™, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FBS)	Biochrom, Cambridge/U.K.
BSA (Bovine Serum Albumine, 30%)	PAA Laboratories, Linz
L-Glutamin	MP Biomedicals, Eschwege
Ciprofloxacin	MP Biomedicals, Eschwege
Penicillin/Strepomycin (Pen/Strep)	Invitrogen, Karlsruhe
Tetrazyclin	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin (TPCK-behandelt)	Sigma, Steinheim
G418-Sulfat Geneticin	PAA Laboratories, Linz
Zellkulturflaschen	TPP, Schweiz
Zellkulturschalen	Greiner, Solingen

2.1.5 Medien für Bakterien

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

LB-Medium	10 g/l	Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	10 g/l	NaCl
	pH 7,2	
2 x YT-Medium	16 g/l	Trypton
	10 g/l	Hefeextrakt
	10 g/l	NaCl
	pH 7,2	
SOC- Medium	20 g/l	Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	nach dem Autoklavieren Zugabe von	
	20 mM	Mg^{2+}-Stock
$MgCl_2$ –Stock	1 M	$MgCl_2$ x 6 H_2O
	1 M	$MgSO_4$ x 7 H_2O

0,4 % (w/v) Glukose

LB-Agar mit Ampicillin

LB-Medium
1,5 % (w/v) Bacto-Agar
Autoklavieren und Abkühlen auf unter 50°C, Zugabe von Ampicillin 100 µg/µl
Gießen des Mediums in Petrischalen

2.1.6 Plasmide

pHW2000	erhalten von R. Webster; Hoffman *et al*., 2000
pcDNA3	Invitrogen
pcDNA3.1-myc/His A	Invitrogen
pcDNA-A/NS1	T. Wolff; Wolff *et al.*, 1996
pEGFP-C1-hIRF-3	erhalten von E. Mühlberger; Basler *et al*., 2003
pCAGGS-IRF-3(HA)	erhalten von S. Jennings; Jennings *et al*., 2005
p125-Luc (firefly)	erhalten von T. Fujita; Yoneyama *et al*., 1996
pRL-TK-Luc (*Renilla*)	Promega

2.1.7 Oligonukleotide

Klonierprimer	**5'→ 3'**
UNI9	AGCAGAAGC(A/G)
BsmBI-PB1#1	CGATCGTCTCA*GGG* AGCAGAAGCGGAGCC
BsmBI-PB1#2	CGATCGTCTCT*TATT* AGTAGAAACACGAGCC
BsmBI-PB2#1	CGATCGTCTCA*GGG* AGCAGAAGCGGAGCG
BsmBI-PB2#2	CGATCGTCTCT*TATT* AGTAGAAACACGAGCA
BsmBI-PA#1	CGATCGTCTCA*GGG* AGCAGAAGCGGTGCGTTTG
BsmBI-PA#2	CGATCGTCTCT*TATT* AGTAGAAACACGTGCAT
AarI-HA#1	CGATCACCTGCTCGA*GGG* AGCAGAAGCAGAGC
AarI-HA#2	CGATCACCTGCTCTC*TATT* AGTAGTAACAAGAGCAT

BsmBI-NA#1 CGATCGTCTCA*GGG* AGCAGAAGCAGAGC

BsmBI-NA#2 CGATCGTCTC*TTATT* AGTAGTAACAAGAGCAT

BspMI-NP#1 CGATACCTGCTCGA*GGG* AGCAGAAGCACAGC

BspMI-NP#2 CGATACCTGCTCTC*TATT* AGTAGAAACAACAGCAT

BsmBI-M#1 CGATCGTCTCA*GGG* AGCAGAAGCACGCAC

BsmBI-M#2 CGATCGTCTC*TTATT* AGTAGAAACAACGCAC

BsmBI-NS#1 CGATCGTCTCA*GGG* AGCAGAAGCAGAGG

BsmBI-NS#2 CGATCGTCTC*TTATT* AGTAGTAACAAGAGG

BsmBI-delNS1#2: CGATCGTCTC*TTATT* AGTAGTAACAAGAGGATTTTTATTTTAC ATTCATAAGCACTGC

Lee-NS1-HindII: CGCAAGCTTATGGCGGACAACATG

Lee-NS1-SalI: CGCGTCGACCTAATTGTCTCCCTC

Lee-NS1-SalI-tag: CGCGTCGACATTGTCTCCCTCTTC

Mutageneseprimer 5'→ 3'

Lee-NS-XhoI-F GAATAAAAGGATGTCTCT**C**GA**G**GAGAGAAAAGCAATTGG

Lee-NS-XhoI-R CCAATTGCTTTTCTCTC**C**TC**G**AGAGACATCCTTTTATTC

Lee-NS1-33/38- HindIII F

CTGGAGTGCTATGAA**GCTT**TTTCATGGCAA**GC**AGCCCTTGACTATCCTGG

Lee-NS1-33/38-HindIII R

CCAGGATAGTCAAGGGCT**GC**TTGCCATGAAAA**AGCTT**CATAGCACTCCAG

Lee-NS1-47/50-SapI F

GCCCTTGACTATCCTGGTCAAGAC**GCT**CT**T**CAC**GC**ACTAAAACGAAAATTAGAATCAAG

Lee-NS1-47/50-SapI R

CTTGATTCTAATTTTCGTTTTAGT**GC**GTG**A**AG**AGC**GTCTTGACCAGGATAGTCAAGGGC

Lee-NS1-52/53/54-PstI F

CCTGGTCAAGACCGCCTACACAGACTA**GCTGCAGC**ATTAGAATCAAGAATAAAGACTCA CAAC

Lee-NS1-52/53/54-PstI R

GTTGTGAGTCTTTATTCTTGATTCTAAT**GCTGCAGC**TAGTCTGTGTAGGCGGTCTTGACCAGG

Lee-NS1-58/60/64-NheI F

CGAAAATTAGAATCA**GC**AATA**GC**GACTCACAAC**GCTAGC**GAGCCTGAGAATAAAAGGATGTC

Lee-NS1-58/60/64-NheI R

GACATCCTTTTATTCTCAGGCTC**GCTAGC**GTTGTGAGTC**GC**TATT**GC**TGATTCTAATTTTCG

Lee-NS1-77/78-PstI F

GAGAATAAAAGGATGTCTCTCGAGGAG**GCTGC**AGCAATTGGGGTAAAAATGATGAAAGTG

Lee-NS1-77/78-PstI R

CACTTTCATCATTTTTACCCCAATTGCT**GCAGC**CTCCTCGAGAGACATCCTTTTATTCTC

Lee-NS1-83/86-BseMI F

GAGAGAAAAGCAATTGGGGTA**GC**AATGATG**GC**AGTGCTTCTGTTTATGGATCCC

Lee-NS1-83/86-BseMI R

GGGATCCATAAACAGAAGCACT**GC**CATCATT**GC**TACCCCAATTGCTTTTCTCTC

Sequenzierprimer	**5'→ 3'**
pHW-R325	AGTCGAGGCTGATCAGC
pHW-F2951	CTCACTATAGGGAGACCC
PB1-421 F	CCGAAGACAATGAACCG
PB1-2086 R	GCGTAGCATTGTTCCTCAG
PB2-283 F	ATAGCAGCAGTTACCTGGTG
PB2-2028 R	TGACATCATTCTGCCGC
PA-232 F	GAAGTGATTGAGGGAATGC
PA-1974 R	AGATTCGGCACTAAACCC
HA-225 F	CAGAGGAAAACTATGCCC
HA-1536 F	GGTTTCAAAGCACCCATTC
NP-514 F	AAAACCATCTACTTCAGCC
NP-1426 R	CTTCTCCACTTAACTTCATTCCC
NA-347 F	TAGCCCTCATAGGTTCGGAGAG

NA-1367 R	CCAAGTATCTTTTCCACCATCG
M-290 F	CAGCAACAAAGAAGAAAGGC

RT-PCR Primer	**5'→ 3'**
hIFN-ß 3'	GCGCTCAGTTTCGGAGGTAACCTGT
hIFN-ß 5'	GGCCATGACCAACAAGTGTCTCCTCC
ß-Aktin 3'	TCCTGTGGCATCCACCAAACT
ß-Aktin 5'	GAAGCATTTGCGGTGGACCAT

2.1.8 Enzyme

Pfu Turbo DNA-Polymerase	Roche, Mannheim
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
T4 DNA-Ligase (1u/µl)	Roche, Mannheim
RNasin (40 u/µl)	Promega, Mannheim

2.1.9 Restriktiosendonukleasen

*Aar*I, *Bse*MI, *Bsm*BI (*Esp*3I), *Hind*III, *Nhe*I, *Pst*I *Sal*I, *Xho*I	Fermentas, St. Leon-Rot
*Bsp*MI, *Sap*I	NEB, Frankfurt

2.1.10 Kits

BigDye® Terminator 3.1 Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega, Mannheim
Expand High Fidelity PCR System	Roche, Mannheim
Humaner IFN-α ELISA Kit	PBL Biomedical Laboratories
Humaner IFN-ß ELISA Kit	Fujirebio Inc., Japan
Luciferase Reporter Assay System	Promega, Mannheim
Protein Assay Stammlösung	BioRad, München
Oligotex™ Direct mRNA Midi/Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAprep® Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAEXII Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden

QIAquik PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
OneStep RT-PCR Kit	QIAGEN, Hilden
QIAamp®MinElute™ Virus Spin Kit	QIAGEN, Hilden
QuikChange™Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg
RNeasy®	QIAGEN, Hilden

2.1.11 Primäre Antikörper für Immunfluoreszenz (IF) und Immunoblot (IB)

Bezeichnung	Hersteller	Spezies/Eigenschaft	Verdünnung	
			IF	IB
α-Influenza B/NS1	BioGenes*	Kaninchenserum	1:300	1:5000
α-Influenza B/NP	DPC Biermann/Acris	Maus, monoklonal	1:250	1:300
α-Influenza A/NP	Serotec	Maus, polyklonal	1:200	
α-myc (9E10)	Santa Cruz	Maus, monoklonal	1:100	
α-HA	Upstate	Kaninchen, polyklonal		1:1000
α-CBP (A-22)	Santa Cruz	Kaninchen, polyklonal		1:250
α-IRF-3 (FL-425)	Santa Cruz	Kaninchen, polyklonal		1:1000
α-IRF-3	Zymed	Kaninchen, polyklonal		1:1000
α-IRF-3 (SL-12.1)	BD Pharmingen	Maus, monoklonal		
α-PKR (71/10)		Maus, monoklonal		1:1000
α-Phospho-PKR (Thr 446)	Cell Signaling/NEB	Kaninchen, polyklonal		1:750
α-eIF2α	Cell Signaling/NEB	Kaninchen, polyklonal		1:750
α-Phospho-eIF2α (Ser 51)	Cell Signaling/NEB	Kaninchen, polyklonal		1:750

* Immunisierung von Kaninchen mit aufgereinigtem GST-B/NS1 Protein aus Bakterien.

2.1.12 Sekundäre Antikörper

Zielspezies	Modifizierung	Spezies	Hersteller	Verdünnung
Maus	Alexafluor 594 (rot)	Ziege	Molecular Probes	1:750 (IF)
Maus	Meerrettich-Peroxidase (HRP)	Kaninchen	DAKO	1:15 000 (IB)
Kaninchen	Meerrettich-Peroxidase (HRP)	Schwein	DAKO	1:15 000 (IB)
Kaninchen	Meerrettich-Peroxidase (HRP)	Ziege	Cell Signaling/NEB	1:10 000 (IB)

2.1.13 Puffer und Lösungen

PBS	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	80,9 mM	Na_2HPO_4
	1,5 mM	KH_2PO_4
PBS^{++}/0,2% BSA	PBS	
	0,2 %	BSA
	0,1 g/l	$MgCl_2$
	0,13 g/l	$CaCl_2$
30% Succrose in NTE	100 mM	NaCl
	10 mM	Tris-HCl pH 7,5
	1 mM	EDTA
	30%	Succrose
10 x TBE Puffer	0,89 M	Tris
	0,89 M	Borsäure
6 x DNA-Probenpuffer	0,1 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,1 % (w/v)	Xylencyanol
	30 %	Glycerol
	10 mM	EDTA, pH 8,0
2 x SDS-Probenpuffer	1,2 ml	H_2O
	8,3 ml	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
	6 ml	10 % SDS (w/v)
	1,5 ml	Glycerin
	9 mg/ml	Bromphenolblau
	5 %	ß-Mercaptoethanol
10 x SDS-Elektrophoresepuffer	Tris	250 mM
	Glycin	1,92 M
	SDS	10 g/l

Nativer Probenpuffer	125 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	30%	Glycerol
	0,002%	Bromphenolblau
	ad 1 ml	H_2O
1x nativer Elektrophoresepuffer	25 mM	Tris-HCl
	192 mM	Glycin
für Kathodenpuffer:	0,2%	Natrium-Deoxycholat
Semidry Blotting Puffer	48 mM	Tris
	39 mM	Glycin
	1.3 mM	SDS
	20%	Methanol
TBST	100 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1,5 M	NaCl
	0,5%	Tween 20
Fixierlösung	30 %	Methanol
	10 %	Essigsäure
Ko-IP Lysis Puffer	20 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	1 %	Nonidet P-40
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	10 mM	Na ß-Glycerophosphat
	frisch zugeben:	
	1 mM	Na_3VO_4
	1 mM	Pefablock
Triton Lysis Puffer	20 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	137 mM	NaCl
	10%	Glycerol
	1%	Triton X-100
	2 mM	EDTA
	50 mM	Na-ß-Glycerophosphat

	20 mM	Na-Pyrophosphat
	frisch zugeben:	
	1 mM	Na_3VO_4
	1 mM	Pefablock
Mowiol	2,4 g	Mowiol 4-88
	6 ml	Glycerol
	6 ml	dH_2O

- über Nacht quellen lassen

12 ml	Tris (0,2 M), pH 8,5

- unter Rühren bei 50-60 °C lösen
- 15 min bei 4000 rpm zentrifugieren und den Überstand mit 10% (w/v) DABCO versetzen
- Aufbewahren der Aliquots bei –20°C

2.1.14 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Acrylamidlösung 30%	Roth, Karlsruhe
Agarose NEEO Ultra Qualität	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad, München
Ampicillin	Roche, Mannheim
Bacto-Agar	Becton-Dickenson, Heidelberg
Borsäure	Roth, Karlsruhe
ß-Glycerophosphat	Sigma, Steinheim
ß-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
BioMax MR Film	Kodak
Bovines Albumin (BA)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Steinheim
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
DABCO (1,4-Diazabizyklo-[2,2,2]-oktan)	Sigma, Steinheim
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, Steinheim
DNA-Längenstandard Mass Ruler™	Fermentas, St. Leon-Rot

DNA-6 x loading buffer	Fermentas, St. Leon-Rot
EDTA (Ethylendinitrilotetraessigsäure)	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd 10% (Methanol-frei)	Worthington, PA
Glukose	Roth, Karlsruhe
Glutamin	MP Biomedicals, Eschwege
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Becton-Dickinson, Heidelberg
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
LipofectAMINE^{TM}2000	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Mowiol 4-88	Calbiochem, Bad Soden
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdesoxycholat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumvanadat	Sigma, Steinheim
Nitrocellulose Transfer-Membran (Protran)	Schleicher & Schuell
NP-40	Fluka, Heidelberg
Pefabloc	Roth, Karlsruhe
Ponal-Klebstoff	Henkel
Protein G-Agarose	Roche, Mannheim
Protein-Molekulargewichtsstandard	Fermentas, St. Leon-Rot
Redivue L-[^{35}S]Methionin	Amersham, Freiburg
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva, Heidelberg
SuperSignal WestDura Extended Duration Substrat	Pierce
TEMED	Serva, Heidelberg
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe

Triton-X100	Serva, Heidelberg
Trypton	Difco, Heidelberg
Tween-20	Roth, Karlsruhe

2.1.15 Geräte

ABI Prism 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Brutschränke	Nuaire/Zapf, Sarstedt
Elektrophorese-Zubehör	BioRad
Geltrockner Phero-Temp 40	BioTec Fischer
Luminometer LB96V	EG+G Berthold, Bad Wildbad
Personal Cycler	Biometra®
Sterilarbeitsbank	

Zentrifugen:

Zentrifuge J2-21 (Rotoren JA-14 und JA-20)	BECKMAN®
Zentrifuge RC5C (Rotoren SS-34 und GSA)	Sorvall®Instruments
Ultrazentrifuge L8-70M (Rotor SW 28)	BECKMAN®
Ultrazentrifuge TL-100 (Rotor TLA 45)	BECKMAN®
Biofuge pico	Heraeus
Labofuge 400R	Heraeus
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf

Mikroskope:

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

2.1.16 Software

Lasergene 6	Sequenzauswertung
SPOT 3.5.5 für Windows	Kameraprogramm
Windows XP	Betriebssystem
Microsoft Word 2000	Textverarbeitung
Microsoft Powerpoint 2000	Grafikgestaltung
Adobe Photoshop 7.0	Bildberarbeitung

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Für die Kultur von eukaryotischen Zellen ist es wichtig, alle Arbeiten unter sterilen Bedingungen auszuführen, um Kontaminationen zu vermeiden. Die in dieser Arbeit verwendeten MDCKII Zellen und MDCK-C3 Zellen wurden in MEM, 293T Zellen und A549 Zellen in D-MEM kultiviert. Die Medien wurden mit 10% FBS, 2 mM L-Glutamin und 100 µg/ml Pen/Strep, 10 µg/ml Tetrazyklin, 10 µg/ml Cibrofloxacin supplementiert. Dem Medium für MDCK-C3 Zellen wurde zusätzlich 750 µg/ml G418-Sulfat zugefügt, um den Verlust des p125-Luc-neoR Reportergens zu verhindern. Alle Medien sowie der PBS-Puffer wurden vor dem Benutzen auf 37°C vorgewärmt. Die Zellen wurden in 75 cm^2 Zellkulturflaschen bei 37°C im Brutschrank mit 5% CO_2 und H_2O-gesättigter Atmosphäre kultiviert und zweimal pro Woche umgesetzt.

2.2.1.1 Passage von Zellen

Waren die Zellen zu einem konfluenten Zellrasen zusammengewachsen, mussten sie in neue Kulturflaschen umgesetzt werden. Dazu wurden sie zunächst mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit ca. 1 ml Trypsin/EDTA im Brutschrank bei 37°C inkubiert, bis sie sich vom Flaschenboden ablösten. Die Zellsuspension wurde in frisches Medium aufgenommen und der gewünschte Anteil in neue Kulturflaschen oder Zellkulturschalen mit vorgelegtem Medium überführt. Es wurden folgende Kulturgefäße verwendet:

-	T75 Flasche	1 x 10^7 Zellen	10 ml Medium
-	10 cm Schale	1 x 10^7 Zellen	10 ml Medium
-	60 mm Schale	2,5 x 10^6 Zellen	3 ml Medium
-	35 mm Schale	1 x 10^6 Zellen	1,5 ml Medium
-	12 Kalotten-Platte	5 x 105 Zellen	1 ml Medium
-	24 Kalotten-Platte	2,5 x 10^5 Zellen /Kalotte	0,5 ml Medium

2.2.1.2 Einfrieren von Zellen

Um Zelllinien über einen langen Zeitraum aufzubewahren, wurden sie in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wurden die Zellen einer konfluenten Flasche mit 1 ml Trypsin/EDTA abgelöst, in PBS aufgenommen und 3 min bei 800 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschleißend in 2 ml Medium mit 10% DMSO aufgenommen und

resuspendiert. Je 1 ml wurde in ein Kryo-Röhrchen überführt und in einer Nalgene Einfrierbox bei –80°C langsam eingefroren.

2.2.1.3 Infektion von Zellen

Für die Infektion von Zellen mit Influenza A oder B Viren wurden die 80% konfluenten Zellen zuerst mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die vorbereitete Virusverdünnung in PBS/0,2%BSA auf die Zellen pipettiert. Das Inokulum-Volumen wurde so gewählt, dass der Zellrasen mit möglichst wenig Flüssigkeit bedeckt war, aber nicht austrocknete. Die Verdünnung richtete sich nach der gewünschten MOI („ multiplicity of infection“ = Anzahl der Viren pro Zelle). Die Zellen wurden 45 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und dabei hin und wieder geschwenkt, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Danach wurden die Zellen zwei mal mit PBS gewaschen und mit Infektionsmedium (statt mit FBS mit 0,2% BSA supplementiert) überschichtet. Für die multizyklische Replikation der Influenza Viren wurde dem Medium 2 µg/ml TPCK-behandeltes Trypsin zugesetzt, um das HA-Protein der neugebildeten Viren zu spalten und so einen weiteren Infektionszyklus zu ermöglichen. Die Zellen wurden bei 37°C (Flu A) bzw. 33°C (Flu B) im Brutschrank inkubiert.

2.2.1.4 Transfektion von Zellen

Transfektion bedeutet das Einbringen von Nukleinsäuren, in diesem Fall Plasmide, in eukaryotische Zellen. In dieser Arbeit wurden für Transkfektionen 293T Zellen und MDCKII Zellen benutzt, die sich mit hoher Effizienz transfizieren lassen. Als Transfektionsagens wurde LipofectAMINE^{TM} 2000 (LF2000) verwendet. LF2000 ist eine Mischung kationischer Lipide. Werden Plasmide zusammen mit LF2000 in Medium inkubiert, bilden sich Micellen, die Plasmid eingeschlossen haben. Diese können Zellmembranen überwinden und so die Plasmide in die Zelle bzw. in den Zellkern transportieren.

Für die Transfektion wurden die Zellen einen Tag zuvor 1:2 umgesetzt, damit sie sich in einem günstigen Wachstumsstadium befanden. Die folgenden Angaben beziehen sich auf die Transfektion von 1 x 10^6 Zellen. Pro 1 µg DNA wurde 1,5 µl LF2000 in 200 µl OptiMEM aufgenommen, gut gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde in 200µl OptiMEM aufgenommen und mit dem LF2000-Mix vereinigt, durch auf-und-ab-Pipettieren vermischt und 15 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen, durch Trypsin abgelöst, in PBS aufgenommen

und 3 min bei 800 rpm in der Labofuge pelletiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml Transkfektionsmedium (10% FBS, 2 mM L-Glutamin, keine Antibiotika) aufgenommen und je 1 ml in die Kulturschalen vorgelegt. Der LF2000-DNA-Mix wurde tropfenweise dazu pipettiert und leicht geschwenkt. Die Zellen wurden anschließend 4-6 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert, bevor das Medium gegen Infektionsmedium ausgetauscht wurde.

2.2.2 Arbeiten mit Influenza A und B Viren

2.2.2.1 Virusanzucht im Hühnerei

Die meisten Influenzaviren lassen sich sehr gut in der Allantoishöhle von 11 Tage alten Hühnerembryonen vermehren. Influenza Viren, deren IFN-antagonistische Fähigkeiten eingeschränkt sind, lassen sich in 6 Tage alten Bruteiern anzüchten, da das Typ I IFN-System der Embryonen zu diesem Zeitpunkt noch nicht ausgereift ist. Dies macht man sich zu Nutze, um Virusstammlösungen herzustellen oder die Replikationskapazität von Viren zu analysieren.

Zunächst wurde eine Virusverdünnung mit 1000 ffu/100µl hergestellt. Anschließend wurden alle Eier desinfiziert, durchleuchtet und die befruchteten Eier ausgewählt. Bei 11 Tage alten Bruteiern wurde an ihrem stumpfen Ende im Bereich der Luftblase eine kleine Öffnung gebohrt. Bei 6 Tage alten Bruteiern wurde im Durchlicht die Lage der Allantoishöhle des Embryo seitlich am Ei markiert und an dieser Stellen die Öffnung gebohrt. Durch dieses kleine Loch wurde mit einer Kanüle (0,55 x 25 mm) 100 µl der Virusverdünnung injiziert. Die Öffnung wurde danach mit Ponal-Klebstoff verschlossen. Die Eier wurden im Brutschrank bei 37°C (Flu A) oder 33°C (Flu B) und 80% Luftfeuchtigkeit für 48 bzw. 72 Stunden inkubiert. Danach wurden sie für mindestens 6 Stunden bei 4°C gekühlt, damit sich die Blutgefäße des Embryo zusammenziehen, was ein blutfreies Abnehmen der Allantoisflüssigkeit erleichtert. Die Eischale wurde im Bereich der Luftblase entfernt und die Eihaut mit der Pinzette abgezogen. Mit einer Spritze (Kanüle 1,2 x 40 mm) wurde die Allantoisflüssigkeit abgenommen, wobei der Dottersack mit einem stumpfen Spatel vor Verletzung durch die Kanüle geschützt wurde. Die Allantoisflüssigkeit wurde auf Eis gestellt. Das Stockvirus wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.2.2 Bestimmung des Virustiters

Hämagglutinationstest (HA-Test)

Der HA-Test erlaubt eine grobe Abschätzung der Konzentration von Influenzaviren. Das Hämagglutinin auf der Oberfläche der Influenzaviren bindet an endständige Neuraminsäuren von Hühnererythrozyten, welche dadurch quervernetzt werden (Hirst 1941). Da auch Membrantrümmer mit Hämagglutinin oder di-Partikel („defective interfering particles“, d.h. nicht replikationskompetente Viren, deren Segmenten Teile der kodierenden Sequenzen fehlen) zur Hämagglutination beitragen können, ist keine genaue Unterscheidung zwischen infektiösen und nichtinfektiösen Partikeln möglich.

In eine 96-Loch Mikrotiterplatte mit V-förmigen Vertiefungen (Fa. Greiner) wird 100 µl Virus in die erste Vertiefung der Reihe pipettiert, 50 µl PBS in jede folgende. Von den 100 µl Virus der ersten Vertiefung ausgehend, werden je 50 µl in die nächste Vertiefung überführt und gemischt. 50 µl der letzten Vertiefung werden verworfen. So entsteht eine 1:2 Verdünnungsreihe. Dann pipettiert man in jede Vertiefung 50 µl einer 1% Hühnererythrozytenlösung in PBS. Die Platte wird ca. 30 min. inkubiert, wobei sie auf Eis stehen sollte, um die Neuraminidaseaktivität abzuschalten. Bis zu einer gewissen Verdünnung sind genug Viren vorhanden, um die Erythrozyten zu vernetzen. Bei höherer Verdünnung können die Erythrozyten nicht mehr vernetzt werden, so dass sie absinken und in der Spitze der Vertiefung als Knöpfchen sichtbar sind. Als Hämagglutinationstiter (HA-Titer) wird der reziproke Wert der Verdünnungsstufe angegeben, bei der gerade noch eine Hämagglutination beobachtet wird.

Titrierung durch Immunfluoreszenzanalyse

Eine genauere Bestimmung der Anzahl infektiöser Influenza Viren erlaubt die indirekte Immunfluoreszenzanalyse infizierter MDCKII Zellen. Eine 24-Kalotten Zellkultur-platte wurde dafür mit Deckgläschen (∅12mm) bestückt und darauf die MDCKII Zellen ausgesät. Am nächsten Tag wurden die 80% konfluent gewachsenen Zellen mit der zu untersuchenden Viruslösung infiziert (siehe Kap. 2.2.1.3). Dafür wurden Virus-Verdünnungen von 1:10, 1:100. 1:1000 und 1:10000 in PBS/0,2%BA hergestellt und je 20µl davon plus 130 µl PBS/0,2%BSA pro Kalotte als Inokulum verwendet. 8 h nach Infektion (p. I.) wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und das virale Nukleoprotein mittels indirekter Immunfluoreszenz markiert (siehe Kap. 2.2.5.1). Unter dem Immunfluoreszenzmikroskop wurden alle NP-positiven Zellen eines Deckgläschens ausgezählt. Der Virustiter (ffu/ml) errechnet sich aus de Anzahl der NP-positiven Zellen

x 83 x Verdünnungsfaktor. Ffu steht dabei für "fluoreszenz forming units". Der Faktor 83 ergibt sich folgendermaßen: Die Fläche des Deckgläschens entspricht nur 60% der Gesamtfläche der Kalotte. Die Zellen auf dem Deckgläschen werden also nur von 60% der 20µl Virusverdünnung, also 12µl, infiziert. 83 ist somit der Umrechnungsfaktor von 12µl auf das Bezugsvolumen 1ml.

Beispiel für 155 NP-positive Zellen bei einer Verdünnung von 1:1000:
$155 \times 83 \times 1000 = 1{,}29 \times 10^7$ ffu/ml

2.2.2.3 Aufreinigen und Ankonzentrieren von Influenza Viren

Da das B/ΔNS1 Virus nur zu geringen Titern replizierte, musste das Virus über ein 30%igen Succrosekissen aufgereinigt und ankonzentriert werden. Dafür wurde zunächst die Allantoisflüssigkeit 5 min bei 3500 rpm in der Labofuge zentrifugiert, um Gewebestückchen und Erythrozyten zu entfernen. Anschließend wurden 10 ml einer 30%igen Succrose-NTE-Lösung in SW28 Polyalomer-Zentrifugenröhrchen (Beckmann) vorgelegt und mit der Allantoisflüssigkeit überschichtet. Durch Zentrifugation für 90 min bei 25.000 rpm im Rotor SW28 wurde das Virus durch das Succrosekissen pelletiert. Nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes wurde das Viruspellet in 400µl PBS/0,2%BSA aufgenommen und zum Lösen des Pellets über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Viruslösungen verschiedener Zentrifugenröhrchen vereinigt, gut gemischt und aliquotiert. Die Virusstammlösung wurde bei –80°C gelagert

2.2.2.4 Isolation viraler RNA

Zur Isolation der vRNA Segmente aus Stammlösungen von Influenza B Viren wurden das RNeasy® Kit sowie das QIAamp®MinElute™ Virus Spin Kit von QIAgen verwendet. Nach Aufschluss der Viren wird die RNA in Anwesenheit chaotroper Salze, an die Glasfasermembran der QIAgen-Säule gebunden und anschließen mit RNase-freiem ddH_2O oder dem mitgelieferten Puffer eluiert. Für das RNeasy® Kit wurde zunächst 1 ml Virus-Stammlösung für 30 min bei 55.000 rpm im Rotor TLA-45 zentifugiert. Das Viruspellet wurde dann in 600 µl RLT Puffer mit ß-Mercaptoethanol aufgenommen und nach Anweisungen des Herstellers weiter verarbeitet. Die virale RNA wurde mit 50 µl ddH_2O eluiert. Für das QIAamp®MinElute™ Virus Spin Kit wurde 100µl Virus-Stammlösung mit 100µl PBS verdünnt und nach Angaben des Herstellers weiterverarbeitet. Die virale RNA wurde mit 50 µl Puffer eluiert.

2.2.3 Konstruktion von Plasmiden

2.2.3.1 Reverse Transkriptions (RT)-PCR

Die RT-PCR ist eine Kombination von zwei Methoden. Bei der Reversen Transkription bindet ein Oligonukleotid (Primer) an das 3´-Ende der RNA. Durch die Reverse Transkriptase werden an den Primer Desoxyribonukleotide komplementär zur RNA angefügt und so die RNA in einzelsträngige (ss)DNA umgeschrieben. Diese wird dann bei der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) nach Bindung des Rückprimers an das 3´-Ende der ssDNA durch eine hitzestabile DNA-Polymerase zu doppelsträngiger DNA komplementiert. Anschließend wird diese durch aufeinanderfolgende Zyklen von Denaturierung, Anlagerung von Hin- bzw. Rückprimern und Kettenverlängerung exponentiell amplifiziert. Reverse Transkription und PCR können in einem Ansatz oder in zwei Ansätzen nacheinender durchgeführt werden. Man spricht dann von OneStep bzw. TwoStep RT-PCR. Für die Herstellung der viralen cDNA zur Subklonierung in pHW2000 wurde die TwoStep RT-PCR gewählt.

TwoStep RT-PCR

<u>TwoStep RT-Ansatz</u>

4 µl RNA + 1 µl UNI9 (0,5 µg/µl)

•5 min bei 70°C (entfernt Sekundärstrukturen in der RNA), anschließend 5 min auf Eis + 12,5 µl RNasefreies ddH_2O + 5 µl 5x M-MLV Puffer + 1,25 µl dNTP (jeweils 10mM) + 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase + 1 µl RNasin

<u>Cycler-Programm</u>

Reverse Transkription	37°C	60 min
Hitzeinaktivierung	70°C	15 min
Kühlen	4°C	∞

In der anschließenden PCR wurde die Pfu Turbo Polymerase (isoliert aus Pyrococcus furiosus) eingesetzt. Diese bietet durch ihre 3´→5´Exonukleaseaktivität eine sehr hohe Lesegenauigkeit.

TwoStep PCR-Ansatz

81,2 µl ddH_2O+ 10 µl 10x Pfu Puffer + 0,8 µl dNTP (25µM each) + 2 µl Turbo Pfu Polymerase (2,5U/µl) + 2 µl Primer #1 (20µM) + 2 µl Primer #2 (20µM) + 2 µl RT-Ansatz

Cycler-Programm für NS, M und HA

Denaturierung	94°C	5 min	
Primeranlagerung	52°C	30 sec	
Kettenverlängerung	72°C	3 min	35 Zyklen
Denaturierung	94°C	1 min	
Kettenverlängerung	72°C	5 min	
Kühlen	4°C	∞	

Cycler-Programm für NA, NP, PA, PB1 und PB2

Denaturierung	94°C	5 min	
Primeranlagerung	57°C	30 sec	
Kettenverlängerung	72°C	6 min	35 Zyklen
Denaturierung	94°C	10 sec	
Kettenverlängerung	72°C	10 min	
Kühlen	4°C	∞	

OneStep RT-PCR

Für die Analyse von zellulären mRNA Transkripten und vRNA aus der Gesamt-RNA von Zellen wurde das QIAGEN OneStep RT-PCR Kit verwendet. Im Enzym-Mix sind Omniscript™ und Sensiscript™ Reverse Transkriptasen enthalten sowie die HotStarTaq™ DNA Polymerase.

Ansatz

10 µl 5x Puffer + 2 µldNTP-Mix (je10mM) + 1,5 µl Primer hin (20µM) + 1,5 µl Primer rück (20µM) + 2,0 µl Enzym-Mix + 0,25 µl RNasin + 1 µg RNA

ad 50 µl dH_2O (RNase frei)

Cycler-Programm			
Reverse Transkription	50°C	30 min	
Hitzeinaktivierung der RT	95°C	15 min	
Denaturierung	95°C	30 sec	
Primeranlagerung	52°C	30 sec	35 Zyklen
Kettenverlängerung	72°C	3 min	
Kettenverlängerung	72°C	5 min	
Kühlen	4°C	∞	

2.2.3.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe bzw. Nukleotidanzahl. Es wurden 1-2 %-ige Agarosegele verwendet, als Puffer diente 1 x TBE-Puffer. Vor dem Gießen des Gels wurde Ethidiumbromid (0,3-0,5 µg/ml Endkonzentration) in die in Puffer aufgekochte Agarose pipettiert. Die Proben wurden vor dem Auftrag im Verhältnis 6:1 mit 6 x DNA-Probenpuffer versetzt. Als Größenstandard wurden die DNA-Marker „Mass Ruler^{TM} DNA-Ladder“ „low range“ und „high range“ benutzt. Die Gele liefen bei 90-110 V. Die DNA wurde anschließend auf einem Transilluminator über UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

2.2.3.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegel

Um DNA-Fragmente distinkter Größe aus einem Gemisch von DNA-Fragmenten zu isolieren, wurden die Fragmente zunächst über Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt. Die Bande mit den Fragmenten der korrekten Größe wurde unter UV-Licht ausgeschnitten. Die DNA wurde anschließend mit Hilfe des QIAEXII Gel Extraction Kits nach Angaben des Herstellers aus dem Agarosegel extrahiert. Dabei bindet DNA unter hohen Salzkonzentrationen (chaotrope Salze) und pH über 7,5 an Silica-Gelkügelchen. Verunreinigungen, wie Salze, Farbstoff und Ethidiumbromid binden nicht und werden durch den ethanolhaltigen Waschpuffer entfernt. Die DNA wurde mit 50 µl ddH_2O eluiert.

2.2.3.4 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die DNA an definierten Nukleotid-sequenzen schneiden (▼). Dies macht man sich zu Nutze, um durch Verdau von DNA

Fragmenten Nukleotidüberhänge an deren Termini zu erzeugen, die die Ligation in einen Vektors mit komplementären Überhängen ermöglicht.

Die Erkennungssequenzen liegen meist in Form eines Palindroms vor, wie z.B. bei NheI.

NheI: 5′...G▼CTAGC...3′
3′...CGATC▲G...5′

Bei *Bsm*BI, *Bsp*MI und *Aar*I handelt es sich um Typ I Restriktionsendonukleasen oder Auslegerenzyme, d.h. die Schnittstelle liegt einige Nukleotide nach einer nicht palindromischen Erkennungssequenz.

*Bsm*BI 5′...CGTCT C$(N)_1$▼...3′
3′...GCAGAG$(N)_5$▲...5′

*Bsp*MI 5′...ACCTGC$(N)_4$▼...3′
3′...TGCACG$(N)_8$▲...5′

*Aar*I 5’…CACCTGC$(N)_4$▼…3’
3’ ...GTGGACG$(N)_8$▲....5′

Reaktionsansatz für PCR-Fragmente

45 µl PCR-Fragment (nach Gelreinigung)
5 µl 10x Puffer
2,5 µl *Bsm*BI, *Bsp*MI oder *Aar*I

Reaktionsansatz für pHW2000

1 µl pHW2000 (1µg)
2 µl 10x Puffer
1 µl *Bsm*BI
16 µl ddH_2O

Inkubation über Nacht bei 37°C

Für die Identifikation positiver Bakterienklone, die Plasmide mit dem gewünschten Insert enthalten, kann die über Miniprep isolierte Plasmid-DNA (Kap. 2.2.3.8) mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut werden. Das Restriktionsmuster nach Auftrennung über Agarosegel-Elektrophorese gibt Aufschluss über die Identität der inserierten DNA.

Reaktionsansatz für Kontrollverdau von Miniprep-Plasmiden

5 µl Miniprep-DNA + 0,5 µl Enzym + 1µl Puffer + 3,5 µl H_2O 2 Stunden bei 37°C

2.2.3.5 Ligation von DNA-Fragment und Vektor

Besitzen verdaute DNA-Fragmente und Vektor komplementäre Nukleotidüberhänge, lassen sie sich miteinander ligieren. Dabei nutzte man die Fähigkeit der T4 Ligase, die 3´-OH-Gruppen und freien 5´-Phosphatgruppen durch Phosphodiesterbindungen kovalent zu verknüpfen. Für den Ansatz sollten Vektor und Insert im Verhältnis von 1:3 bis 1:10 eingesetzt werden.

Reaktionsansatz

1µl Vektor pHW2000, verdaut mit BsmBI

15µl Fragment, verdaut mit *Bsm*BI, *Bsp*MI oder *Aa*rI

2µl T4 Ligase HC (1:3 verdünnt)

2µl 10x Puffer mit ATP

Inkubation: 3 Stunden bei Raumtemperatur

2.2.3.6 Herstellung kompetenter *E. coli* XL1 blue Bakterien

Eine 200 ml Bakterien-Hauptkultur wurde mit 10 ml einer Übernacht-Vorkultur angeimpft und bei 37°C geschüttelt. Bei einer OD_{600} von 0,5 wurden die Bakterien geerntet (10 min, 4000 rpm, 4°C). Das Bakterienpellet wurde in 20 ml eiskalter 100 mM $MgCl_2$-Lösung aufgenommen und 1 h auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert. Dieses Pellet wurde dann in 8 ml 100 mM $CaCl_2$ resuspendiert und für weitere 60 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Bakteriensuspension mit Glycerol versetzt, aliquotiert und schockgefroren. Die Bakterien wurden bis zur Verwendung bei -80^{o}C gelagert.

2.2.3.7 Transformation von *E. coli*

Die auf Eis aufgetauten *E. coli* Bakterien wurden mit unterschiedlichen Mengen (20 – 200 ng) an Plasmid-DNA gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Hitzeschock für 90 sec bei 42°C und 2 min auf Eis wurden die Zellen mit 500 µl SOC-Medium vermischt und bei 37°C für ca. 30 min geschüttelt. Danach wurden unterschiedliche Mengen der Bakteriensuspension auf LB-Platten mit den jeweiligen Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37° C inkubiert.

2.2.3.8 Plasmidpräparation

Zur Präparation von Plasmiden aus Bakterien wurde das QIAGEN QIAprep® 8 Miniprep Kit für kleine Bakterienvolumen oder das QIAfilter Plasmid Maxi Kit für größere Volumen benutzt.

Miniprep

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der alkalischen Lyse der Bakterien, anschließender Neutralisation und Einstellung auf Hochsalz-Bindungsbedingungen. Die Plasmid DNA wird dann spezifisch an die Silicagelmembran in einer QIAprep Säule gebunden und mit ethanolhaltigem Puffer gewaschen. Da bei Niedrigsalzbedingungen und pH 7,0 bis 8,5 die Membran DNA nicht mehr bindet, kann mit Wasser eluiert werden.

Zunächst wurden Kolonien von der Platte in 4 ml 2xYT-Medium mit Ampicilin überführt und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Von den Übernachtkulturen wurde je 1 ml für 10 min bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert und das Bakterienpellet entsprechend den Anweisungen des Herstellers weiterbearbeitet. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 100 µl ddH_2O.

Maxiprep

Mit dieser Methode können größere Mengen Plasmid-DNA aufgereinigt werden. Die Bakterien werden durch alkalischen Puffer lysiert und dann neutralisiert. Nachdem das Präzipitat aus Bakterienhülle und Proteinen über eine QIAfilter-Patrone herausgefiltert worden ist, bindet die Plasmid-DNA unter Niedrigsalz-Bedingungen an die Anionen-tauschersäule. Verunreinigungen werden durch Waschen mit einem Puffer mittleren Salzgehalts entfernt. Mit einem Hochsalzpuffer wird die DNA eluiert und mit Isopropanol gefällt um die DNA zu entsalzen. Nach einem weiteren Waschschritt mit 70%igem Ethanol kann die DNA in Wasser aufgenommen werden.

Dazu wurden 200 µl der Miniprep Übernachtkultur in 200 ml 2xYT-Medium mit Ampicilin überführt und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Bakterienkulturen wurden mit dem QIAfilter Plasmid Maxi Kit entsprechend den Herstellerangaben weiter bearbeitet. Die Plasmid-DNA Pellets wurden in ddH_2O aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde durch Spektralphotometrie ermittelt und auf 1µg/µl eingestellt.

2.2.3.9 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

In Wasser gelöste DNA und RNA hat bei 260 nm ein Absorptionsmaximum. Dies nutzt man, um durch spektralphotometrische Analysen mit Präzisions-Küvetten aus Quarzglas (Schichtdicke 10mm) die Konzentration zu bestimmen.

$$Optische\ Dichte(OD) = Absorption\ (A_{260}) = Transmission_{Probe} / Transmission_{Lösungsmittel}$$

DNA-Konzentrationsbestimmung

Die zu messende DNA-Probe wurde mit ddH_2O verdünnt. Über den Absorptionswert (A_{260}) wurde die Konzentration mit folgender Formel berechnet:

1 OD = 50µg/ml

DNA-Konzentration [µg/µl] = A_{260} x 50 µg/ml x Verdünnungsfaktor/1000

RNA-Konzentrationsbestimmung

Die zu messende RNA-Probe wurde mit ddH_2O verdünnt. Über den Absorptionswert (A_{260}) wurde die Konzentration mit folgender Formel berechnet:

1 OD = 40µg/ml

RNA-Konzentration [µg/µl] = A_{260} x 40 µg/ml x Verdünnungsfaktor/1000

2.2.3.10 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Für die Sequenzierung von DNA wurde das ABI BigDye® Terminator 3.1 Kit benutzt. Das Prinzip beruht auf der Kettenabbruch-Methode nach Sanger (Sanger *et al*., 1977). Dabei wird eine lineare PCR durchgeführt, in deren Ansatz neben den vier Desoxynukleotiden (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) auch fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP) vorliegen. Wird bei der Kettenverlängerung ein Didesoxynukleotid eingebaut, kommt es aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxylgruppe am ddNTP zum Kettenabbruch. Der Einbau der Didesoxynukleotide ist zufällig. Daher liegen nach entsprechender Zyklenanzahl Abbruchfragmente jeder möglichen Nukleotidzahl vor, welche über ein denaturierendes Polyacryamidgel ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Da die vier Didesoxynukleotide mit unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, kann während der Elektrophorese ermittelt werde, welches Didesoxynukleotid sich an der Abbruchstelle befindet. Durch eine spezielle Software wird das so entstandene Fluoreszenzmuster zur Nukleotidsequenz verarbeitet.

Die in der Sequenzier-PCR eingesetzte DNA-Menge richtet sich nach der Länge des DNA-Fragments (template):

1-3 ng (Fragmentgröße 100-200 bp)
3-10 ng (Fragmentgröße 200-500 bp)
10-20 ng (Fragmentgröße 500-1000 bp)
150-300 ng (Plasmid-DNA)

Sequenzieransatz

Template DNA + 0,5 µl Primer (20 µM) + 1 µl BigDye 3.1 ad 10 µl ddH_2O

Cycler-Programm

Denaturierung	95°C	1 min	
Denaturierung	95°C	10 s	
Annealing	55°C	5 s	25 Zyklen
Elongation	60°C	4 min	
Pause	4°C	∞	

Die Sequenzierproben wurden nach der PCR im hausinternen Sequenzierlabor des RKI gereinigt, elektrophoretisch aufgetrennt und mit der Sequencing Analyses 3.7 Software ausgewertet.

2.2.3.11 Subklonierung der Influenza B/Lee/40 Gensegmente in den Vektor pHW2000

Für die Subklonierung der acht Gensegmente des Influenza B/Lee/40 Virus in den Vektor pHW2000 wurde zunächst aus einer Virus-Stammlösung die virale RNA mittels des RNeasy® Kits isoliert (Kap. 2.2.2.4). Anschließend wurden die vRNA Segmente in einer TwoStep RT-PCR zunächst in ssDNA umgeschrieben, dann zu dsDNA komplettiert und amplifiziert (Kap. 2.2.3.1). Der bei der RT benutzte Primer UNI9 bindet an einen hochkonservierten Bereich am 3'-Terminus der vRNAs und ermöglicht somit die reverse Transkription aller vRNAs. Die in der PCR benutzten segmentspezifischen Primerpaare (BsmBI-PB1#1 und #2, BsmBI-PB2#1 und #2, BsmBI-PA#1 und #2, AarI-HA#1 und#2, BspMI-NP#1und #2, BsmBI-NA#1 und #2, BsmBI-M#1 und #2 BsmBI-NS#1 und #2) fügten bei der Komplettierung und Amplifikation der jeweiligen Gensegmente Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *Bsm*BI, *Bsp*MI oder *Aar*I an.

Da bei der RT-PCR der einzelnen vRNA Segmente DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe entstanden waren, wurden die RT-PCR Produkte über Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt (Kap. 2.2.3.2), die Bande der richtigen Größe ausgeschnitten und aus dem Gel extrahiert (Kap. 2.2.3.3). Die DNA-Fragmente wurden mit den Enzymen *Bsm*BI, *Bsp*MI und *Aar*I, der Vektor pHW2000 mit *Bsm*BI verdaut (Kap. 2.2.3.4). Die verdauten DNA-Fragmente wurden über das QIAquik PCR Purification

Kit aufgereinigt. Durch die Auswahl der Primerpaare waren bei der Amplifikation der DNA-Fragmente Nukleotidsequenzen angefügt worden, so dass nach Verdau mit *Bsm*BI, *Bsp*MI und *Aar*I identische Überhänge entstanden. Dies ermöglichte es, die verdauten Fragment in den mit *Bsm*BI verdauten Vektor pHW2000 zu ligieren (Kap. 2.2.3.5). Von den Ligationsansätze wurden anschließend 10µl in 100µl chemisch kompetente *E. coli* XL1 blue Bakterien transformiert und auf LB-Platten mit Ampicilin selektioniert (Kap. 2.2.3.7). Aus den Bakterienkolonien wurde durch Miniprep Plasmid-DNA isoliert (Kap. 2.2.3.8). Über anschließenden Restriktionsverdau (Kap. 2.2.3.4) wurden Klone identifiziert, die das gewünschte Influenza B Virus Gensegment in den Vektor pHW2000 inseriert hatten. Die so hergestellten Präparationen der Plasmide pHW-Lee-PB1, pHW-Lee-PB2, pHW-Lee-PA, pHW-Lee-NP, pHW-Lee-HA, pHW-Lee-NA, pHW-Lee-M und pHW-Lee-NS wurden anschließend sequenziert (Kap. 2.2.3.10), um die Nukleotidsequenz der viralen Gensegmente und die Übergänge zwischen Gensegment und Vektor zu überprüfen. Von diesen Plasmiden wurden über Maxiprep größer DNA-Mengen aufgereinigt (Kap. 2.2.3.8). Die DNA-Konzentration wurde durch Spektralphotometrie ermittelt (Kap. 2.2.3.9) und auf 1µg/µl eingestellt.

2.2.3.12 Gezielte Mutagenese von pHW-Lee-NS mittels QuikChange™

Mit dieser Methode lassen sich gezielte Mutationen (ein oder mehrere Nukleotidaustausche, Insertionen, Deletionen) in ein Plasmid einbringen. In dieser Arbeit wurde das QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene verwendet, um diverse Punktmutationen und neue Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen als genetischen Marker in das Plasmid pHW-Lee-NS einzufügen. Die dabei benutzten Primerpaare sind in Kap. 2.1.7 aufgeführt. Zunächst wurde eine *Xho*I-Schnittstelle in den Vektor pHW-Lee-NS eingeführt. Der daraus entstandene Vektor pHW-Lee-NS-XhoI diente als Vorlage für die anderen Mutagenese-Reaktionen.

Mit den gegenläufigen Primerpaaren, die die Mutation enthielten, wurden mehrere PCR-Zyklen durchlaufen. Dabei lagerte sich je ein Primer an den Plasmideinzelstrang an und wurde durch die Pfu Polymerase verlängert. So entstanden Plasmidstränge, die die gewünschte Mutation trugen, aber nicht kovalent geschlossen waren (Einzelstrangbrüche). Die Plasmide, die noch parentale DNA enthielten, wurden über den DpnI-Verdau entfernt. DpnI ist eine Endonuklease, die die Nukleotidsequenz 5´-G^{m6}ATC-3´ erkennt und somit spezifisch für methylierte und halbmethylierte DNA ist.

Da nur die parentale Plasmid-DNA durch ihre Vermehrung in *E. coli* methyliert waren, im Gegensatz zu der neusynthetisierten DNA, konnte diese so spezifisch aus dem Ansatz entfernt werden. Der prinzipielle Ablauf der Mutagenese ist in Abb. 2.1 dargestellt. Über Transformation in E.coli XL1-blue wurden die Einzelstrangbrüche repariert und die Plasmide amplifiziert. Die Selektion erfolgte über die auf dem Plasmid kodierte Ampicillinresistenz.

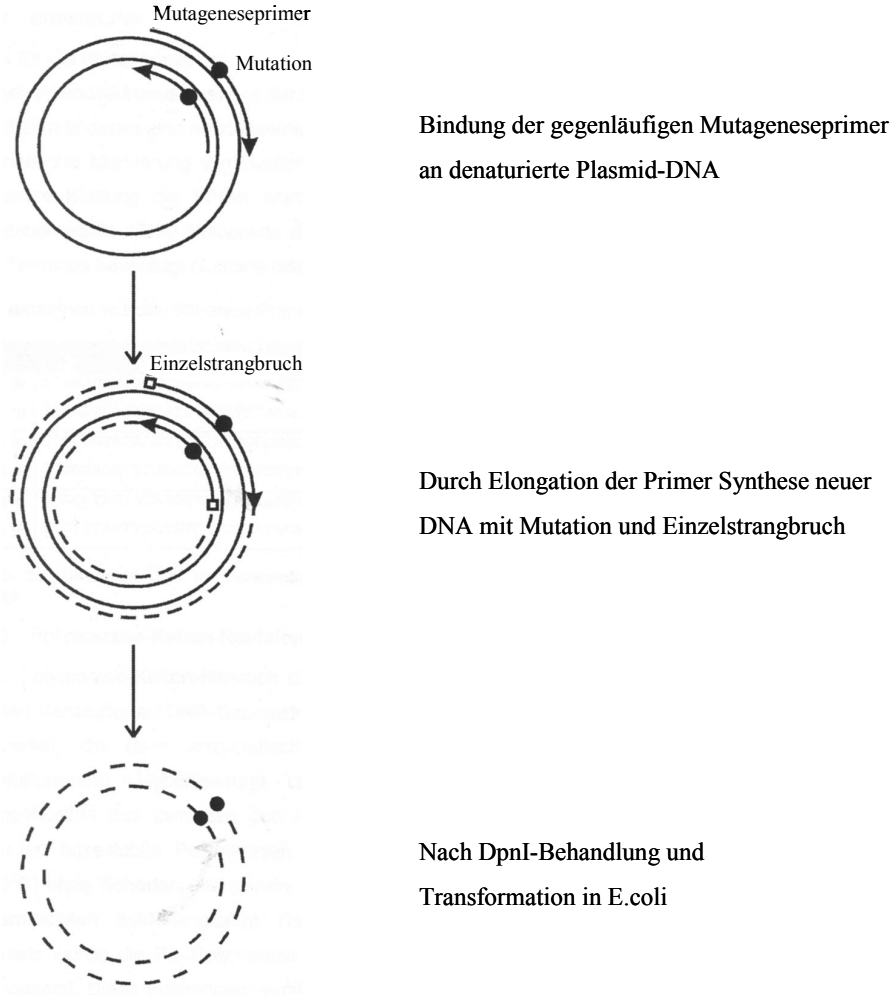


Abb. 2.1: Schema der gezielten Mutagenese (nach QuikChange™Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene, Heidelberg)

Entwurf der Mutageneseprimer

Die Primer sind komplementär zu beiden Strängen der zu verändernden DNA, enthalten die gewünschte Mutation und überspannen ca. 15 Nukleotide zu beiden Seiten der Mutationsstelle. Der CG-Gehalt der Primer sollte über 40% liegen. Die Schmelztemperatur T_m sollte größer oder gleich 78°C sein und berechnet sich nach folgender Formel: Tm = 81,5°C + 0,41 (%GC) – 675/N - % mismatch

N: Anzahl der Nukleotide; % mismatch: Anteil der ausgetauschten Nukleotide an N

Beispiel: Enführung einer XhoI-Schnittstelle in pHW-Lee-NS

Lee-NS-XhoI-F	5'GAATAAAAGGATGTCTCT**C**GA**G**GAGAGAAAAGCAATTGG
pHW-Lee-NS	5'GAATAAAAGGATGTCTCT**T**GA**A**GAGAGAAAAGCAATTGG 3'CTTATTTTCCTACAGAGA**A**CT**T**CTCTCTTTTCGTTAACC
Lee-NS-XhoI-R	3'CTTATTTTCCTACAGAGA**G**CT**C**CTCTCTTTTCGTTAACC

PCR-Ansatz und DpnI-Verdau

5µl 10x Reaktionspuffer + 1µl Plasmid 25ng/µl + 1,5µl Primer F 100ng/µl + 1,5µl Primer R 100ng/µl + 1µl dNTPs 25mM + 1µl Pfu Turbo Polymerase (2,5U/µl)
ad 50µl dH_2O

Cyclerprogramm

Denaturierung vor 1. Zyklus	95°C	1 min	
Denaturierung	95°C	30 s	
Primerbindung	49°C	1 min	18 Zyklen
Kettenverlängerung	68°C	8 min	
Kühlen nach letztem Zyklus	4°C	∞	

Zeit für Kettenverlängerung pro Zyklus = 2 min pro 1000bp Plasmid

Nach der QuikChange PCR wurden 2µl DpnI zugegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach dem Verdau sollten nur noch Plasmide vorliegen, die die eingeführte Mutation tragen. Mit diesen wurden dann die im Kit enthaltenen superkompetenten *E. coli* XL1-blue nach Angaben des Herstellers transformiert und auf LB-Platten mit Ampicilin über Nacht bei 37°C selektioniert. Die Plasmide der Kolonien wurde über Miniprep (Kap. 2.2.3.8) isoliert und über Restriktionsverdau (Kap. 2.2.3.4) durch die Markerenzyme *Bse*MI, *Hind*III, *Nhe*I, *Pst*I, *Sal*I, *Xho*I und *Sap*I Klone mit erfolgreicher Mutagenese identifiziert. Diese Plasmide wurden weiterhin sequenziert (Kap. 2.2.3.11) und über Maxiprep größere Mengen der folgenden Plasmide präpariert (Kap. 2.2.3.8): pHW-Lee-NS-XhoI, pHW-Lee-NS-33/38, pHW-Lee-NS-47/50, pHW-Lee-NS-52/53/54, pHW-Lee-NS-58/60/64, pHW-Lee-NS-77/78, pHW-Lee-NS-83/86 und pHW-Lee-NS1-104.

2.2.3.13 Herstellung des Plasmids pHW-Lee-NS-delNS1B

Zur Herstellung des Plasmids pHW-Lee-NS-delNS1B wurden 1 x 10^6 MDCKII Zellen mit Influenza B/Lee/40 Virus mit einer MOI von 2 infiziert. 6 Stunden nach Infektion (p.I.) wurden die Zellen in 350 µl Lysispuffer aufgenommen und über eine QIAshredder-Säule nach Angaben des Herstellers homogenisiert. Die mRNA wurde über das Oligotex Direct mRNA Kit isoliert. 10 µl der mRNA wurden in eine OneStep-RT-PCR mit den Primern BsmBI-NS#1 und BsmBI-delNS1#2 eingesetzt (Kap. 2.2.3.1). Die RT-PCR Produkte wurden über Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt, die Bande der DNA-Fragmente von ca. 500 bp Länge wurde ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel extrahiert (Kap. 2.2.3.3). Alle folgenden Schritte der Subklonierung in den Vektor pHW2000 und der Präparation der pHW-NS-delNS1B Plasmide entsprechen der Beschreibung in Kap. 2.2.3.11.

2.2.3.14 Subklonierung des B/NS1 Leserahmens in pcDNA-3 und pcDNA-3.1 A

Weiterhin wurde der B/NS1 Leserahmen in die Vektoren pcDNA-3 und pcDNA-3.1 subkloniert. Der Vektor pHW-Lee-NS-XhoI (20 µg) und die Primer Lee-NS1-HindIII und Lee-NS1-SalI bzw. Lee-NS1-HindIII und Lee-NS1-SalI-tag wurden in eine PCR-Reaktion eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen entsprachen dem halben Ansatz der TwoStep PCR mit dem Unterschied, dass die Polymerase des High Expand Kits verwendet wurde. Es wurde das TwoStep Cycler-Programm für die Amplifikation von NS verwendet (Kap. 2.2.3.1). Die PCR-Produkte wurden mit den Enzymen HindIII und SalI verdaut, die Plasmide wurden mit HindIII und XhoI verdaut. Die Reaktionsbedingungen entsprachen den in Kap. 2.2.3.4 beschriebenen. Das weitere Vorgehen gleicht dem für die Subklonierung der Influenza Segment in pHW2000 (Kap. 2.2.3.11). Dies ergab die Plasmide pcDNA-B/NS1 und pcDNA-B/NS1-myc.

2.2.4 Herstellung rekombinanter Influenza B/Lee Viren

2.2.4.1 Herstellung des rekominanten WT B/Lee Virus

Um das rekombinante WT Influenza B/Lee Virus herzustellen, wurden je 0,5 µg der Plasmide pHW-Lee-PB1, pHW-Lee-PB2, pHW-Lee-PA, pHW-Lee-NP, pHW-Lee-HA, pHW-Lee-NA, pHW-Lee-M und pHW-Lee-NS-XhoI mit 4,5 µl LF2000 in 2,5 x 10^6 293T Zellen transfiziert, wie in Kap. 2.2.1.4 beschrieben. 6 Stunden nach Transfektion wurde das Medium gegen Infektionsmedium (D-MEM) mit 2 µg/ml TPCK-behandeltem Trypsin ausgetauscht und für 48 Stunden bei 33°C im Brutschrank

inkubiert. Die in den Überstand freigesetzten rekombinanten Influenza B Viren wurden in 11 Tage alten embryonierten Hühnereiern passagiert (Kap. 2.2.2.1).

2.2.4.2 Herstellung der rekominanten Influenza B Virusmutanten

Die Herstellung der Influenza B Virusmutanten B/ΔNS1, B/NS1 33/38, B/NS1 47/50, B/NS1 52/53/54, B/NS1 58/60/64, B/NS1 77/78, B/NS1 83/86 und B/NS1-104 erfolgte nach dem gleichen Schema, mit dem Unterschied, dass das Plasmid pHW-Lee-NS-XhoI durch die entsprechenden Plasmide mit den mutierten NS-Segmenten (pHW-Lee-NS-delNS1B, pHW-Lee-NS-33/38, pHW-Lee-NS-47/50, pHW-Lee-NS-52/53/54, pHW-Lee-NS-58/60/64, pHW-Lee-NS-77/78, pHW-Lee-NS-83/86 und pHW-Lee-NS1-104) ersetzt wurde. Bei der Generierung des B/ΔNS1 Virus wurde zusätzlich 0,5 µg pcDNA-A/NS1 kotransfiziert. Ein weiterer Unterschied ist, dass die Virusmutanten in 6 Tage alten Bruteiern passagiert wurden.

2.2.4.2 Kontrolle der rekombinanten Viren

Die Identität des rekombinanten WT Virus und der Virusmutanten wurde durch RT-PCR Analyse der NS Segmente und Kontrollverdau mit den Marker-Restriktionsendonukleasen überprüft. Die vRNA wurde dafür mit dem QIAamp®MinElute™ Virus Spin Kit aus den Stammlösungen isoliert (Kap. 2.2.2.4). Die RT-PCR wurde durchgeführt, wie in Kap. 2.2.3.1 für die OneStep RT-PCR beschrieben. Dabei wurden 10 µl RNA eingesetzt. Der Kontrollverdau der über diese RT-PCR amplifizierten NS Segmente entsprach dem Ansatz für Kontrollverdau für Miniprep-DNA (Kap. 2.2.3.4) mit 5 µl RT-PCR Produkt. Die DNA-Fragmente wurden über ein 2% Agarosegel aufgetrennt. Außerdem wurden die RT-PCR Produkte der NS Segmente durch Sequenzierung (2.2.3.10) nochmals kontrolliert.

2.2.5 Zellbiologische und molekularbiologische Methoden

2.2.5.1 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse

Zur Lokalisierung zellulärer und viraler Proteine wurde in dieser Arbeit die indirekte Immunfluoreszenzanalyse angewandt. Ein primäre Antikörper bindet zunächst an das entsprechende Protein in der Zelle. Der sekundäre Antikörper erkennt und bindet speziesspezifisch den F_c-Teil des primären Antikörpers. Der sekundäre Antikörper ist zusätzlich mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, der nach Anregung mit Licht spezifischer Wellenlänge in der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht wird.

Die auf Deckgläschen in Kulturschalen ausgesäten Zellen wurden dafür zunächst mit 2,5 %-iger Formaldehydlösung in PBS für 15 min fixiert und anschließend mit 0,2 %-iger Triton-X-100-Lösung in PBS für 10 min permeabilisiert. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Der primäre Antikörper wurden in PBS/ 3 % BA verdünnt. 20 µl der Antikörperverdünnung wurden auf einem Stück Parafilm vorgelegt. Das Deckgläschen wurde mit der Zell-bewachsenen Seite nach unten auf die Antikörperlösung gelegt und in einer feuchten Kammer 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Ebenso wurde mit dem sekundären Antikörper verfahren aber nur 45 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurde drei mal mit PBS gewaschen und das Deckgläschens kurz in H_2O getaucht. Auf einem Objektträger wurden 7,5 µl Mowiol-Lösung vorgelegt und das Deckgläschen mit der Zellseite nach unten darauf gelegt. Die Präparate wurden bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt. Die so markierten Proteine wurden über Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht und photographiert. Die Verdünnungen der Antikörper sind unter 2.1.11 und 2.1.12 aufgeführt.

2.2.5.2 IRF-3 Translokations-Assay

Dieser Versuch dient der Analyse der IRF-3 Lokalisation während einer Infektion mit verschiedenen rekombinanten Influenza B Viren. 1 x10^6 MDCKII Zellen wurden dafür mit 0,5 µg pEGFP-C1-hIRF-3 und 1 µg pcDNA-3 in einer Kulturschale mit 4 Deckgläschen transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit Influenza B/Lee Virus, B/ΔNS1 Virus oder den B/NS1 Virusmutanten mit einer MOI von 1 oder zum Schein infiziert und 8 Stunden bei 33°C im Brutschrank inkubiert. Durch Fluoreszenzmarkierung mit dem α-B/NP Antikörper und dem rot-fluoreszierenden Sekundär-Antikörper wurde das virale NP-Protein detektiert. Die Lokalisation des grün fluoreszierenden IRF-3/EGFP-Fusionsproteins in infizierten, NP-positiven Zellen wurde durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Der Anteil der Zellen

mit nukleärem IRF-3 wurde durch Auszählen von jeweils ca. 100 infizierten Zellen in unterschiedlichen Gesichtsfeldern ermittelt.
Die Auswirkung der B/NS1 Koexpression wurde in einem ähnlichen Ansatz analysiert. Dazu wurden 1 x10^6 MDCKII Zellen wurden mit 0,5 µg pEGFP-C1-hIRF-3 und 2,5 µg pcDNA-3 bzw. mit 0,5 µg pEGFP-C1-hIRF-3 und 2,5 µg pcDNA-B/NS1-myc transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit dem Influenza A/delNS1 Virus mit einer MOI von 2 infiziert und 8 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Durch Markierung des A/NP Proteins mit dem α-A/NP Antikörper und dem rot-fluoreszierenden Sekundär-Antikörper wurde exemplarisch für ein Deckgläschen sichergestellt, dass alle Zellen infiziert waren. Für die übrigen Deckgläschen wurden das B/NS1 Protein über einen α-myc Antikörper markiert. Die Auswertung erfolgte ebenfalls über Immunfluoreszenzmikroskopie.

2.2.5.3 Luziferase-Reportergen-Studien

Um die Aktivierung des IFN-ß Promotors während einer viralen Infektion zu untersuchen, wurden Luziferase-Reportergen-Versuche durchgeführt. In den hier verwendeteten Konstrukten p125-Luc bzw. p125-Luc-neoR steht das Leuchtkäfer-Luziferasegen unter der Kontrolle des IFN-ß Promotors. Die Aktivierung des Promotors führt zur Expression der Luziferase. Diese setzt in einer enzymatischen Reaktion das Substrat Luziferin um. Die dabei auftretende Lumineszenz wird über ein Luminometer detektiert und ist ein Maß für die Aktivität des Promotors.

Zunächst wurden 5 x 10^5 MDCK-C3 Zellen, die den Vektor p125-Luc-neoR stabil enthalten, mit Influenza B Viren oder Influenza A Viren mit einer MOI von 1 infiziert oder Kontroll-behandelt. Die Zellen wurden 8 Stunden bei 33°C (Flu B) oder 37°C (Flu A) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen, in 100 µl Reporter Lysis Puffer (Luciferase Reporter Assay System) lysiert und 10 min bei 13.000 rpm und 4°C in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Für die Bestimmung der Luziferase-Aktivität in den Überständen wurde das Luciferase Reporter Assay System von Promega und ein Luminometer der Marke EG+G Berthold benutzt. Die Luziferase-Aktivität der Lysate wurden auf gleichen Proteingehalt normalisiert. Der relative Proteingehalt wurde mit dem BioRad-Protein-Assay nach Angaben des Herstellers photometrisch bestimmt. Die Aktivität des Reportergens in infizierten Zellen wurde in Doppelansätzen ermittelt und im Vergleich zur Aktivität in Kontroll-behandelten Zellen angegeben.

Der Einfluss der Proteine B/NS1 oder A/NS1 auf die Induktion des IFN-ß Promotors durch die Infektion mit B/ΔNS1 Virus oder A/delNS1 Virus wurde in einem ähnlichen Versuchsansatz analysiert. Dazu wurden MDCKII Zellen mit dem Plasmid p125-Luc transfiziert. Ein Transfektionsansatz für 1 x 105 Zellen enthielt 50 ng p125-Luc, 5 ng pRL-TK-Luc (*Renilla*) sowie je 1 µg pcDNA-3, pcDNA-B/NS1 oder pcDNA-A/NS1. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen entweder mit B/ΔNS1 Virus oder A/delNS1 Virus mit einer MOI von 1 infiziert oder Kontroll-behandelt. 8 Stunden p. I. wurden die Zellen in 100µl Passive Lysis Puffer (Dual-Luciferase Reporter Assay System) lysiert. Die Aktivitäten der Leuchtkäfer-Luziferase und der *Renilla*-Luziferase wurden mit dem Dual-Luciferase Reporter Assay System bestimmt. Über die Aktivität des konstitutiv aktiven TK Promotors wurden die IFN-ß Promotoraktivität normalisiert. Die Virus-vermittelte Aktivierung Leervektor-transfizierter Zellen wurden auf 100% gesetzt und mit der Aktivierung in B/NS1 oder A/NS1 Protein exprimierenden Zellen verglichen.

2.2.5.4 Analyse von mRNA Transkripten mittels RT-PCR

Für die Analyse der Transkription von IFN-ß mRNA nach Infektion mit Influenza B Viren wurden A549 Zellen benutzt. 1 x 10^6 Zellen wurden mit einer MOI von 1 oder zum Schein infiziert und 16 Stunden bei 33°C inkubiert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert. Dazu wurden die Zellen in 350 µl RLT-Puffer mit ß-Mercaptoethanol lysiert und durch Zentrifugation für 2 min bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge durch eine QIAshredder-Säule homogenisiert. Die RNA wurden mit Hilfe des RNeasy Kits nach Angaben des Herstellers isoliert. Die RNA-Menge wurde durch Spektralphotometrie (Kap. 2.2.3.9) bestimmt. Je 1 µg RNA wurde anschließend in eine OneStep RT-PCR eingesetzt (Kap. 2.2.3.1). Die dabei benutzten Primerpaare waren spezifisch für die IFN-ß mRNA (hIFN-ß 3' und 5'), für das virale NP-Segment (BspMI-NP#1 und BspMI-NP#2) oder für die ß-Aktin mRNA (ß-Actin 3' und 5'). Das in Kap. 2.2.3.1 angegebene Cycler-Programm wurde dafür folgendermaßen verändert:

	Primeranlagerung	Kettenverlängerung	Zyklen
IFN-ß mRNA	60°C	45 sec	23
NP Segment	57°C	2 min	32
ß-Aktin mRNA	55°C	45 sec	25

Die RT-PCR Produkte wurden anschließend über ein 2%iges Agarosegel aufgetrennt.

2.2.5.5 ELISA („Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay“)

Diese Methode erlaubt den Nachweis von Proteinen in Überständen von Zellen oder anderen Flüssigkeiten. Die Grundfläche einer 96-Kalotten-Mikrotiterplatte ist mit dem Antikörpern gegen das nachzuweisende Protein beschichtet. Nach Bindung des Antigens wird ein zweiter Antikörper zugegeben, der ebenfalls das nachzuweisende Protein bindet und mit einem Enzym, wie zum Beispiel der Meerrettich-Peroxidase (HRP) kovalent verknüpft ist. Das Enzym setzt ein zugegebenes chromogenes Substrat um. Die Intensität der Farbreaktion wird photometrisch bei 450 nm bestimmt und ist ein Maß für die Konzentration des gebundenen Proteins.

In dieser Arbeit wurden ELISA Kits für humanes INF-ß und humanes IFN-α verwendet um die Menge dieser Zytokine in den Überständen infizierter A549 Zellen zu quantifizieren. 1 x 10^6 Zellen wurden mit den verschiedenen rekombinanten Influenza B Viren mit einer MOI von 1 oder zum Schein infiziert und 18 Stunden bei 33°C inkubiert. Das Medium (1 ml pro Schale) wurde abgenommen und der IFN-ß bzw. IFN-α Gehalt wurde nach Angaben der Hersteller mit den ELISA Kits bestimmt.

2.2.6 Proteinanalytische Arbeiten

2.2.6.1 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine können durch die denaturierende SDS-Polyacrylamid(PAA)-Gelelektrophorese nach Denaturierung und Ladungsausgleich (durch ß-Mercaptoethanol und SDS) aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichts aufgetrennt werden.

Herstellung eines SDS-PAA-Gels

Zusammensetzung der SDS-Gele	Trenngel			Sammelgel
	7,5 %	12,5 %	15 %	5 %
30% Acrylamid/Bis (29:1)	2,6 ml	4,1 ml	5,0 ml	0,83 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml			
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)				1,25 ml
H_2O	4,7 ml	3,2 ml	2,8	
10 % SDS	100 µl			50 µl
10 % APS	100 µl			50 µl
TEMED	6 µl			6 µl

Zunächst wurden zwei mit Isopropanol gereinigte Glasplatten in eine Mini-Protean 3-Gießvorrichtung eingespannt. Der Abstand der Platten beträgt bei dünnen Gelen 75 mm, bei dicken Gelen 150 mm. Das Trenngel wurde entsprechend der obigen Angaben angesetzt, in den Zwischenraum der Platten ca. 4 cm hoch eingefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Sobald das Acrylamid polymerisiert war, wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel eingefüllt und der Kamm zum Freihalten der Taschen eingesteckt. Nach Polymerisation des Sammelgels wurde das Gel in eine Miniprotein-Gelkammer eingebaut, der 1x SDS-Elektrophoresepuffer wurde eingefüllt und der Kamm wurde gezogen. Die Proben wurden im Verhältnis 1:2 mit 2 x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C inkubiert, kurz abzentrifugiert und auf das Gel auftragen. Pro Gel wurde eine Stromstärke von 25 mA angelegt. Die Elektrophorese wurde gestoppt, nachdem die Frontmarkerbande (Bromphenolblau) aus dem Gel herausgelaufen war.

2.2.6.2 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die native PAA-Gelelektrophorese erlaubt die Auftrennung von Proteinen in ihrem nativen Zustand. Daher können auch Protein-Multimere dargestellt werden.

Die dafür nötigen PAA-Gele wurden wie in Kap. 2.2.6.1 beschieben aber ohne SDS hergestellt. Nach Polymerisation der Gele wurden diese in die Laufkammer eingesetzt. Die äußere Anodenkammer wurde mit nativem Elektrophoresepuffer befüllt. Der Elektrophoresepuffer für die innere Kathodenkammer enthielt zusätzlich 0,2 % Natrium-Deoxycholat. Während der Elektrophorese mussten die Gele gekühlt werden. Zum Vorlaufen der Gele wurden für 30 min 45 mA pro Gel angelegt. Die Proben

wurden 1:2 mit 2 x nativem Probenpuffer (ohne SDS und ß-Mercaptoethanol) versetzt, NICHT aufgekocht und aufgetragen. Pro Gel wurde eine Stromstärke von 25 mA angelegt. Die Elektrophorese wurde gestoppt, nachdem die Frontmarkerbande (Bromphenolblau) aus dem Gel herausgelaufen war.

2.2.6.3 Immunoblot

Nach der Auftrennung der Proteine durch die PAA-Gelelektrophorese wurden sie mit Hilfe des Semidry-Blotverfahrens (BioRad-Kammern) auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die Membran und die Whatman-Papiere wurden in Semidry-Blotting Puffer äquilibriert. Danach wurde die Apparatur wie folgt aufgebaut: Anode, 3 x 3 mm Whatman-Papier, Nitrozellulose-Membran, Gel, 3 x 3 mm Whatman-Papier, Kathode. Die Proteine wurden für 55 min (dünne Gele) oder 72 min (dicke Gele) bei 75 mA pro Gel auf die Membran transferiert. Anschließend wurden die Proteine auf der Membran zur Kontolle mit Ponceau-Rot gefärbt und eingescannt. Für den Nachweis von Phospho-PKR und Phospho-eIF2α wurde auf die Ponceau-Färbung verzichtet. Die Membranen wurden 1 Stunde in 3 % Magermilchpulver in 1x TBST blockiert, wodurch auch das Ponceau wieder entfernt wurde. Nach dreimaligem Waschen mit 1x TBST wurde die Membran mit dem primären Antikörper in 0,5% Magermilchpulver in 1x TBST für 1 Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C unter ständigem Schwenken inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde anschließend durch dreimaliges Waschen mit 1xTBST für je 10 min entfernt. Die Membran wurde daraufhin für 1 Stunde bei RT mit dem sekundären Spezies-spezifischen Meerrettichperoxidase-gekoppelten Antikörper in 0,5% Magermilchpulver in 1x TBST inkubiert. Die Verdünnungen der jeweiligen Antikörper sind in Kap. 2.1.11 und 2.1.12 angegeben. Überschüssiger Sekundär-Antikörper wurde durch sechsmaliges Waschen für je 5 min entfernt. Die Membran wurde mit dem SuperSignal WestDura Extended Duration Substrat 5 min inkubiert. Dabei wird durch die Oxidation des Substrats eine Chemilumineszenz ausgelöst. Diese Chemilumineszenz konnte durch die Schwärzung eines Röntgenfilms (Autoradiographie) nachgewiesen werden.

2.2.6.4 Fixieren und Trocknen von SDS-PAA-Gelen

Sollten die Proteine nicht über Immunoblotting detektiert werden, sondern direkt durch Autoradiographie, z.B. nach radioaktiver Markierung, mussten die Gele zuerst fixiert und getrocknet werden. Dafür wurde das Gel für 30 min in Fixierlösung geschwenkt um

das SDS zu entfernen. Im Anschluss wurde das Gel 5 min in H_2O gespült, auf zwei Lagen Whatman-Papier gelegt, mit Haushaltsfolie abgedeckt und auf dem Geltrockner Phero-Temp 40 nach Anlegen eines Vakuums bei 75°C für mindestens 45 min getrocknet.

2.2.6.5 Herstellung von Zelllysaten

Um Proteine über Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP), PAA-Gelelektrophorese und Immunoblot analysieren zu können, mussten zunächst Lysate hergestellt werden. Alle Arbeiten dazu wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt und nur eiskalte Puffer verwendet. Zunächst wurden die Zellen 2 x gründlich mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 15 min mit dem entsprechenden Lysispuffer unter mehrmaligem Schwenken inkubiert. Die Zellen wurden mit dem Zellschaber abgekratzt und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, mehrmals invertiert und nochmals 15 min inkubiert. Nach Zentrifugation bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und gleich weiter verarbeitet oder in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei –80°C gelagert.

2.2.6.6 Metabolische Markierung von Zellen mit [^{35}S]Methionin

Über metabolische Markierung mit [^{35}S]Methionin wurde die Synthese von viralen Proteinen im Verlauf einer Infektion von MDCKII Zellen analysiert. Dazu wurden zunächst 5 x 10^5 MDCKII Zellen mit den verschiedenen Influenza B Viren mit einer MOI von 10 oder zum Schein infiziert und bei 33°C inkubiert. Nach 3, 5 oder 7 Stunden wurde das Infektionsmedium gegen 500 µl Mangelmedium (1x Minimum essential Medium with earle's salts ohne L-Methionin, L-Cystein, L-Glutamin) ausgetauscht, das mit 2,5 µl (25 µCi) L-[^{35}S]Methionin und 2 mML-Glutamin supplementiert war. Die Zellen wurden dann für 1 Stunde bei 33°C weiter inkubiert. In dieser Zeit wurde das radioaktive Methionin in die neusynthetisierten Proteine eingebaut. Anschließend wurden die Zellen 3 x mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 2 x 250 µl PBS in Reaktionsgefäße überführt. Nach der Zentrifugation für 4 min bei 4°C und 2.000 rpm in der Tischzentrifuge wurde das Pellet in 100 µl RIPA aufgenommen. Die Lysate wurden bei –20°C eingefroren. Für die Analyse der Lysate wurden 10 µl Lysat 1:2 mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt und über ein dünnes 12,5%iges SDS-PAA-Gel mittels Elektrophorese aufgetrennt (Kap. 2.2.6.1). Die radioaktiv markierten Proteine wurden über Autoradiographie detektiert.

2.2.6.7 Nachweis der IRF-3 Dimerisierung über native PAA-Gelelektrophorese

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-3 induziert seine Homodimerisierung. Diese Dimerisierung sollte in infizierten Zellen über native PAA-Gelelektrophorese analysiert werden. Dazu wurden 1 x 10^6 MDCKII Zellen mit 1,3 µg pCAGGS-IRF-3(HA) transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit den verschiedenen Influenza B Viren mit einer MOI von 1 oder zum Schein infiziert und für 8 Stunden bei 33°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wie in Kap. 2.2.6.5 beschrieben in 350 µl Ko-IP Lysis Puffer lysiert. 7,5 µl des Lysats wurden 1:2 mit 2x nativem Probepuffer versetzt und über ein dünnes 7,5%iges natives PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (Kap. 2.2.6.2). Die Proteine wurden anschließend auf eine Nitrozellulose-Menmbran transferiert. Der Nachweis des HA-markierten IRF-3 erfolgte über den α-HA-Antikörper (Upstate)/α-Kaninchen Sekundär-Antikörper (DAKO) und wurde über Autoradiographie detektiert (Kap. 2.2.6.3).

2.2.6.8 Ko-Immunpräzipitation von IRF-3 und CBP

Über Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP) können Interaktionen zwischen Proteinen, in diesem Fall zwischen IRF-3 und CBP, nachgewiesen werden. Mit einem Antikörper gegen IRF-3 wurde zunächst IRF-3 und darüber auch das gebundene CBP aus einem Zelllysat präzipitiert. Die Immunkomplexe wurden anschließend über SDS-PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Proteine im Immunoblot nachgewiesen.

Zunächst wurden 1 x 107 A549 Zellen mit den verschiedenen Influenza B Viren mit einer MOI von 1 oder zum Schein infiziert und für 10 Stunden bei 33°C inkubiert. Wie in Kap. 2.2.6.5 beschrieben wurden die Zellen in 1 ml Ko-IP Lysis Puffer lysiert. Von den Lysaten wurden je 100 µl für spätere Immunoblot-Anaysen abgenommen. Zu den Lysaten wurde je 1 µg IRF-3 spezifischer Antikörper (α-IRF-3, SL12.1, Maus) pipettiert und über Nacht bei 4°C bei niedrigster Umdrehungszahl rotiert. Nach Zugabe von 50 µl Protein-G -Agarose, die spezifisch den F_c-Teil des Antikörper bindet, wurde für weitere 3 Stunden bei 4°C rotiert. Nicht gebundene Proteine wurden durch dreimaliges waschen mit 500 µl Ko-IP Lysispuffer entfernt. Die Zentrifugation bei dem Waschschritten wurde bei 10.000 rpm für 10 sec durchgeführt. Das Protein-G-Agarose Pellet wurde anschließend in 30 µl 2x SDS Probenpuffer aufgenommen, 5 min bei 95°C aufgekocht und 1 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde komplett auf ein dickes 7,5%iges SDS-PAA-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt

(Kap. 2.2.6.1). Die Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Kap. 2.2.6.3) und mit Antikörpern gegen IRF-3 (Gemisch aus α-IRF-3 von Zymed und Santa Cruz) und CBP sowie dem Kaninchen-spezifischen Sekundär-Anikörper (DAKO) detektiert. Die Visualisierung erfolgte über Autoradiographie.

2.2.6.9 Aktivierung von PKR

Die Aktivierung von PKR in Influenza B Virus infizierten Zellen wurde über Immunoblotanalyse von Zelllysaten untersucht. Dafür wurden die in Kap. 2.2.6.8 vor der Immunpräzipitation abgenommenen Aliquots verwendet. Die Lysate wurden über denaturierende SDS-PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt und geblottet. Für den Nachweis von Phospho-PKR und Phospho-eIF2α wurde auf die Ponceau-Färbung verzichtet. PKR, Phospho-PKR, eIF2α, Phospho-eIF2α, virales NP und virales B/NS1 wurden über die dafür spezifischen Antikörper detektiert. Als Sekundär-Antikörper wurde für Phospho-PKR, eIF2α und Phospho-eIF2α der HRP-gekoppelte α-Kaninchen Antikörper von Cell Signaling benutzt. Für PKR, virales NP und virales B/NS1 wurden die entsprechenden Sekundär-Antikörper von DAKO verwendet.

2.2.6.10 TBK-1 Kinase Assay

Um die Aktivität der Kinase TBK-1 in Virus-infizierten Zellen untersuchen zu können, wurden Kinase Assays durchgeführt. Dafür wurden von uns 2,5 x 10^6 MDCKII mit WT Influenza A/PR/8 Virus und dem isogenen A/delNS1 Virus für 4 und 8 Stunden, mit WT Influenza B Virus und B/ΔNS1 Virus für 4, 8 und 12 Stunden mit einer MOI von 1 infiziert. Die Zellen wurden anschließend in je 350µl Triton-Lysis-Puffer lysiert (Kap. 2.2.6.5). Die Lysate wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C aufbewahrt. Die Lysate wurden von S. Ludwig (Universität Düsseldorf) in TBK-1 Kinase Assays analysiert. Die Prozedur orientiert sich an der für IKK beschriebenen Methode (Ludwig et al., 2002).

3. Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Typ I Interferon (IFN) antagonistischen Eigenschaften des Influenza B Virus Nichtstrukturproteins 1 (B/NS1) unter besonderer Berücksichtigung der funktionellen Bedeutung der dsRNA-Bindungskapazität des B/NS1 Proteins.

Um die Antagonisierung der antiviralen IFN-Antwort durch Influenza B Viren genauer analysieren zu können, wurde zunächst ein Plasmid-gestütztes, revers-genetisches System für die Erzeugung rekombinanter Influenza B Viren etabliert (Kap. 3.1). Dies erlaubte die Herstellung eines rekombinanten Influenza B WT Virus (B/Lee) und der Virusmutante (B/ΔNS1), welcher der Leserahmen des B/NS1 Proteins fehlt (Kap. 3.2.1). Der Vergleich beider Viren ermöglichte es, die Bedeutung des B/NS1 Proteins für die virale Replikation und die Inhibition der transkriptionellen Aktivierung des IFN-ß Gens zu untersuchen (Kap. 3.2.2 bis 3.2.6). In einem weiteren Schritt wurde die Bedeutung der dsRNA-Sequestrierung für die Funktionalität des B/NS1 Proteins untersucht. Dazu wurden rekombinante Viren generiert, die aufgrund von Mutationen in der RNA-Bindungsdomäne des B/NS1 Proteins nicht mehr oder nur eingeschränkt in der Lage sind, dsRNA zu binden (Kap. 3.3.1), sowie eine Virusmutante, welche nur die RNA-Bindungsdomäne des B/NS1 Proteins exprimiert (Kap. 3.3.6). Die Charakterisierung dieser Virusmutanten gab darüber Aufschluss, welchen Einfluss die dsRNA-Bindungskapazität des B/NS1 Proteins bzw. der C-terminale Teil des B/NS1 Proteins auf die virale Replikation, die Inhibition der IFN-ß Induktion und die Inhibition von PKR hat (Kap. 3.3.2 bis 3.3.5 und Kap. 3.3.7 bis 3.3.9).

3.1 Etablierung eines revers-genetischen Systems zur Erzeugung und Analyse rekombinanter Influenza B Viren

Da zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit kein System verfügbar war, mit dem rekombinante Influenza B Viren ausgehend von Plasmid-DNA *de novo* generiert werden konnten, musste zunächst ein solches revers-genetisches System konstruiert werden. Dieses basiert auf einem für Influenza A Viren entwickelten 8-Plasmidsystem (Hoffmann et al., 2000). Die genetische Information der acht vRNA Segmente des Influenza B/Lee/40 Virus wurde dazu in den Vektor pHW2000 subkloniert. Dort wird

die virale cDNA sowohl von einem humanen RNA-Polymerase I Promotor und einem murinen Terminator, als auch von einem RNA-Polymerase II Promotor und einem Polyadenylierungssignal flankiert. Dies erlaubt nach Transfektion der acht Plasmide in humane Zellen die Transkription von viraler vRNA und mRNA (Abb. 3.1). Nach Translation der viralen Proteine assemblieren diese mit den vRNA Segmenten und neue Viren werden aus der Zelle freigesetzt (siehe auch Kap 1.4).

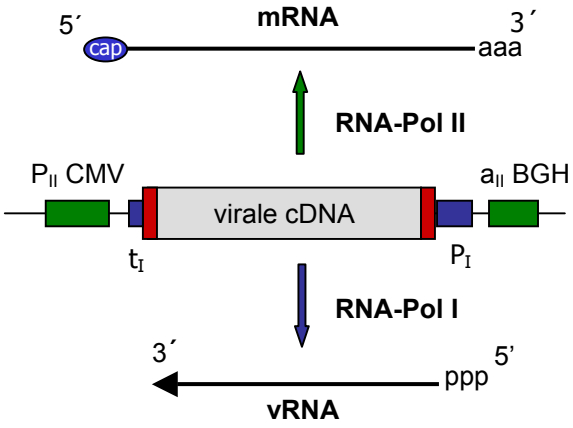


Abb. 3.1: Organisation der Promotoren im Vektor pHW2000 des 8-Plasmidsystems. RNA-Pol I: RNA-Polymerase I; RNA-Pol II: RNA-Polymerase II; P_I: humaner RNA-Pol I-Promotor; t_I: muriner Terminator; P_{II}CMV: Cytomegalievirus RNA-Pol II-Promotor; a_{II} BGH: Polyadenylierungssignal des bovinen Wachstumshormon („bovine growth hormone“) Gens;

3.1.1 Subklonierung der Segmente des Influenza B/Lee/40 Virus

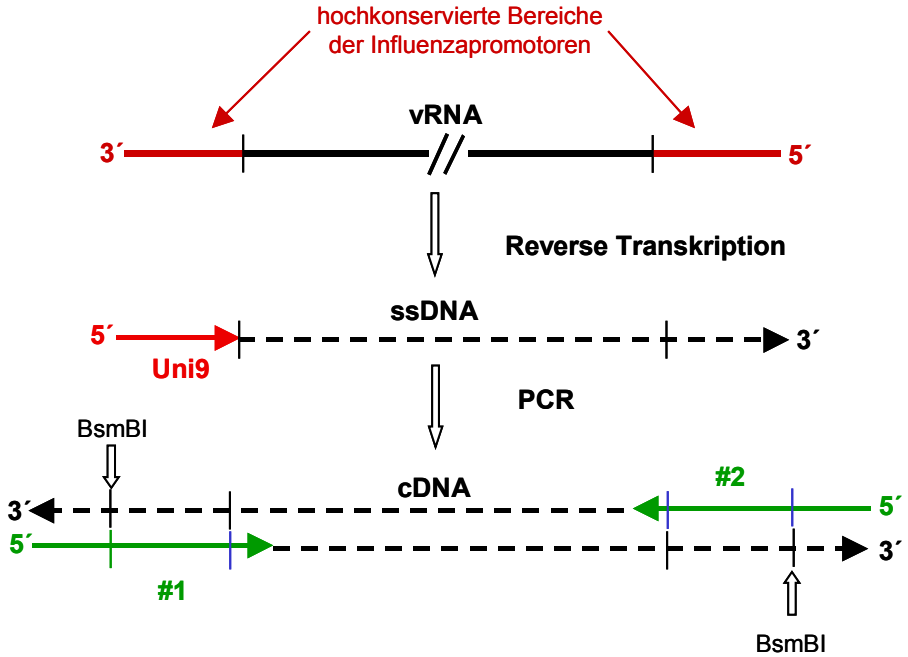


Abb. 3.2: Schema der RT-PCR Amplifikation der acht viralen RNA Segmente für die Subklonierung in den Vektor pHW2000. Die virale RNA wird mittels reverser Transkription mit dem universellen Primers Uni9 (rot) in ssDNA umgeschrieben. Die segmentspezifischen Primerpaare (grün) erlauben die selektive PCR-Amplifikation der einzelnen Segmente und fügen Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *Bsm*BI, *Bsp*M1 oder *Aar*I an.

Als Ausgangsvirus für die Konstruktion des Plasmidsystems diente das Influenza B/Lee/40 Virus. Für die Subklonierung der acht viralen Gensegmente in den Vektor pHW2000 mussten zunächst die vRNA Segmente in cDNA Fragmente umgeschrieben werden (Abb. 3.2).

A

	5‘ - cDNA (komplementär zur vRNA) -3‘
PB1	AGCAGAAGCGGAGCCT...ATG.......AGGCTCGTGTTTCTACT
PB2	AGCAGAAGCGGAGCGT...ATG.......ATGCTCGTGTTTCTACT
PA	AGCAGAAGCGGTGCGT...ATG.......ATGCACGTGTTTCTACT
HA	AGCAGAAGCAGAGCAT...ATG.......ATGCTCTTGTTACTACT
NP	AGCAGAAGCACAGCAT...ATG.......ATGCTCTTGTTACTACT
NA	AGCAGAAGCAGAGCAT...ATG.......ATGCTGTTGTTTCTACT
M	AGCAGAAGCACGCACT...ATG.......AGTGCGTTGTTTCTACT
NS	AGCAGAAGCAGAGGAT...ATG.......ATCCTCTTGTTACTACT

B

UNI9 5‘AGCAGAAGCG/A 3‘

C

BsmBI-PB1#1 5‘CGATCGTCTCA*GGGA* GCAGAAGCGGAGCC 3‘

BsmBI-PB1#2 5‘CGATCGTCTCT*TATT* AGTAGAAACACGAGCC 3‘

Abb. 3.3: Oligonukleotidsequenzen zur Amplifikation der viralen Gensegmente. (**A**) Vergleich der 5’- und 3’-terminalen Sequenzen der viralen Gensegmente auf cDNA Ebene. Publizierte Sequenzen der nichtkodierenden Bereiche des Influenza B/Lee/40 Virus wurden miteinander verglichen und für jedes Segment eine Konsensussequenz ermittelt (Desselberger et al., 1980, Stoeckle et al., 1987, Yamashita et al., 1988). Die 10 Nukleotide am 5’- bzw. 3’-Terminus sind innerhalb der Segmente konserviert (rot) mit Ausnahme des Nukleotids 10 (5’-Terminus) bzw. 6 (3’-Terminus) (orange). Die nachfolgenden Sequenzen (schwarz) sind spezifisch für das jeweilige Gensegment. (**B**) Das Oligonukleotid UNI9 für die reverse Transkription ist komplementär zu den ersten 10 Nukleotiden des 3’-Terminus aller viralen RNAs. Nukleotid 10 ist entweder G oder A (wobble, orange). (**C**) Nukleotidsequenz der PCR-Primer am Beispiel des Primerpaars für die Amplifikation des PB1-Segments. Die Primersequenz umfasst die 10 terminalen Nukleotide (rot/orange) und 5 bzw. 6 Nukleotide der darauffolgenden segmentspezifischen Sequenz sowie die Erkennungssequenz für das Auslegerenzym (unterstrichen), welches zwischen den durch Leerzeichen getrennten Nukleotiden scheidet. Weitere Primersequenzen siehe Kap. 2.1.7.

Dazu wurde aus der Virusstammlösung die virale RNA isoliert und zusammen mit dem Primer UNI9 in einer RT-Reaktion in ssDNA-Fragmente umgeschrieben. Der Primer UNI9 ist komplementär zu den ersten 10 Nukleotiden des 3’-Endes der viralen RNAs (Abb. 3.3 B). Da diese Sequenz sowohl zwischen verschiedenen Influenza B Virusstämmen als auch zwischen den Segmenten hochkonserviert ist (Abb. 3.3 A), werden in der RT-Reaktion alle acht vRNA Segmente erfasst. Mittels PCR wurden dann

die einzelsträngigen (ss) DNA-Fragmente zu doppelsträngiger (ds)DNA komplettiert und amplifiziert. Die dabei benutzten Primerpaare überspannen die hochkonservierten Bereiche am 5'- und 3'-Ende der viralen Gensegmente sowie einen kurzen Abschnitt der sich anschließenden segmentspezifischen Sequenz (Abb. 3.3 C). Dies ermöglicht die selektive Amplifikation jedes einzelnen der acht Segmente. Weiterhin wurden über die Primerpaare Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen *Bsm*BI, *Bsp*MI oder *Aar*I an die viralen Gensegmente angefügt.

Da bei der PCR nicht nur die erwarteten Produkte sondern auch cDNAs anderer Größe entstanden, wurden die Fragmente mit der korrekten Größe isoliert (Abb. 3.4).

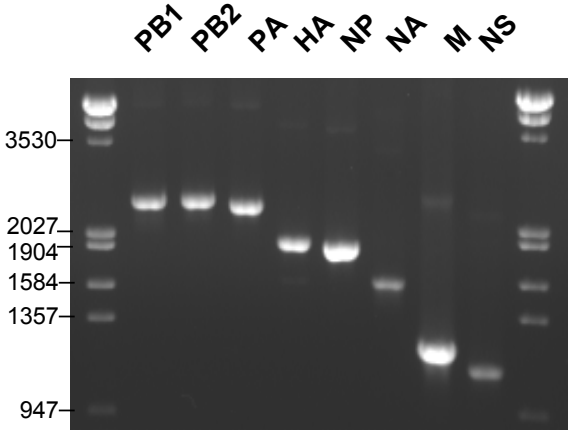


Abb. 3.4: Analytisches Agarosegel der RT-PCR Fragmente der acht viralen Gensegmente des Influenza B/Lee/40 Virus. Die virale RNA wurde revers transkribiert und mit segmentspezifischen Primern amplifiziert. Fragmente der korrekten Länge wurden mittels eines präparativen Agarosegels isoliert und mit einem analytischen Agarosegel überprüft. Die Länge der Markerbanden (bp) ist am linken Rand angezeigt.

Die PCR-Fragmente wurden nach Verdau mit den Typ I Restriktionsendonukleasen *Bsm*BI (PB1, PB2, PA, NA, M, NS), *Bsp*MI (NP) oder *Aar*I (HA) in den mit *Bsm*BI verdauten Vektor pHW2000 ligiert. Nach Transformation wurden positive Klone mittels Restriktionsverdau identifiziert und sequenziert. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit den Sequenzen der Gensegmente aus der Datenbank verglichen. Von den Klonen wurden folgende Plasmidpräparationen hergestellt: pHW-Lee-PB1, pHW-Lee-PB2, pHW-Lee-PA, pHW-Lee-NP, pHW-Lee-HA, pHW-Lee-NA, pHW-Lee-M und pHW-Lee-NS. Um später die rekombinanten Viren von den Ausgangsviren einfach unterscheiden zu können, wurde durch zielgerichtete Mutagenese des Plasmids pHW-Lee-NS mittels des QuikChange Mutagenesis Kits eine *Xho*I Schnittstelle an der Nukleotidposition 262 bis 267 des NS Segments eingeführt.

3.1.2 Erzeugung rekombinanter Influenza B/Lee Viren

Zur Erzeugung von rekombinanten Influenza B/Lee Viren wurden gleiche Mengen der Plasmide pHW-Lee-PB1, pHW-Lee-PB2, pHW-Lee-PA, pHW-Lee-NP, pHW-Lee-HA, pHW-Lee-NA, pHW-Lee-M und pHW-Lee-NS-XhoI in 293T-Zellen transfiziert. Die nach 72h in den Überstand freigesetzten Viren wurden in 11 Tage alten embryonierten Hühnereiern passagiert. Die Bestimmung der Virustiter in der Allantoisflüssigkeit mittels Hämagglutinationstest (HA-Test) zeigte, dass die rekombinanten Viren vergleichbare Titer erreichten wie die natürlichen B/Lee/40 Viren (Abb. 3.5).

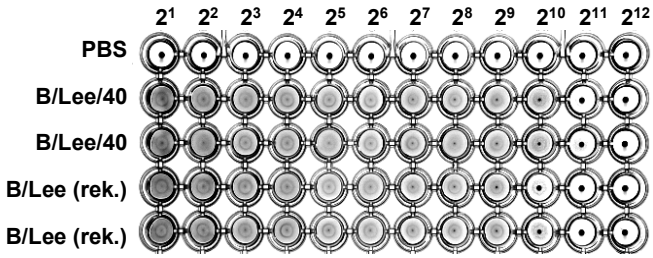


Abb. 3.5: Rekombinante Influenza B/Lee Viren replizieren zu vergleichbaren Titern wie natürliche Influenza B/Lee/40 Viren. HA-Test von B/Lee/40 (Reihe 2 und 3) und rekombinantem B/Lee Virus (Reihe 4 und 5). PBS (Reihe 1) diente als Negativkontrolle.

Als nächstes sollte sichergestellt werden, dass es sich bei den passagierten Viren um rekombinante Viren handelt und nicht um eine Kontamination durch das Ausgangsvirus. Dazu wurde virale RNA aus der Virusstammlösung von rekombinantem B/Lee Virus und dem Ausgangsvirus B/Lee/40 isoliert. In einer RT-PCR mit den Primern BsmBI-NS#1 und BsmBI-NS#2 wurde das NS Segment amplifiziert. Da das NS Segment des rekombinanten B/Lee Virus eine neu eingeführte *Xho*I-Schnittstelle enthält, konnte durch einen Restriktionsverdau mit *Xho*I eindeutig der rekombinante Charakter des B/Lee Virus bestätigt werden (Abb. 3.6).

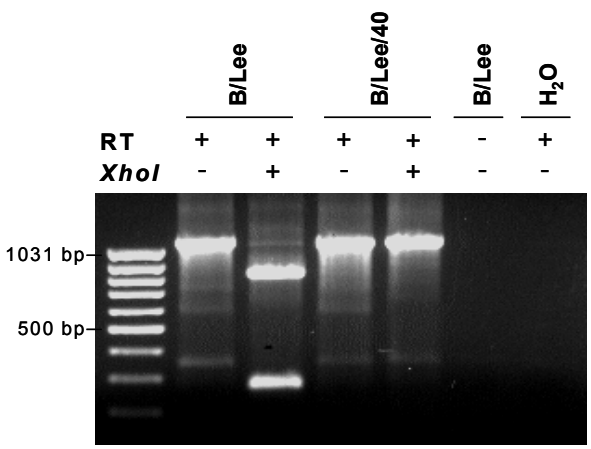


Abb. 3.6: RT-PCR Analyse der viralen NS Segmente. RNA wurde aus Viruspräparationen des rekombinanten B/Lee Virus oder des orginalen B/Lee/40 Virus isoliert und revers transkribiert (RT „+“). Das NS Segment wurde mittels PCR amplifiziert und mit dem Restriktionsenzym *Xho*I verdaut (*Xho*I „+“). Die Auftrennung der Fragmente über ein 2%iges Agarosegel zeigt die Existenz der *Xho*I Schnittstelle im rekombinanten B/Lee Virus. Als Kontrolle wurde der RT-Schritt unterlassen (RT „-“) oder keine RNA eingesetzt („H_2O“). Die 1031bp und 500bp Markerbanden sind am linken Rand angezeigt.

3.2 Identifikation des NS1 Proteins als Typ I IFN-Antagonist

3.2.1 Erzeugung eines NS1-defizienten Influenza B Virus (B/ΔNS1 Virus)

Um untersuchen zu können, welchen Einfluss das B/NS1 Protein auf die Antagonisierung der Interferonantwort hat, wurde ein Influenza B Virus generiert werden, das kein NS1 Protein mehr exprimieren kann. Die kodierenden Regionen des NS1 Proteins liegen auf dem NS Segment und überlappen teilweise mit dem Leserahmen des NS2/NEP Proteins, welches von gespleißter mRNA exprimiert wird. Zur Herstellung des B/NS1-defizienten Virus (B/ΔNS1) wurde ein Plasmid (pHW-Lee-NS-delNS1B) konstruiert, dem der NS1-spezifische kodierende Bereich fehlt, wobei der Leserahmen für das NS2/NEP Protein und die terminalen nichtkodierenden Sequenzen erhalten bleiben. (Abb. 3.7).

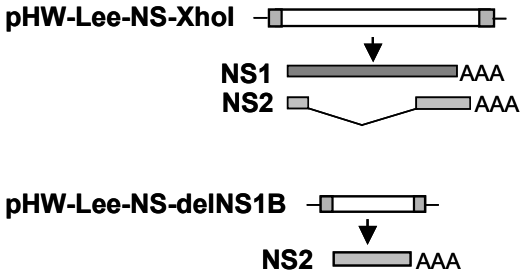


Abb. 3.7: Struktur der NS Segmente von WT B/Lee Virus und B/ΔNS1 Virus. Das Plasmid pHW-Lee-NS-XhoI kodiert für das WT NS Segment, von dem das NS1 Protein und, von einer gespleißten mRNA, das NS2/NEP Protein exprimiert wird. Im Plasmid pHW-Lee-NS-delNS1-B ist der Leserahmen des NS1 Proteins deletiert, so dass nur noch NS2 mRNA transkribiert wird.

Dazu wurde polyadenylierte RNA aus B/Lee-Virus infizierten Zellen isoliert. Die mRNA des NS2/NEP Proteins wurde revers transkribiert und amplifiziert sowie die hinter dem Stop-Kodon liegenden nichtkodierenden Bereiche des NS-Segments und die Erkennungssequenzen für das Restriktionsenzym *Bsm*BI angefügt. Das NS-delNS1-B cDNA Fragment wurde dann in den Vektor pHW2000 subkloniert. Nach Transfektion des Plasmids pHW-Lee-NS-delNS1-B sowie der übrigen sieben Plasmide in 293T Zellen und Passage der neugebildeten Viren in 6 Tage alten Bruteiern, konnte das B/ΔNS1 Virus über RT-PCR nachgewiesen werden. Der Verlust des B/NS1 Leserahmens reduzierte die Größe des NS Segments von 1096 auf 441 Nukleotide (Abb. 3.8). Durch Passage in älteren Bruteiern oder MDCKII Zellen konnte kein Virus amplifiziert werden. Die Sequenzierung des NS Segments der Virusmutante zeigt einen Austausch des Triplets von Tyrosin 71 von TAT zu CAT. Diese Veränderung wurde jedoch nicht weiter untersucht.

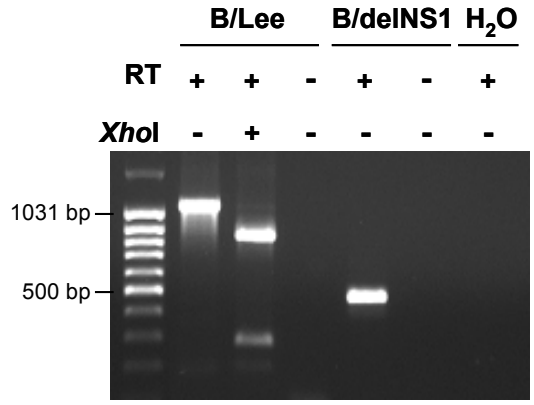


Abb. 3.8: RT-PCR Analyse der NS Segmente von Influenza B/Lee und B/ΔNS1 Viren. vRNA des B/Lee Virus und B/ΔNS1 Virus wurde isoliert und revers transkribiert (RT „+"). Die cDNA des Segments wurde mittels PCR amplifiziert und mit dem Restriktionsenzym *Xho*I verdaut (*Xho*I „+"). Die Auftrennung der Fragmente über ein 2%iges Agarosegel zeigt die Reduktion des NS Segments des B/ΔNS1 Virus auf 441 nt. Als Kontrolle wurde der RT-Schritt unterlassen (RT „-") oder keine RNA eingesetzt („H_2O"). Die 1031bp und 500bp Markerbanden sind am linken Rand angezeigt.

Um zu überprüfen, ob nach Infektion mit dem B/ΔNS1 Virus das NS1 Protein exprimiert wird, wurden infizierte MDCKII Zellen 3, 5 und 7h p. i. für jeweils eine Stunde mit [^{35}S]-Methionin metabolisch markiert (Abb. 3.9 A). Die elektrophoretische Auftrennung der Zelllysate und anschließende Autoradiographie zeigten, dass die

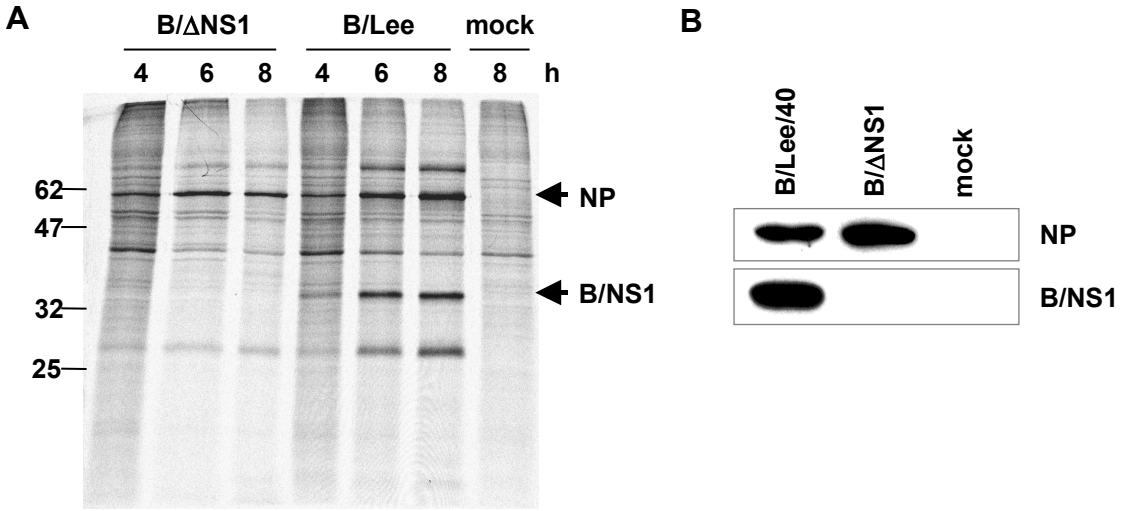


Abb. 3.9: In B/ΔNS1 Virus infizierten Zellen wird kein B/NS1 Protein exprimiert. (**A**) MDCKII Zellen wurden zum Schein behandelt (mock) oder mit WT B/Lee oder B/ΔNS1 Virus mit einer MOI von 10 infiziert. 3, 5 oder 7h p. i. wurden die Zellen für 1h mit [^{35}S]-Methionin inkubiert. Zellextrakte wurden 4, 6 und 8h p. i. hergestellt, über ein 12,5%iges PAA-Gel aufgetrennt und mittels Autoradiographie analysiert. Die Laufhöhe der Molekulargewichtsmarkerbanden (kDa) und die Position der viralen Proteine NP und B/NS1 sind am linken bzw. rechten Rand angezeigt. (**B**) MDCKII Zellen wurden Kontroll-behandelt oder mit B/Lee/40 oder B/ΔNS1 Virus mit einer MOI von 1 infiziert. 8h p. i. wurden Lysate hergestellt und mittels Immunoblot mit NP- und B/NS1-spezifischen Antikörpern analysiert.

Kinetik der Proteinexpression des B/ΔNS1 Virus mit der des WT B/Lee Virus vergleichbar ist. Wie erwartet, fehlte in den mit B/ΔNS1 Virus infizierten Zellen ein Protein mit B/NS1 spezifischer Größe. Dies bestätigte sich auch in Immunoblotanalysen von Lysaten aus B/Lee und B/ΔNS1 Virus infizierten MDCKII Zellen (Abb. 3.9 B). Obwohl in beiden Zelllysaten vergleichbare Mengen virales Nukleoprotein (NP) nachgewiesen wurde, konnte in den B/ΔNS1 Virus infizierten Zellen kein B/NS1 Protein detektiert werden.

3.2.2 Die Replikation des B/ΔNS1 Virus ist attenuiert

Zunächst wurde untersucht, welchen Einfluss der Verlust des B/NS1 Proteins auf die Replikationsfähigkeit des Influenza B Virus hat. Dazu wurde die Replikation von WT Virus und Deletionsmutante in 6, 8 und 11 Tage alten embryonierten Hühnereiern sowie MDCKII- und Vero Zellen verglichen. Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass die Induzierbarkeit von Typ I Interferon (IFN) im Brutei mit dem Entwicklungsgrad des Hühnerembryos zunimmt (Isaacs & Baron, 1960, Morahan & Grossberg, 1970, Sekellick & Marcus, 1985). Dieser Reifungsprozess des IFN-Systems korreliert mit der verstärkten Restriktion der Replikation von IFN-sensitiven Viren (Morahan & Grossberg, 1970, Talon et al., 2000b). Aus diesem Grund sollte der Vergleich der Replikation von WT B/Lee Virus und B/ΔNS1 Virus in 6, 8 und 11 Tage alten embryonierten Hühnereiern Aufschluss über eine mögliche IFN-antagonisierende Funktion des B/NS1 Proteins geben. Das natürliche B/Lee/40 Virus und das rekombinante B/Lee Virus replizierten zu hohen Titern um 1 x 10^8 ffu/ml unabhängig vom Alter der Bruteier (Abb. 3.10). Das B/ΔNS1 Virus zeigte dagegen eine verminderte

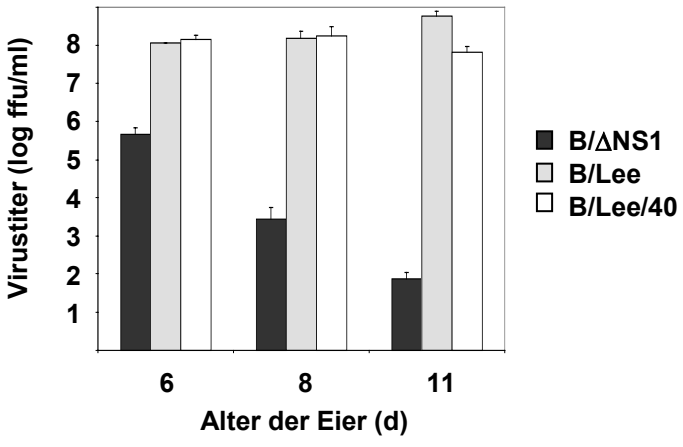


Abb. 3.10: Replikation in embryonierten Hühnereiern. 6, 8 und 11 Tage alte embryonierte Hühnereier wurden mit 100 infektiösen Einheiten natürlichem B/Lee/40, rekombinantem B/Lee oder B/ΔNS1 Virus inokuliert und für 72h bei 33°C inkubiert. Virustiter wurden bestimmt, wie in Kap. 2.2.2.2 beschrieben. Dargestellt sind Durchschnittswerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder.

Replikation mit ca. 5 x 10^5 ffu/ml in 6 Tage alten Bruteiern, während sich die Virustiter auf 3 x 10^3 bzw. unter 1 x 10^2 ffu/ml in 8 bzw. 11 Tage alten Bruteiern verringerten (Abb. 3.10). Dies bestätigte die Vermutung, dass der Verlust des B/NS1 Proteins die IFN-Sensitivität des Virus erhöht und das B/NS1 Protein IFN-antagonistische Aktivität besitzt.

Als nächstes wurde die multizyklische Replikation von WT Virus und Deletionsmutante in MDCKII- und Vero Zellen analysiert. MDCKII Zellen verfügen über ein funktionales Typ I IFN System. Vero Zellen können jedoch aufgrund von chromosomalen Deletionen der IFN-ß und IFN-α Gene kein Typ I IFN mehr exprimieren (Diaz et al., 1988). Rekombinantes B/Lee Virus replizierte in MDCKII Zellen zu hohen Titern um 1 x 10^8 ffu/ml, während die Endtiter des B/ΔNS1 Virus um ca. 6 (MOI 0,1) bis 7 (MOI 0,01) Log-Einheiten geringer waren (Tab. 3.1 links). Auch in Vero Zellen erreichte das WT Virus hohe Titer um 1 x 10^6 ffu/ml. Die Replikation des B/ΔNS1 Virus war jedoch trotz fehlender IFN Expression in den Vero Zellen stark eingeschränkt, d.h. die Endtiter lagen um mindestens 3 Log-Einheiten niedriger als die des WT Virus (Tab. 3.1 rechts). Dies war erstaunlich, da beschrieben ist, dass Viren mit inaktiven IFN-antagonistischen Proteinen in Vero Zellen zu höheren Titern replizieren als in IFN-kompetenten Zelllinien (Garcia-Sastre et al., 1998). In parallelen Infektion wurde verifiziert, dass in den benutzen Vero Zellen das korrespondierende Influenza A/delNS1 Virus zu Titern bis 5 x 10^6 ffu/ml replizierte (nicht gezeigt) und somit nur um eine Log-Stufe im Vergleich zum WT Virus attenuiert war.

Tab. 3.1: Die Replikation des B/ΔNS1 Virus in MDCKII Zellen und Vero Zellen ist attenuiert. Konfluente Zellkulturschalen wurden mit den angegebenen MOIs infiziert und für 3 Tage bei 33°C inkubiert. Die Virustiter wurden bestimmt, wie in Kap. 2.2.2.2 beschrieben.

Zelltyp	Virustiter (ffu/ml)		Zelltyp	Virustiter (ffu/ml)	
MOI	B/Lee	B/ΔNS1	MOI	B/Lee	B/ΔNS1
MDCKII			Vero		
0,1	3,1 x 10^8	3,2 x 10^2	0,1	5,9 x 10^6	2,5 x 10^2
0,1	3,1 x 10^8	1,7 x 10^2	0,1	6,6 x 10^6	1,7 x 10^2
0,1	1,4 x 10^7	6,8 x 10^1	0,1	1,2 x 10^5	2,2 x 10^2
0,1	3,1 x 10^7	6,8 x 10^1	0,1	2,0 x 10^5	1,7 x 10^2
0,01	2,7 x 10^8	<1,7 x 10^1	0,01	3,5 x 10^6	<1,7 x 10^1
0,01	3,3 x 10^8	<1,7 x 10^1	0,01	4,4 x 10^6	<1,7 x 10^1

3.2.3 Das B/NS1 Protein verhindert die Virus-vermittelte Aktivierung des IFN-ß Promotors

Die inverse Korrelation der Replikationsfähigkeit des B/ΔNS1 Virus mit der Reifung des IFN-Systems in Bruteiern gab bereits einen Hinweis auf die mögliche Funktion des B/NS1 Proteins als IFN-Antagonist. In weiteren Experimenten wurde daher analysiert, ob der Verlust des B/NS1 Proteins zu einer höheren IFN-Induktion in Virus-infizierten Zellen führt. Zunächst wurde untersucht, in welchem Maße Infektionen mit verschiedenen Influenza B Virus Stämmen bzw. der Deletionsmutante B/ΔNS1 den IFN-ß Promotor aktivieren. Dazu wurden MDCK-C3 Zellen, welche mit einem

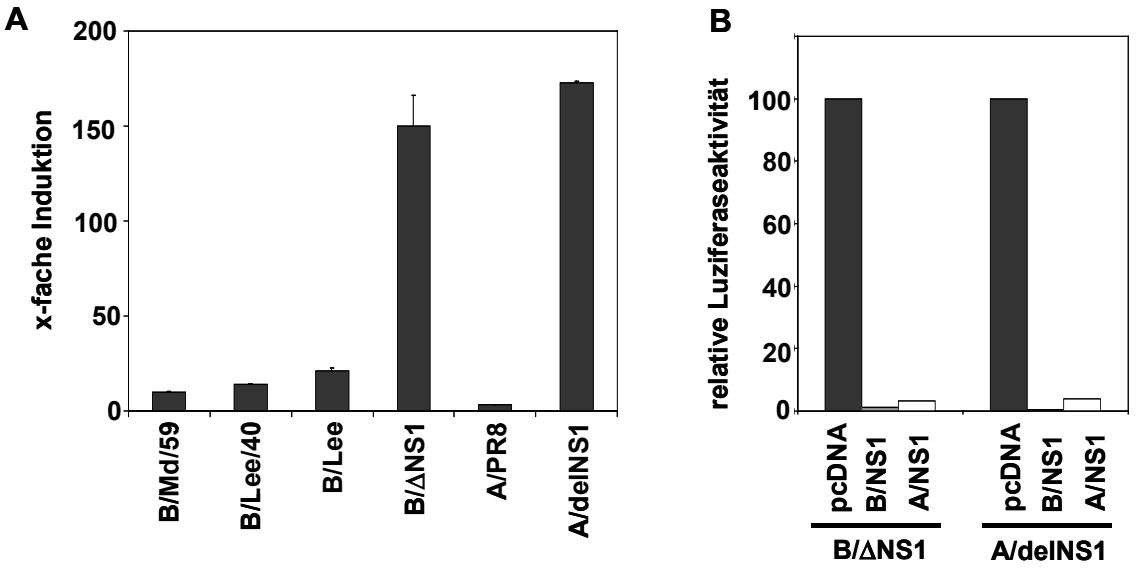


Abb. 3.11: Das B/NS1 Protein verhindert die Virus-vermittelte Aktivierung des IFN-ß Promotors. (**A**) MDCKII-C3 Zellen, welche mit dem IFN-ß Promotor Luziferase Reporterplasmid p125-Luc-neoR stabil transfiziert wurden, wurden mit den Influenza B Virus Stämmen Md/59, Lee/40, dem rekombinanten WT B/Lee Virus und der Deletionsmutante B/ΔNS1 sowie den Influenza A/PR/8/34 WT Virus und isogenem A/delNS1 Virus mit einer MOI von 1 infiziert. Die Luziferaseaktivität wurde 8h p. i. bestimmt und ist als x-fache Induktion verglichen mit Kontroll-infizierten Zellen dargestellt, nachdem die Zellextrakte auf gleichen Proteingehalt normalisiert worden waren. Das Diagramm zeigt Durchschnittswerte eines typischen Experiments, welches in Doppelansätzen durchgeführt und drei mal wiederholt wurde. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. (**B**) MDCKII Zellen wurden mit dem IFN-ß Promotor Luziferase Reporterplasmid p125-Luc und Expressionsplasmiden für das B/NS1 Protein oder das A/NS1 Protein oder Leervektor (pcDNA) transfiziert. In allen Ansätzen wurde das Plasmid pRL-TK-Luc kotransfiziert. Es kodiert für eine *Renilla* Luziferase, welche unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors steht, und wurde als interne Kontrolle zur Normalisierung der Ergebnisse benutzt. Einen Tag nach Transfektion wurden die Zellen mit B/ΔNS1 Virus oder A/delNS1 Virus mit einer MOI von 1 infiziert oder Kontroll-behandelt. Die Luziferaseaktivität in den Zellextrakten wurde 8h p. i. bestimmt. Der Wert für die Virus-vermittelte Induktion des IFN-ß Promotors in Leervektor transfizierten Zellen wurde auf 100 % gesetzt und mit der Induktion in NS1 Protein exprimierenden Zellen verglichen.

Leuchtkäfer-Luziferase Reportergen unter der Kontrolle des IFN-ß Promotors stabil transfiziert wurden, mit den natürlichen Influenza B Virus Stämmen Maryland/59 und Lee/40 sowie dem rekombinanten B/Lee Virus und dem B/ΔNS1 Virus infiziert (Abb. 3.11 A). Als Vergleich wurden parallele Infektionen mit dem Influenza A/PR/8/34 WT Virus und dem isogenen A/delNS1 Virus durchgeführt. Infektionen mit den WT Influenza B Viren führten nur zu einer geringen Induktion des IFN-ß Promotors, vergleichbar mit der Induktion durch das WT Influenza A Virus. Im Gegensatz dazu führte die Infektion mit dem B/ΔNS1 Virus zu einer 150-fachen Aktivierung des IFN-ß Promotors. Eine ähnlich starke Induktion des Promotors wurde nach Infektion mit dem Influenza A/delNS1 Virus gemessen, welches als potenter IFN-ß Induktor bekannt ist (Ludwig et al., 2002, Talon et al., 2000a, Wang et al., 2000). Als nächstes sollte sichergestellt werden, dass die starke IFN-ß Promotor Aktivierung auf den Verlust des B/NS1 Proteins zurückzuführen ist und nicht durch unbemerkt gebliebene Veränderungen im Virusgenom verursacht wurde. Dazu wurde in MDCKII Zellen neben dem IFN-ß Reportergen das B/NS1 Protein bzw. das A/NS1 Protein koexprimiert und diese Zellen anschließend mit B/ΔNS1 Virus oder A/delNS1 Virus infiziert (Abb. 3.11 B). Die ektopische Expression des B/NS1 Proteins konnte die durch das B/ΔNS1 Virus induzierte Promotoraktivierung nahezu vollständig inhibieren. Eine ähnlich gute Inhibition wurde durch Koexpression des A/NS1 Proteins erreicht. Auch im Falle einer Stimulierung durch das A/delNS1 Virus konnten beide NS1 Proteine die Induktion des IFN-ß Promotors verhindern. Bezüglich der Inhibition der IFN-ß Induktion scheint das B/NS1 Protein eine dem A/NS1 Protein äquivalente Funktion auszuüben.

3.2.4 Das B/ΔNS1 Virus induziert Transkription und Expression von humanem IFN-ß

In den beiden vorigen Experimenten konnte auf Reportergenebene gezeigt werden, dass das B/NS1 Protein die Virus-stimulierte IFN-ß Induktion inhibieren kann. Als nächstes wurde untersucht, ob die Induktion des IFN-ß Promotors auch zur Transkription des endogenen IFN-ß Gens und schließlich zur Sekretion von IFN-ß führt oder ob diese Prozesse möglicherweise unabhängig vom B/NS1 Protein blockiert werden. Dazu wurden humane Lungenepithelzellen (A549 Zellen) mit Influenza B/Lee WT Virus und der Deletionsmutante infiziert. Während die WT Infektion die Transkription von nur sehr geringen IFN-ß mRNA Mengen induzierte, konnte in den B/ΔNS1 Virus infizierten

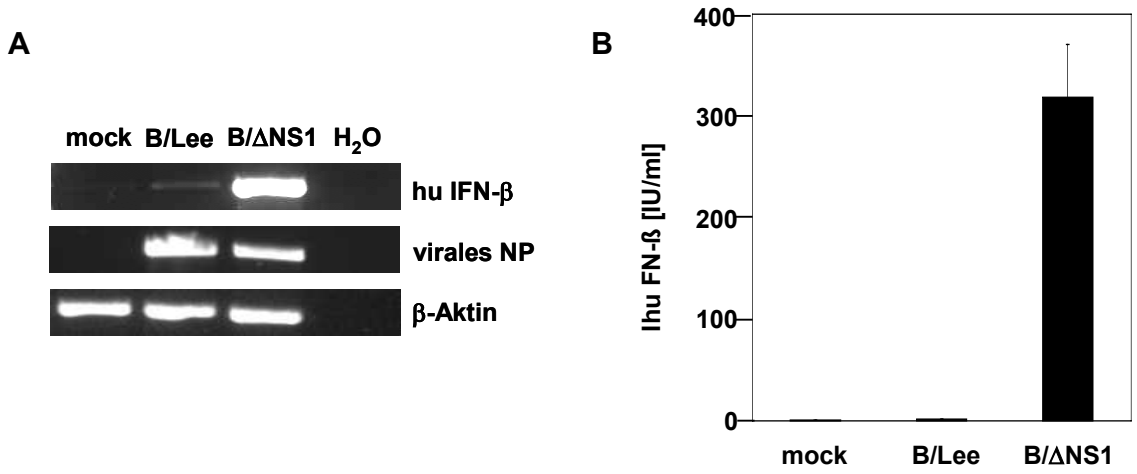


Abb. 3.12: Die Infektion mit B/ΔNS1 Virus induziert die Expression von hu IFN-ß. (**A**) Humane A549 Zellen wurden Kontroll-behandelt oder mit B/Lee oder B/ΔNS1 Virus mit einer MOI von 1 infiziert. Die Gesamt RNA wurde 18h p. i. aus den Zellen extrahiert und gleiche Mengen RNA mittels RT-PCR mit spezifischen Oligonukleotiden für hu IFN-ß mRNA, virales NP Segment und ß-Aktin mRNA analysiert. (**B**) A549 Zellen wurden Kontroll-behandelt oder mit B/Lee oder B/ΔNS1 Virus mit einer MOI von 1 infiziert. Die Zellkulturüberstände wurden 18h p. i. abgenommen und die enthaltenen IFN-ß Mengen mittels ELISA bestimmt.

Zellen hohe Mengen der IFN-ß mRNA mittels RT-PCR detektiert werden (Abb. 3.12 A). Die Bestimmung der IFN-ß Mengen im Überstand der infizierten Zellen mittels ELISA zeigte, dass ausgehend von den mRNAs auch IFN-ß exprimiert und sezerniert wird. Die IFN-ß Menge in den Überständen der B/ΔNS1 Virus infizierten Zellen lag bei über 300 IU/ml, wohingegen nach WT Virus Infektion die IFN-ß Menge nur geringfügig über der Nachweisgrenze lag (Abb. 3.12 B). Diese Ergebnisse bestätigten die Daten der Reportergen-Versuche und zeigten, dass der Verlust des B/NS1 zur Transkription des endogenen IFN-ß Gens in infizierten Zellen und in der Folge zur Sekretion von IFN-ß führt. Somit konnte das B/NS1 Protein als IFN-Antagonist des Influenza B Virus identifiziert werden.

3.2.5 Das B/NS1 Protein inhibiert die Virus-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-3 und seine Assoziation mit dem CREB-bindenden Protein (CBP)

Die vorangegangenen Experimente hatten gezeigt, dass das B/NS1 Protein in der Lage ist, die Virus-vermittelte Induktion des IFN-ß Gens zu inhibieren. Im weiteren sollte deshalb geklärt werden, auf welcher Ebene das B/NS1 Protein die zur Aktivierung des IFN-ß Gens notwendigen Signalkaskaden blockiert. Entscheidend ist dabei die

Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-3, der auch unabhängig von NFκB und ATF-2/c-Jun die Transkription des IFN-ß Gens induzieren kann (Peters et al., 2002). Die Phosphorylierung von IRF-3 führt zur Bildung von IRF-3 Dimeren, zur Translokation in den Nukleus und nach Assoziation mit CBP („CREB binding protein“) zur Bindung an und Aktivierung des IFN-ß Promotors (Abb. 3.13) (Lin et al., 1998, Sato et al., 1998, Yoneyama et al., 1998).

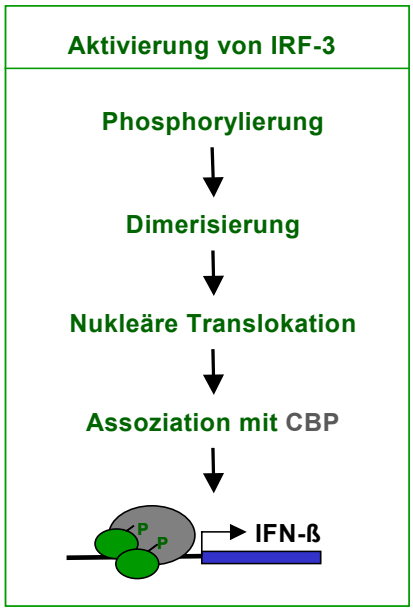


Abb. 3. 13: Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-3

3.2.5.1 IRF-3/CBP Interaktion

In einem Zeitverlauf wurde zunächst die Interaktion von IRF-3 und CBP in WT und B/ΔNS1 Virus infizierten A549 Zellen als Zeichen einer funktionellen IRF-3 Aktivierung durch Koimmunpräzipitation analysiert (Abb. 3.14).

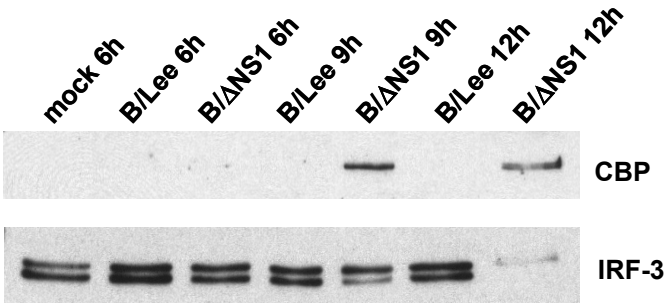


Abb. 3.14: Assoziation von IRF-3 und CBP in B/ΔNS1Virus infizierten Zellen. A549 Zellen wurden Kontroll-behandelt oder mit B/Lee oder B/ΔNS1 Virus mit einer MOI von 1 infiziert. Zelllysate wurden 6, 9 oder 12h p. i. hergestellt und endogenes IRF-3 mit hu IRF-3-spezifischen Antikörpern präzipitiert. Die Präzipitate wurden mittels Immunoblot mit Antikörpern gegen CBP und IRF-3 analysiert.

Nach Präzipitation von endogenem IRF-3 aus Zelllysaten und anschließender Immunoblotanalyse der Präzipitate mit IRF-3- und CBP-spezifischen Antikörpern konnte nur in den Lysaten der B/ΔNS1 Virus infizierten Zellen eine Komplexbildung von CBP und IRF-3 nachgewiesen werden. In B/Lee Virus infizierten Zellen kam es nicht zur Assoziation von IRF-3 und CBP. Weiterhin zeigte sich 9h nach Infektion mit

dem B/ΔNS1 Virus eine verstärkte Phosphorylierung von IRF-3, erkennbar an der Zunahme der langsamer migrierenden IRF-3 Bande. Die Hyperphosphorylierung von IRF-3 12h p. i. führte zur partiellen Degradation von IRF-3 (Lin et al., 1998).

3.2.5.2 IRF-3 Translokation

Als weiterer Aspekt der IRF-3 Aktivierung wurde untersucht, ob auch die Translokation von IRF-3 aus dem Zytoplasma in den Nukleus, die der IRF-3/CBP Interaktion vorangeht, durch das B/NS1 Protein blockiert wird. Dazu wurden Immunfluoreszenzanalysen von MDCKII Zellen durchgeführt, in denen ein Fusionsprotein aus humanem IRF-3 und dem grün fluoreszierenden Protein (EGFP) ektopisch exprimiert wurde. Nach Infektion dieser Zellen mit dem B/ΔNS1 Virus akkumulierte IRF-3/EGFP im Kern, wohingegen IRF-3/EGFP in B/Lee Virus infizierten Zellen ebenso wie in unstimulierten Zellen im Zytoplasma lokalisiert war. Dies zeigte, dass das B/NS1 Protein die nukleäre Translokation von IRF-3 verhindert (Abb. 3.15).

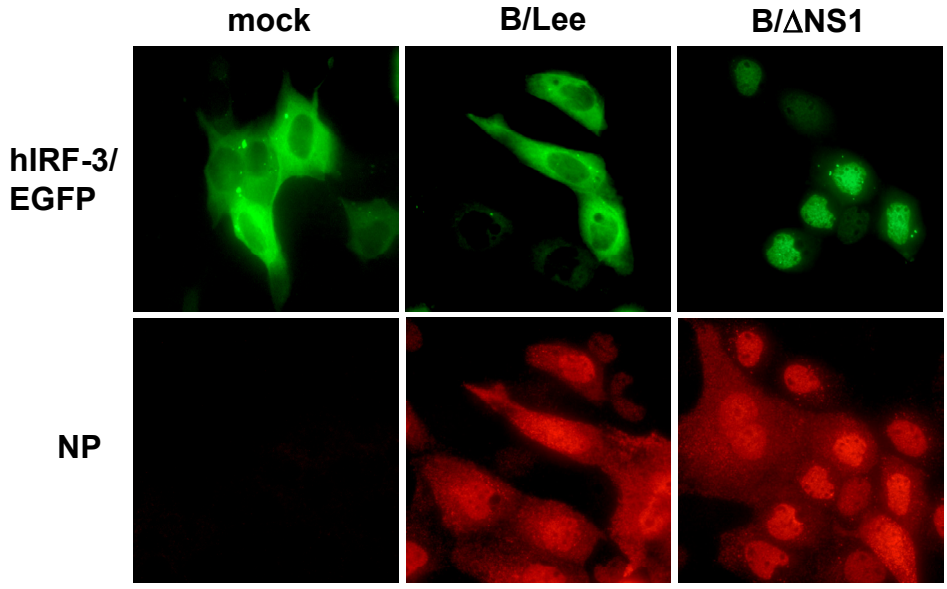


Abb. 3.15: B/ΔNS1 Virus Infektion führt zur nukleären Akkumulation von IRF-3. MDCKII Zellen wurden mit phIRF-3/EGFP transfiziert und nach 24h entweder Kontroll-behandelt oder mit B/Lee oder B/ΔNS1 Virus mit einer MOI von 1 infiziert. Die Zellen wurden 8h p. i. gegen das virale Nukleoprotein (NP) gefärbt und mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert.

Auch nach Stimulierung der Zellen durch das Influenza A/delNS1 Virus, von dem bekannt ist, dass es die nukleäre Translokation von IRF-3 induziert (Talon et al., 2000a), konnte durch die ektopische Expression von B/NS1 Protein die Translokation von IRF-3 in den Nukleus inhibiert werden (Abb. 3.16).

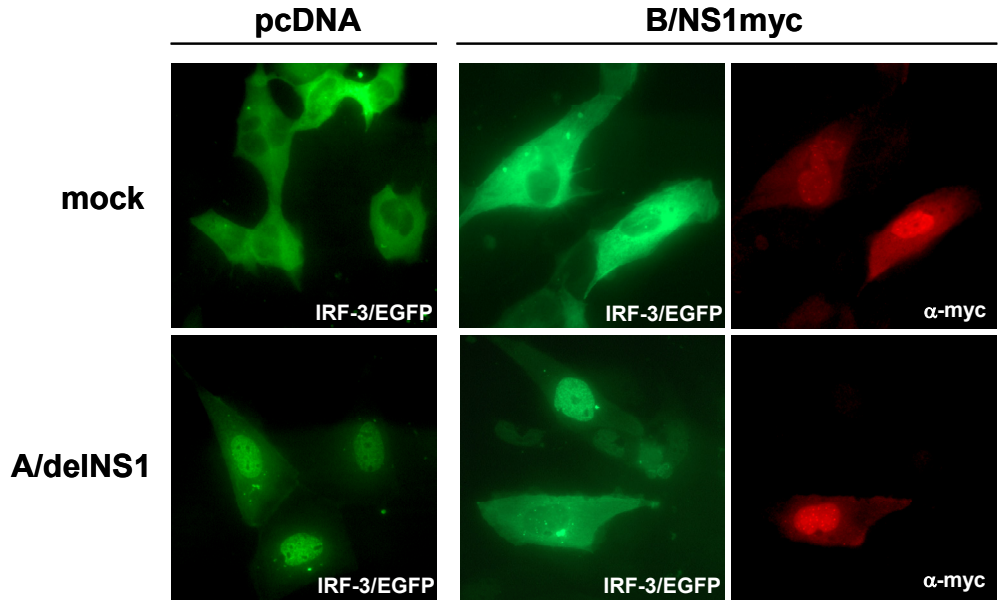


Abb. 3.16: Das B/NS1 Protein inhibiert die nukleäre Translokation nach A/delNS1 Virus Infektion. MDCKII Zellen wurden mit phIRF-3/EGFP und Leervektor (pcDNA) oder pcB/NS1myc kotransfiziert. Nach 24h wurden die Zellen Kontroll-behandelt oder mit dem A/delNS1 Virus mit einer MOI von 2 infiziert. Die Zellen wurden 8h p. i. mit einem myc-spezifischen Antikörper gegen das B/NS1myc Protein (rot) gefärbt und mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Die lückenlose Infektion der Zellen mit A/delNS1 Virus wurde durch eine Färbung mit einem NP-spezifischen Antikörper sichergestellt (nicht gezeigt).

3.2.5.3 IRF-3 Dimerisierung

Neben der nukleären Translokation ist auch die Bildung von IRF-3 Homodimeren ein Zeichen der IRF-3 Aktivierung. Die Dimerisierung von IRF-3 nach Infektion mit B/Lee und B/ΔNS1 Virus wurde in MDCKII Zellen analysiert, die ektopisch IRF-3 mit einem HA Epitop exprimierten. Die Analyse der Zellextrakte durch native PAA-Gel Elektrophorese und anschließende Detektion von IRF-3 mittels Immunoblot zeigte, dass die Infektion mit B/ΔNS1 Virus die Dimerisierung von IRF-3 induzierte. Dagegen verblieb IRF-3 in B/Lee Virus infizierten Zellen ebenso wie in kontroll- behandelten Zellen in seiner monomeren Form (Abb. 3.17).

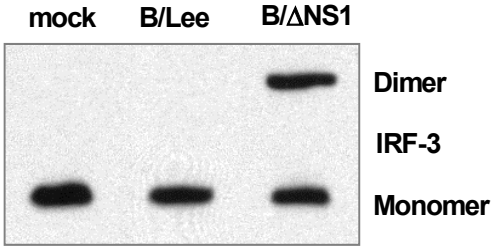


Abb. 3.17: Das B/NS1 Protein verhindert die virusinduzierte Dimerisierung von IRF-3. MDCKII Zellen wurden mit pCAGGS-IRF-3(HA) transfiziert und 24h später Kontroll-behandelt oder mit B/Lee oder B/ΔNS1 Virus mit einer MOI von 1 infiziert. 8h p. i. wurden Zellextrakte hergestellt und über native Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennt. Mittels Immunoblot mit HA-spezifischen Antikörpern wurde IRF-3 detektiert.

Das B/NS1 Protein inhibiert also während der viralen Infektion sowohl die IRF-3/CBP Komplexbildung als auch die nukleäre Translokation und Dimerisierung von IRF-3, die unterschiedliche Stadien der IRF-3 Aktivität repräsentieren. Die Tatsache, dass das B/NS1 Protein alle aufeinanderfolgenden Stadien der IRF-3 Aktivierung verhindert, zeigt, dass das B/NS1 Protein oberhalb der IRF-3 Phosphorylierung in die Signalkaskade eingreift.

3.2.6 Die Infektion mit dem B/NS1 Virus aktiviert die IRF-3 Kinase TBK-1

Die ubiquitär exprimierte Kinase TBK-1 wird nach Detektion intrazellulärer viraler dsRNA aktiviert und ist ihrerseits für die Aktivierung von IRF-3 verantwortlich (Fitzgerald et al., 2003, Hemmi et al., 2004, McWhirter et al., 2004, Sharma et al., 2003). Wie die vorangegangenen Experimente zeigten, konnte das B/NS1 Protein alle Phasen der Virus-vermittelten Aktivierung von IRF-3 verhindern. Um herauszufinden, ob diese Inhibition der IRF-3 Aktivierung auf eine verminderte Aktivität von TBK-1 zurückzuführen ist, wurde die TBK-1 Kinaseaktivität in B/Lee- und B/ΔNS1-Virus infizierten Zellen verglichen (Abb. 3.18). Dabei zeigte sich, dass TBK-1 in B/ΔNS1 Virus infizierten Zellen aktiviert wurde und dadurch in der Lage war, in einem *in vitro* Kinaseexperiment das Substrat GST-IκBα zu phosphorylieren. Nach Infektion mit B/Lee Virus konnte nur eine geringe Kinaseaktivität von TBK-1 nachgewiesen werden. Dies legt nahe, dass die Inhibition der IRF-3 Aktivierung durch das B/NS1 Protein auf einer verminderten Aktivität der TBK-1 Kinase beruht. Dabei bleibt zu klären, ob das B/NS1 Protein die Aktivierung von TBK-1 verhindert oder direkt die Kinaseaktivität blockiert.

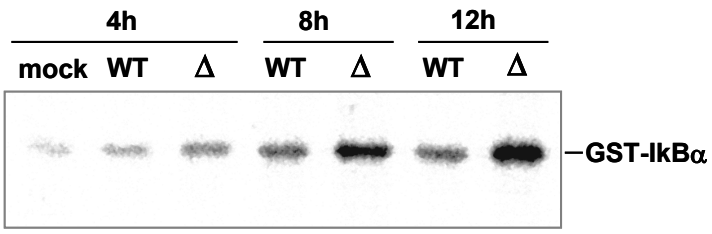


Abb. 3.18: Das B/NS1 Protein inhibiert die Kinaseaktivität von TBK-1. MDCKII Zellen wurden Kontroll-behandelt oder mit B/Lee Virus (WT) oder B/ΔNS1 Virus (Δ) mit einer MOI von 1 infiziert. Zelllysate wurden 4, 8 und 12h p. i. hergestellt und endogenes TBK-1 präzipitiert. Anschließend wurde die Kinaseaktivität der immobilisierten Immunkomplexe in Anwesenheit von [γ^{32}P]ATP und rekombinantem GST-IκBα als Substrat analysiert. Die Proben wurden über SDS-Gel-Elektrophorese aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembran transferiert und mittels Autoradiographie ausgewertet. Die *in vitro* Bestimmung der Kinaseaktivität der Zelllysate wurde von Stephan Ludwig, Universität Münster, durchgeführt.

3.3 Funktionelle Analyse der dsRNA-Bindung des B/NS1 Proteins und dessen Einfluss auf virale Replikation, Antagonisierung von IFN-ß und Inhibition von PKR

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass das B/NS1 Protein wichtig für eine effiziente Replikation des Virus ist sowie die Virus-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-3 und die Induktion von IFN-ß inhibieren kann. Der Auslöser für die transkriptionelle Aktivierung des IFN-ß Gens ist die Synthese intrazellulärer dsRNAs, welche vermutlich als Seitenprodukt viraler Replikationsprozesse entstehen (Majde, 2000). Frühere Untersuchungen anderer Autoren zeigten, dass das B/NS1 Protein, ebenso wie das A/NS1 Protein in der Lage ist, dsRNA *in vitro* zu binden (Wang & Krug, 1996). Deshalb wurde bislang vermutet, dass die Fähigkeit, die IFN-ß Induktion zu inhibieren, ähnlich wie beim dsRNA-bindenden E3L Protein des Vaccinia Virus, auf der Bindung und dadurch Maskierung der dsRNAs beruht (Jacobs & Langland, 1996). Dieses dsRNA-Sequestrierungsmodell ist jedoch für Influenza Virus Proteine experimentell nur spärlich untersucht worden. Eine weitere Gemeinsamkeit der beiden NS1 Proteine ist die Fähigkeit, die antivirale Proteinkinase R (PKR) zu inhibieren. Für das B/NS1 Protein gibt es dafür bislang nur *in vitro* Evidenz, während dies für das A/NS1 Protein zusätzlich *in vivo* gezeigt wurde (Bergmann et al., 2000, Wang & Krug, 1996). Da PKR durch dsRNA aktiviert wird, könnte die Inhibition von PKR ebenfalls von der dsRNA-Bindungsfähigkeit der NS1 Proteine abhängen. Dies ist jedoch nur für das A/NS1 Protein experimentell belegt (Hatada et al., 1999). An der dsRNA Bindung sind die ersten 93 (B/NS1) bzw. 73 (A/NS1) N-terminalen Aminosäuren der NS1 Proteine essentiell beteiligt (Wang & Krug, 1996). Computergestützte Strukturvorhersagen für das B/NS1 Protein auf Grundlage der Kristallstruktur des A/NS1 Proteins lassen vermuten, dass die N-terminalen RNA-Bindungsdomänen der beiden Proteine eine ähnlich α-helikale Struktur besitzen (Yuan et al., 2002).

In Mutationsanalysen des B/NS1 Proteins konnten von unseren Kooperationspartnern N. Donelan und A. Garcia-Sastre Gruppen basischer Aminosäuren in der N-terminalen Domäne identifiziert werden, die für die dsRNA-Bindung wichtig sind (Donelan et al., 2004) (Abb. 3.19). Mutierte B/NS1 Proteine, in deren RNA-Bindungsdomäne basische Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht worden waren, konnten dsRNA gar nicht mehr (#2, #4, #6), nur noch eingeschränkt (#1, #3) oder annähernd wie WT Protein (#7)

binden. Im folgenden sollte nun anhand von genetisch veränderten Influenza B Viren untersucht werden, welche Bedeutung die dsRNA-Bindungsfähigkeit des B/NS1 Proteins für die virale Replikation sowie die Inhibition der IFN-ß Induktion und der PKR Aktivierung hat. Die Charakterisierung eines rekombinanten Virus mit C-terminal trunkiertem B/NS1 Protein sollte weiterhin darüber Aufschluss geben, ob die RNA-Bindungsdomäne allein in der Lage ist, effiziente Replikation, Antagonisierung der IFN-ß Induktion und Inhibition von PKR zu vermitteln.

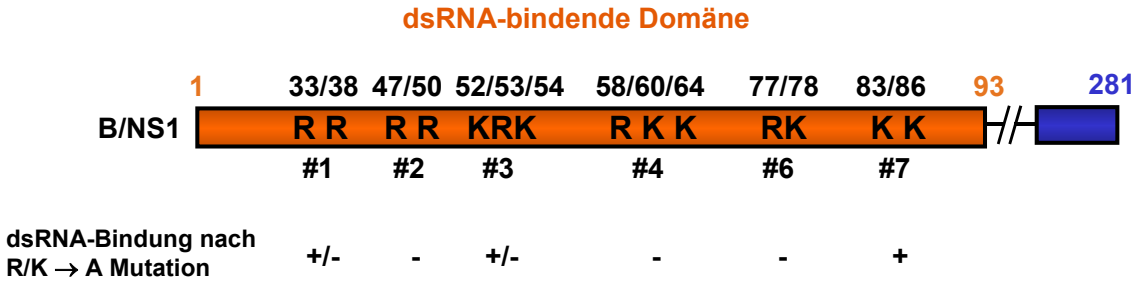


Abb. 3.19: Gruppen basischer Aminosäuren im N-terminalen Drittel des B/NS1 Protein sind wichtig für die dsRNA-Bindung. Jeweils eine Gruppe der basische Aminosäuren in der RNA-Bindungsdomäne des B/NS1 Proteins wurden zu Alanin mutiert (#1: AS 33/38, #2: AS 47/50, #3: AS 52/52/54, #4: AS 58/60/64, #6: AS 77/78, #7: AS 83/86). Die Fähigkeit der rekombinanten Proteine, dsRNA zu binden, wurde in EMSA-Experimenten analysiert (Donelan et al., 2004). Die dsRNA-Bindungsfähigkeit der mutierten Proteine wurde klassifiziert in „+ wie WT B/NS1“, „+/- eingeschränkt“ und „- nicht nachweisbar“.

3.3.1 Erzeugung von rekombinanten Influenza B Viren mit Mutationen in der RNA-Bindungsdomäne des B/NS1 Proteins

Um die Bedeutung der dsRNA-Bindungsfähigkeit des B/NS1 Protein im viralen Kontext untersuchen zu können, wurden rekombinante Influenza B Viren mit den oben genannten Alaninaustauschmutationen der basischen Aminosäuregruppen im B/NS1 Protein (Abb. 3.19) hergestellt. Mittels gerichteter Mutagenese wurden die korrespondierenden Mutationen in den für das NS-Segment kodierenden Vektor pHW-Lee-NS-XhoI eingeführt. Dadurch wurden die Plasmide pHW-Lee-NS-33/38, pHW-Lee-NS-47/50, pHW-Lee-NS-52/53/54, pHW-Lee-NS-58/60/64, pHW-Lee-NS-77/78 und pHW-Lee-NS-83/86 erzeugt. Die dabei verwendeten Oligonukleotidpaare führten zusätzlich neue Erkennungsstellen für die Restriktionsendonukleasen *Hind*III, *Sap*I, *Pst*I, *Nhe*I und *Bse*MI ein. Dies erlaubte das Erkennen positiver Klone durch den Verdau der mutagenisierten Plasmide mit den entsprechenden Restriktionsenzymen und führt genetische Tags in die NS-Segmente der rekombinanten Viren ein. Das NS-Segment kodiert neben dem B/NS1 Protein auch für das NS2 Protein. Da jedoch die

Mutationen in dem Bereich des NS-Segments liegen, der beim Spleißen der mRNA des NS2 Proteins herausfällt, wird das NS2 Protein durch die Mutagenese nicht beeinträchtigt. Zur Herstellung der rekombinanten Viren wurde jeweils eines der mutagenisierten NS-Plasmide zusammen mit den Plasmiden für die restlichen sieben Segmente in 293T Zellen transfiziert und die Überstände nach 48h in 6d alten embryonierten Hühnereiern passagiert. Der Nachweis der erfolgreichen Generierung der rekombinanten Viren B/NS1 33/38, B/NS1 47/50, B/NS1 52/53/54, B/NS1 58/60/64, B/NS1 77/78 und B/NS1 83/86 erfolgte über RT-PCR Amplifikation der NS Segmente und anschließenden Kontrollverdau der RT-PCR Produkte mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (Abb. 3.20). Die Sequenzierung der RT-PCR Produkte bestätigte die Präsenz der Mutationen im viralen Genom.

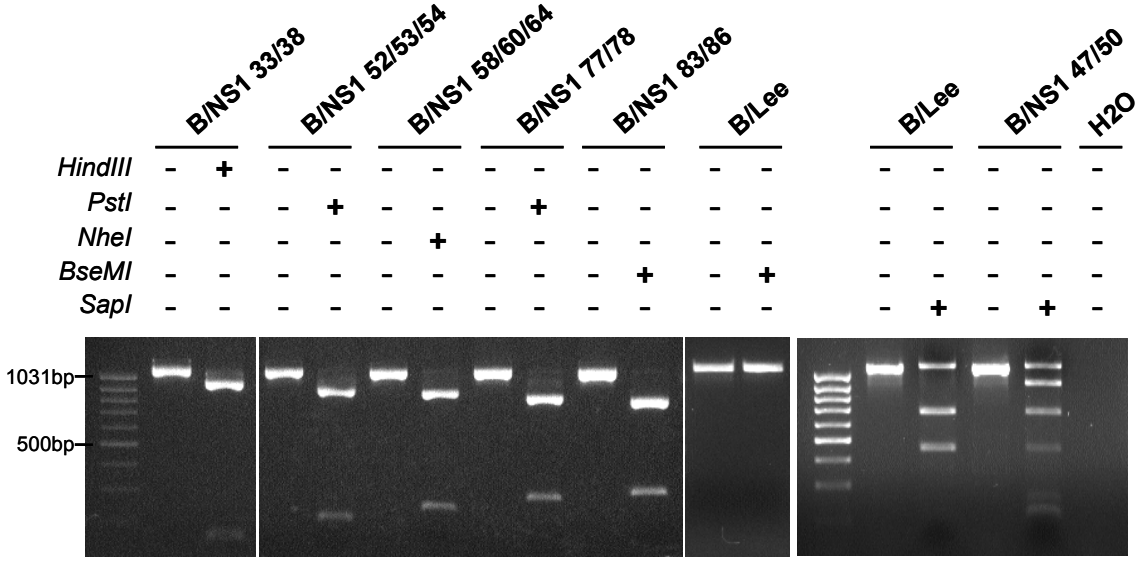


Abb. 3.20: RT-PCR Analyse der NS-Segmente rekombinanter Influenza B Viren mit Mutationen in der RNA-Bindungsdomäne des B/NS1 Proteins. Nach Extraktion der viralen RNA des WT Influenza B/Lee Virus sowie der Virusmutanten B/NS1 33/38, B/NS1 47/50, B/NS1 52/53/54, B/NS1 58/60/64, B/NS1 77/78 und B/NS1 83/86 wurden die NS-Segmente revers transkribiert und amplifiziert. Die Identität der NS-Segmente der rekombinanten Viren mit den neu eingeführten Schnittstellen wurde durch Verdau mit den Restriktionsenzymen *Hind*III, *Sap*I, *Pst*I, *Nhe*I, *Pst*I oder *Bse*MI bestätigt.

Die metabolische Markierung von infizierten MDCKII Zellen zeigte, dass in allen Fällen das B/NS1 Protein synthetisiert wurde und die Expressionskinetik der Virusmutanten B/NS1 33/38, B/NS1 47/50, B/NS1 52/53/54, B/NS1 58/60/64, B/NS1 77/78 und B/NS1 83/86 mit der Expressionskinetik des WT Virus vergleichbar war (Abb. 3.21).

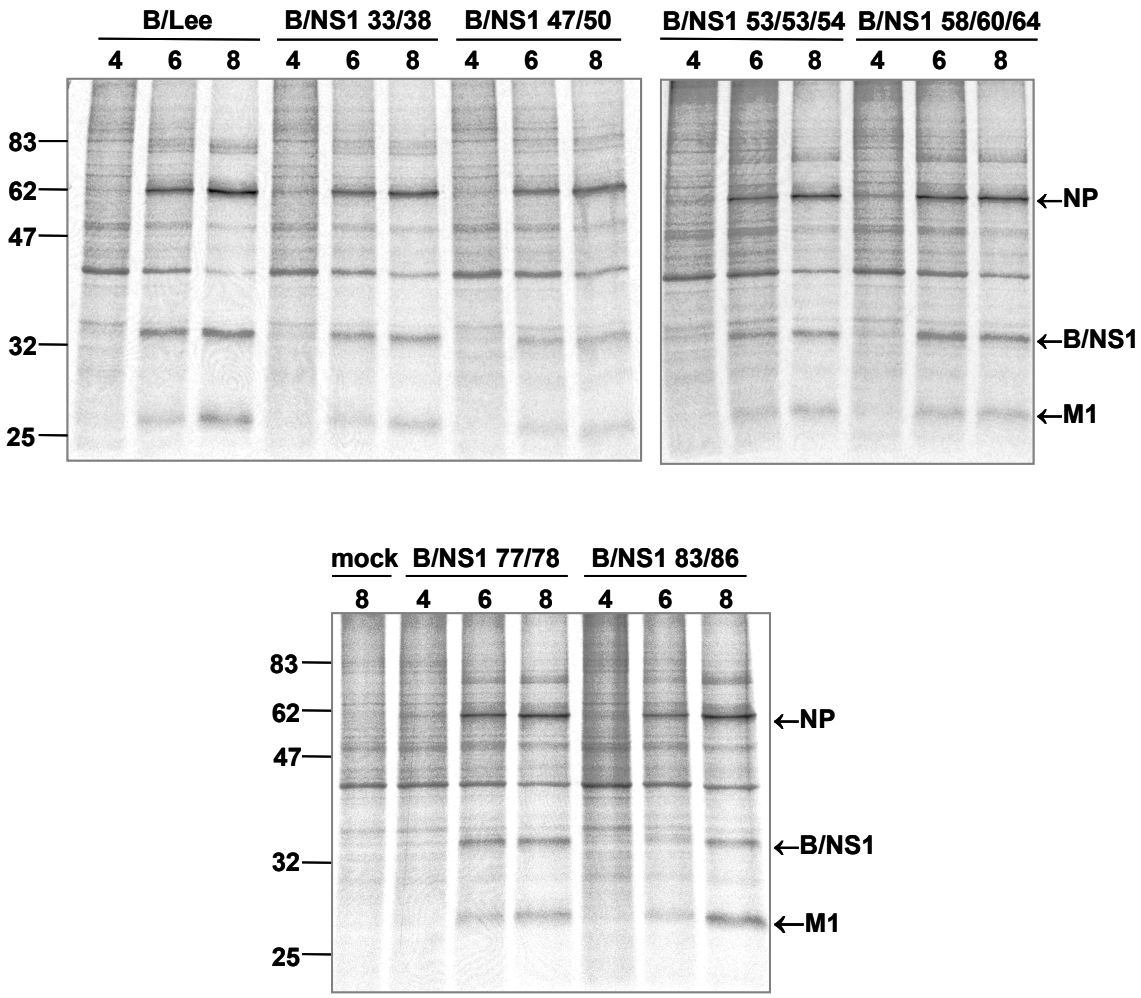


Abb. 3.21: Der zeitliche Verlauf der Expression viraler Proteine von WT B/Lee Virus und Virusmutanten ist vergleichbar. MDCKII Zellen wurden Kontroll-behandelt oder mit B/Lee Virus oder den Virusmutanten mit einer MOI von 10 infiziert. 3, 5 und 7h p.I wurden die Zellen mit [^{35}S]-Methionin für 1 h metabolisch markiert. Zellextrakte wurden 4, 6 und 8 h p. i. präpariert, über ein 12,5%iges PAA-Gel aufgetrennt und mittels Autoradiographie analysiert. Die Laufhöhe der Molekulargewichtsmarkerbanden (kDa) und die Position der viralen Proteine NP, B/NS1 und M1 sind am linken bzw. rechten Rand angezeigt.

3.3.2 Der Verlust der dsRNA-Bindungsfähigkeit beeinträchtigt die Replikation der B/NS1 Virusmutanten in Wirten mit kompetentem IFN-System

Zunächst wurde untersucht, welchen Einfluss der Verlust der dsRNA-Bindungskapazität des B/NS1 Proteins auf die Replikationsfähigkeit der Virusmutanten B/NS1 33/38, B/NS1 47/50, B/NS1 52/53/54, B/NS1 58/60/64, B/NS1 77/78 und B/NS1 83/86 ausübt. Dazu wurde die Replikation von WT Virus, B/ΔNS1 Virus und dsRNA-Bindungsmutanten in 6 und 11 Tage alten embryonierten Hühnereiern verglichen. In 6 Tage alten Bruteiern replizierten das WT Virus und alle Virusmutanten

zu Titern im Bereich von 10^7-10^8 ffu/ml. Die Reifung des Typ I Interferon Systems in 11 Tage alten Bruteiern im Vergleich zu 6 Tage alten Bruteiern hatte keine Auswirkungen auf die Replikation des WT Virus und der Virusmutanten B/NS1 52/53/54 und B/NS1 83/86, die dsRNA eingeschränkt bzw. gut binden können. Eine starke Attenuierung in IFN-kompetenten 11 Tage alten Eiern zeigte sich jedoch bei dem B/ΔNS1 Virus und den Virusmutanten B/NS1 33/38, B/NS1 47/50, B/NS1 58/60/64 und B/NS1 77/78, deren B/NS1 Proteine nur eingeschränkt oder gar nicht mehr in der Lage sind, dsRNA zu binden. (Abb. 3.22).

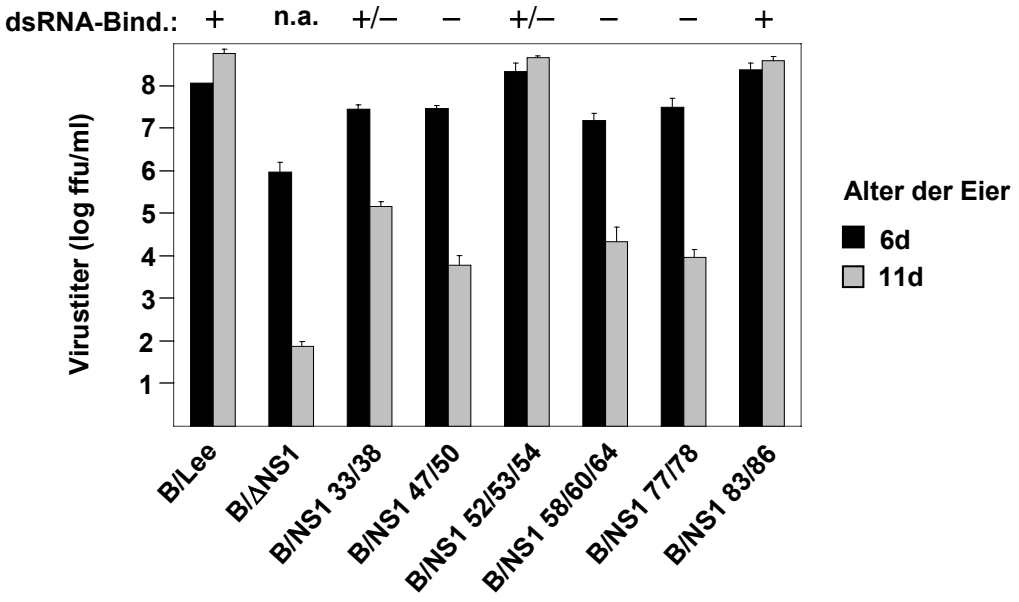


Abb. 3.22: Die dsRNA-Bindungsfähigkeit des B/NS1 Proteins ist notwendig für die virale Replikation in 11 Tage alten embryonierten Hühnereiern. 6 und 11 Tage alte embryonierte Hühnereier wurden mit 1000 infektiösen Einheiten des WT Virus B/Lee, des B/ΔNS1 Virus oder der B/NS1 Virusmutanten inokuliert und für 72h bei 33°C inkubiert. Die Virustiter wurden bestimmt, wie in Kap. 2.2.2.2 beschrieben. Dargestellt sind Durchschnittswerte von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Einen ähnlichen Phänotyp zeigten die Virusmutanten bei der multizyklischen Replikation in MDCKII Zellen, welche über ein funktionales Typ I IFN-System verfügen. Die Virusmutanten B/NS1 33/38, B/NS1 47/50, B/NS1 58/60/64 und B/NS1 77/78 waren in ihrer Replikation stark eingeschränkt, während die Virusmutanten B/NS1 52/53/54 und B/NS1 83/86 annähernd wie WT Virus replizierten (Tab. 3.2).

	Virustiter			
Virus	MOI 0,01		MOI 0,001	
B/Lee wt	$1{,}2 \times 10^7$	$9{,}1 \times 10^6$	$3{,}1 \times 10^7$	$4{,}1 \times 10^7$
B/ΔNS1	$< 1{,}7 \times 10^1$	$< 1{,}7 \times 10^1$		
B/NS1 33/38	$3{,}3 \times 10^2$	$1{,}7 \times 10^2$	$< 8{,}3 \times 10^1$	$< 8{,}3 \times 10^1$
B/NS1 47/50	$< 8{,}3 \times 10^1$	$< 8{,}3 \times 10^1$	$< 8{,}3 \times 10^1$	$< 8{,}3 \times 10^1$
B/NS1 52/53/54	$3{,}5 \times 10^6$	$6{,}2 \times 10^6$	$1{,}4 \times 10^6$	$2{,}7 \times 10^6$
B/NS1 58/60/64	$8{,}3 \times 10^2$	$1{,}7 \times 10^2$	$8{,}3 \times 10^1$	$< 8{,}3 \times 10^1$
B/NS1 77/78	$< 8{,}3 \times 10^1$	$< 8{,}3 \times 10^1$	$< 8{,}3 \times 10^1$	$< 8{,}3 \times 10^1$
B/NS1 83/86	$4{,}8 \times 10^6$	$2{,}0 \times 10^6$	$2{,}6 \times 10^6$	$2{,}7 \times 10^6$

Tab. 3.2: Die dsRNA-Bindungsfähigkeit des B/NS1 Proteins ist notwendig für die virale Replikation in MDCKII Zellen. In Doppelansätzen wurden konfluente Zellkulturschalen mit den angegebenen MOIs infiziert und für 3 Tage bei 33°C inkubiert. Die Virustiter wurden bestimmt, wie in Kap. 2.2.2.2 beschrieben.

Das Replikationsverhalten der Virusmutanten in embryonierten Hühnereiern und MDCKII Zellen deutete darauf hin, dass die Bindung von dsRNA durch das B/NS1 Protein notwendig für eine effiziente virale Replikation ist. In den folgenden Experimenten sollte geklärt werden, aufgrund welcher Mechanismen die Replikation der dsRNA-Bindungs-defizienten Viren beeinträchtigt wird.

3.3.3 Die dsRNA-Bindungskapazität des B/NS1 Proteins ist nicht entscheidend für die Inhibition der IFN-ß Induktion durch die B/NS1 Virusmutanten

Die vorangegangenen Experimente stützen die Hypothese der dsRNA-Sequestrierung, da der Verlust der dsRNA-Bindungsfähigkeit des B/NS1 Proteins eine Attenuierung der Viren in IFN-kompetenten Systemen zur Folge hatte. In den weiteren Experimenten wurde deshalb untersucht, ob und in welchem Maße die B/NS1 Virusmutanten, die in ihrer dsRNA-Bindungsfähigkeit eingeschränkt sind, die Induktion des IFN-ß Gens inhibieren können. Dazu wurde zunächst die Induktion des IFN-ß Promotors durch die B/NS1 Virusmutanten in einem Luziferase-Reportergen-Versuch analysiert. MDCK-C3 Zellen, die ein IFN-ß Reportergen tragen, wurden mit den Virusmutanten, dem WT B/Lee Virus oder der Deletionsmutante infiziert. Nach B/ΔNS1 Virus Infektion wurde

der IFN-ß Promotor verglichen mit Kontroll-behandelten Zellen 91fach induziert, während das WT Virus den IFN-ß Promotor nur in geringem Maße aktivierte. Die Aktivierung des IFN-ß Promotors durch die B/NS1 Virusmutanten bewegte sich, unabhängig von der dsRNA-Bindungskapazität der B/NS1 Proteine, zwischen 9fach und 35fach und lag damit deutlich unter der Aktivierung durch das B/ΔNS1 Virus (Abb. 3.23).

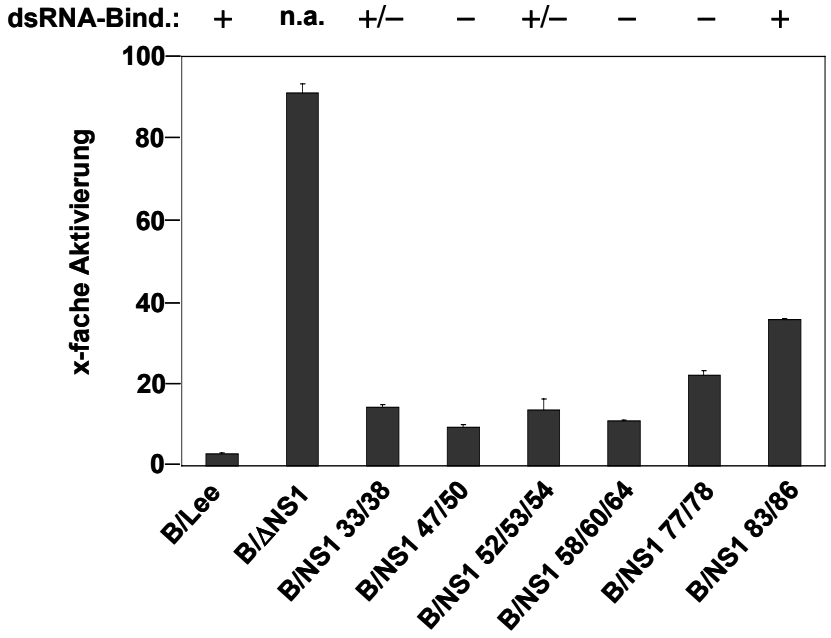


Abb. 3.23: Die B/NS1 Virusmutanten induzieren eine schwache Aktivierung des IFN-ß Promotors. MDCK-C3 Zellen, die mit einem IFN-ß Promotor Luziferase Reportergen stabil transfiziert wurden, wurden Kontroll-behandelt oder mit dem B/Lee Virus, dem B/ΔNS1 Virus oder den B/NS1 Virusmutanten mit einer MOI von 1 infiziert. Die Luziferaseaktivität wurde 8h p. i. bestimmt und ist als x-fache Aktivierung, verglichen mit Kontroll-behandelten Zellen, dargestellt, nachdem die Zellextrakte auf gleichen Proteingehalt normalisiert worden waren. Das Diagramm zeigt Durchschnittswerte eines typischen Experiments, welches in Doppelansätzen durchgeführt wurde und drei mal wiederholt wurde. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

In einem weiteren experimentellen Ansatz wurde die Auswirkung der Infektion mit den B/NS1 Virusmutanten auf die Induktion des endogenen IFN-ß Gens und die Sekretion von IFN-ß und IFN-α in einer humanen Lungenepithelzelllinie (A549) untersucht. Dazu wurden A549 Zellen mit B/Lee Virus, B/ΔNS1 Virus und den B/NS1 Virusmutanten infiziert. 18h p. i. wurde Gesamt-RNA extrahiert und die IFN-ß mRNA mittels RT-PCR amplifiziert (Abb. 3.24). Infektionen mit den Virusmutanten B/NS1 33/38, B/NS1 47/50, B/NS1 58/60/64, B/NS1 77/78 und B/NS1 83/886 induzierten eine schwache Transkription der IFN-ß mRNA, die jedoch deutlich unter der IFN-ß mRNA Menge lag, die in B/ΔNS1 Virus infizierten Zellen detektiert wurde.

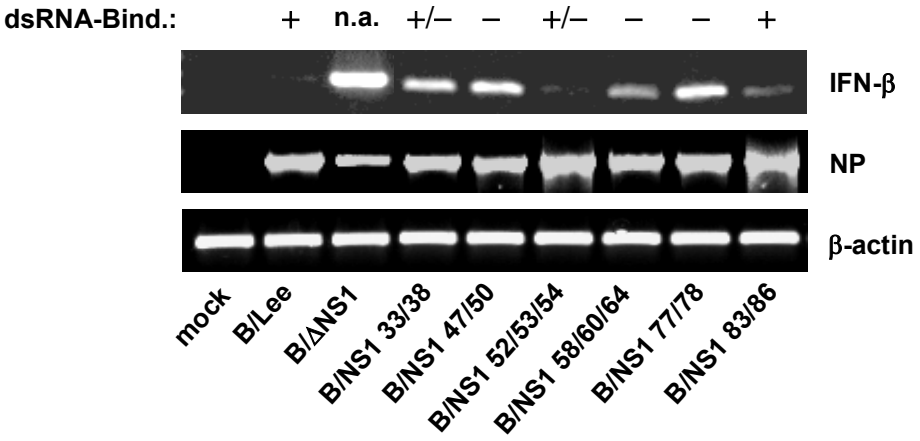


Abb. 3.24: RT-PCR Analyse der IFN-ß mRNA Transkripte. A549 Zellen wurden Kontroll-behandelt oder mit B/Lee Virus, B/ΔNS1 Virus oder den B/NS1 Virusmutanten mit einer MOI von 1 infiziert. 18h p. i. wurde die Gesamt-RNA extrahiert und gleiche Mengen mittels RT-PCR mit spezifischen Oligonukleotiden für IFN-ß mRNA, das virale NP-Segment und ß-Aktin mRNA analysiert.

Des weiteren wurde die Konzentration von IFN-ß und IFN-α im Überstand der infizierten Zellen bestimmt (Abb. 3.25). Im Gegensatz zu den B/ΔNS1 Virus infizierten Zellen, in deren Überstand 324 IU/ml IFN-ß gemessen wurde, lag die IFN-ß Konzentration nach Infektion mit den B/NS1 Virusmutanten mit 17 bis 84 UI/ml sehr niedrig (Abb. 3.25 A). Die durch die B/NS1 Virusmutanten induzierte IFN-ß Sekretion korrelierte daher nicht mit der dsRNA-Bindungsfähigkeit ihrer B/NS1 Proteine. Die Sekretion von biologisch aktivem IFN-ß führt nach Bindung von IFN-ß an den IFN-α/ß-Rezeptor über den JAK/STAT Signalweg zur Expression von IRF-7, welches für die Induktion von mehreren IFN-α Isoformen nötig ist (Marie et al., 1998, Sato et al., 1998, Yoneyama et al., 1996). Um zu untersuchen, ob das zuvor gemessene IFN-ß die Expression von IFN-α induzierte, wurden die selben Überstände mittels eines IFN-α ELISA analysiert (Abb. 3.25 B). Es zeigte sich, dass in den Überständen der B/ΔNS1 Virus infizierten Zellen IFN-α (57 pg/ml) nachweisbar war. Die IFN-α Konzentration in den Überstanden der mit B/Lee Virus und den B/NS1 Virusmutanten infizierten Zellen lag mit 3 bis 7 pg/ml nur unwesentlich über dem Wert der Kontroll-behandelten Zellen (2pg/ml) und damit im Bereich der Nachweisgrenze von 2,5 pg/ml. Die von den B/NS1 Virusmutanten induzierte IFN-ß Sekretion war demnach nicht in der Lage eine signifikante IFN-α Sekretion zu induzieren.

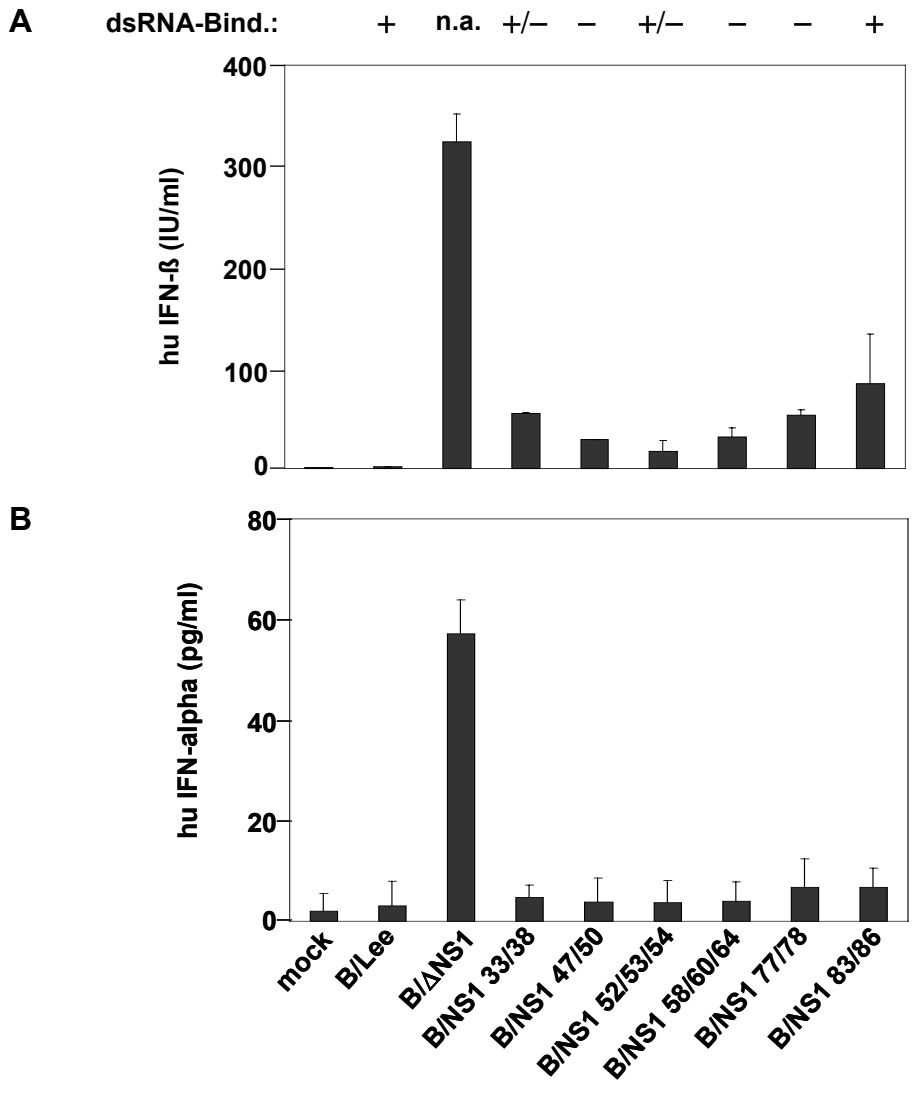


Abb. 3.25: Der Verlust der dsRNA-Bindungsfähigkeit des B/NS1 Proteins beeinträchtigt kaum die Inhibition der IFN-ß und IFN-α Sekretion. A549 Zellen wurden Kontroll-behandelt oder mit B/Lee Virus, B/ΔNS1 Virus oder den B/NS1 Virusmutanten mit einer MOI von 1 infiziert. Die Überstände der Zellen wurden 18h p. i. abgenommen und mittels ELISA für humanes IFN-ß (**A**) oder humane IFN-α Isoformen (**B**) analysiert. Die Diagramme zeigen Durchschnittswerte von drei unabhängigen Experimenten, die in Doppelansätzen durchgeführt wurden. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

3.3.4 Der Verlust der dsRNA-Bindungsfähigkeit des B/NS1 Proteins beeinflusst verschiedene Stadien der virusinduzierten IRF-3 Aktivierung

Für die Virus-vermittelte Induktion des IFN-ß Gens ist die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors IRF-3 notwendig, die zur Dimerisierung, Translokation in den Nukleus und die Assoziation mit dem Transkriptionskofaktor CBP führt. Im folgenden

sollte nun untersucht werden, ob durch die verschiedenen B/NS1 Virusmutanten unterschiedliche Stadien der IRF-3 Aktivierung inhibiert werden.

3.3.4.1 Assoziation von IRF-3 und CBP

Eine Voraussetzung für die Induktion des IFN-ß Promotors ist die Assoziation des aktivierten IRF-3 mit dem Transkriptionskofaktor CBP. Diese IRF-3/CBP-Interaktion wurde durch Koimmunopräzipitations-Experimente in infizierten A549 Zellen untersucht. Dazu wurde endogenes IRF-3 nach Infektion mit WT Virus, Deletionsmutante und den B/NS1 Virusmutanten präzipitiert und mittels Immunoblot IRF-3 sowie kopräzipitiertes CBP nachgewiesen (Abb. 3.26).

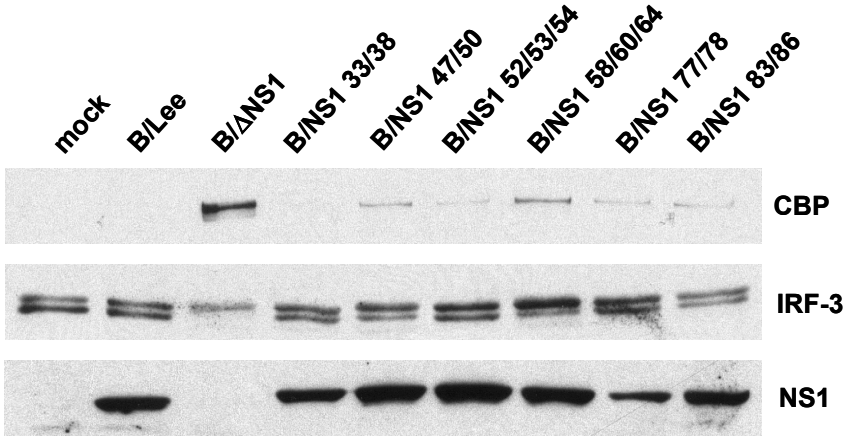


Abb. 3.26: Assoziation von IRF-3 und CBP. A549 Zellen wurden Kontroll-behandelt oder mit B/Lee Virus, B/ΔNS1 Virus oder den Virusmutanten mit einer MOI von 1 infiziert. Zelllysate wurden 10h p. i. hergestellt und endogenes IRF-3 mit IRF-3-spezifischen monoklonalen Antikörpern präzipitiert. Die Präzipitate wurden mittels Immunoblot mit Antikörpern gegen CBP und IRF-3 analysiert. Aliquots der Zelllysate wurden mit Antikörpern gegen das virale B/NS1 Protein analysiert.

In Übereinstimmung mit früheren Interaktionsstudien (Abb. 3.14) konnte eine Komplexbildung zwischen IRF-3 und CBP in B/ΔNS1-, jedoch nicht in B/Lee-Virus infizierten Zellen nachgewiesen werden. In den Präzipitaten der Zellen, die mit den Virusmutanten B/NS1 33/38, B/NS1 47/50, B/NS1 52/53/54, B/NS1 58/60/64, B/NS1 77/78 und B/NS1 83/86 infiziert worden waren, konnte keine (B/NS1 33/38) oder nur eine geringe CBP-Menge detektiert werden. Die geringe IRF-3/CBP-Komplexbildung entspricht also der schwachen IFN-ß Induktion durch die Virusmutanten, die unabhängig von der dsRNA-Bindungsfähigkeit der B/NS1 Proteine ist.

3.3.4.2 IRF-3 Translokation

Um mit CBP auf dem IFN-ß Promotor interagieren zu können, muss IRF-3 zunächst vom Zytoplasma in den Kern translozieren. Infektionen von MDCKII Zellen, die ein IRF-3/EGFP Fusionsprotein ektopisch exprimieren, zeigten, dass das B/NS1 Protein die nukleäre Akkumulation von IRF-3 verhindert, während IRF-3 in 87,5% der B/ΔNS1 Virus infizierten Zellen im Kern akkumuliert. Die Analyse der mit den NS1-Virusmutanten-infizierten Zellen zeigte, dass die B/NS1 Proteine der Viren B/NS1 52/53/54 und B/NS1 83/86 in ca. 25% der Zellen die nukleäre Akkumulation von IRF-3 nicht verhindern konnten. Infektionen mit den Virusmutanten B/NS1 33/38, B/NS1 47/50, B/NS1 58/60/64 und B/NS1 77/78 führten in ca. 80 % der infizierten Zellen zur Translokation von IRF-3 in den Nukleus (Abb. 3.27).

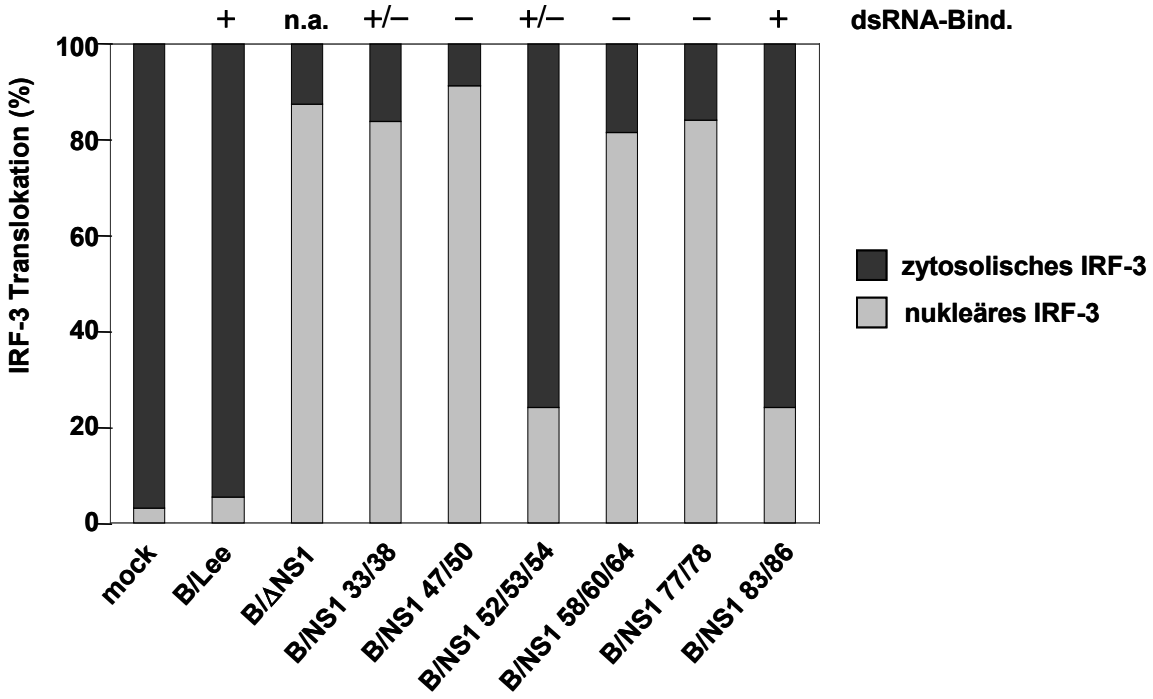


Abb. 3.27: Nukleäre Translokation von IRF-3. MDCKII Zellen wurden mit pEGFP-hIRF-3 transfiziert und nach 24h Kontroll-behandelt oder mit B/Lee Virus, B/ΔNS1 Virus oder den Virusmutanten mit einer MOI von 1 infiziert. Die Zellen wurden 9h p. i. mit einem Antikörper gegen das virale Nukleoprotein (NP) gefärbt und die Lokalisation von IRF-3 in NP positiven Zellen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie bestimmt. Das Diagramm zeigt den Anteil der Zellen mit nukleärem IRF-3. Die Gesamtzahl der ausgezählten virusinfizierten Zellen lag zwischen 100 und 150 Zellen pro Virustyp und wurde auf 100% gesetzt.

3.3.4.3 IRF-3 Dimerisierung

Untersuchungen durch nicht-denaturierende Gelelektrophorese zeigten, dass die Infektion von MDCKII Zellen mit den B/NS1 Virusmutanten zu einer Dimerisierung des ektopisch exprimierten IRF-3 führte. Der Anteil der IRF-3 Dimere an der gesamten IRF-3 Menge nach Infektion mit den Virusmutanten lag im Bereich der IRF-3 Dimerbildung nach Infektion mit dem B/ΔNS1 Virus oder leicht darunter (Abb. 3.28). Die Dimerbildung konnte jedoch nicht eindeutig mit dem Verlust der dsRNA-Bindungsfähigkeit des B/NS1 Proteins in Verbindung gebracht werden.

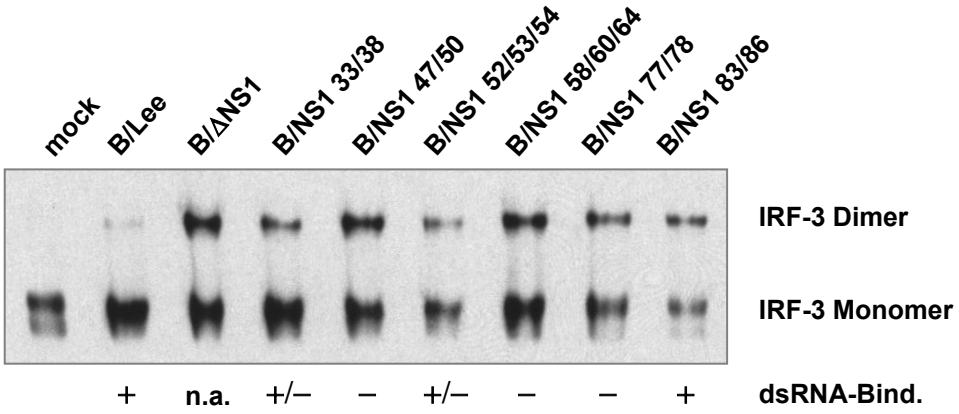


Abb. 3.28: IRF-3 Dimerisierung. MDCKII Zellen wurden mit pCAGGS-IRF-3(HA) transfiziert und nach 24h Kontroll-behandelt oder mit B/Lee, B/ΔNS1 oder den Virusmutanten mit einer MOI von 1 infiziert. Zellextrakte wurden 8h p. i. präpariert und über native PAA-Gel Elektrophorese aufgetrennt. Mittels Immunoblot mit HA-spezifischen Antikörpern wurde das HA-markierte IRF-3 detektiert.

Die Ergebnisse des Dimerisierungsversuchs und der IRF-3 Translokation stehen scheinbar im Gegensatz zur IRF-3/CBP Interaktion und der Induktion des IFN-ß Promotors, da nukleäre Translokation und Dimerisierung bisher als gleichbedeutend mit voller funktioneller Aktivität von IRF-3 gilt. Eine Ursache dafür könnte sein, dass für die einzelnen Stadien der IRF-3 Aktivierung graduelle Unterschiede der Phosphorylierung eine Rolle spielen, bzw. die Phosphorylierung unterschiedlicher Serin-Gruppen notwendig ist. Dies wird in Kap. 4.4.1 eingehender diskutiert.

3.3.5 Die Bindung von dsRNA durch das B/NS1 Protein ist nötig für die Inhibition der Virus-vermittelten Aktivierung der Proteinkinase R

Die vorangegangenen Experimente hatten gezeigt, dass die dsRNA-Bindungsfähigkeit des B/NS1 Proteins nicht entscheidend für die Inhibition der IFN-ß Induktion ist. Dies war ein unterwartetes Ergebnis, welches das dsRNA-Sequestrierungsmodell in Frage stellt und keine Erklärung für die eingeschränkte Replikationskapazität der dsRNA-bindungsdefizienten Virusmutanten gibt. Daher sollte als nächstes analysiert werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Replikationskapazität der Virusmutanten und der Aktivierung der dsRNA-abhängigen PKR in infizierten Zellen besteht. Die Bindung von dsRNA führt zur Autophosphorylierung von PKR, welche daraufhin den eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 2 α (eIF2α) phosphoryliert. Dies führt zur Inhibition der Translation sowohl zellulärer als auch viraler Proteine und beeinträchtigt die virale Replikation (Samuel, 2001). Es war bereits in früheren *in vitro* Studien gezeigt worden, dass das B/NS1 Protein die Aktivierung von PKR in Extrakten inhibieren kann (Wang & Krug, 1996). Diese Eigenschaft könnte eine effiziente virale Replikation in Zellen unterstützen, jedoch gab es dazu noch keine experimentellen Untersuchungen.

Infektionsversuche sollten nun zeigen, ob das B/NS1 Protein auch in infizierten Zellen die Aktivierung von PKR inhibieren kann und welchen Einfluss die dsRNA-Bindungsfähigkeit auf diese Funktion des B/NS1 Proteins hat. Dazu wurden A549 Zellen mit WT B/Lee Virus, der Deletionsmutante B/ΔNS1 und den B/NS1 Virusmutanten infiziert. Zelllysate wurden 10h p. i. hergestellt und mittels Immunoblot mit PKR- und Phospho-PKR-spezifischen Antikörpern sowie eIF2α- und Phospho-eIF2α-spezifischen Antikörpern analysiert (Abb. 3.29). Die Infektionen hatten keinen Einfluss auf die Gesamtmenge der PKR (Abb. 3.29 B). In B/ΔNS1 Virus infizierten Zellen konnte phosphorylierte PKR nachgewiesen werden, während PKR sowohl in Kontroll-behandelten als auch in B/Lee-Virus infizierten Zellen nicht phosphoryliert wurde (Abb. 3.29 A). Dies zeigte, dass das B/NS1 Protein *in vivo* die Aktivierung von PKR verhindert. Die Virusmutanten B/NS1 52/54/58 und B/NS1 83/86, deren NS1 Proteine dsRNA noch eingeschränkt bzw. gut binden können, verfügten ebenfalls über die Fähigkeit, die PKR Autophosphorylierung zu inhibieren. Die Virusmutanten B/NS1 33/38, B/NS1 47/50, B/NS1 58/60/64 und B/NS1 77/78, deren dsRNA-Bindungsfähigkeit eingeschränkt oder ausgeschaltet ist, sind dazu nicht mehr in der Lage. Dies zeigt eine klare Korrelation von PKR Inhibition und effizienter Replikation

in IFN-kompetenten Wirten. Infolge der Aktivierung von PKR nach Infektion mit den Virusmutanten B/NS1 33/38, B/NS1 47/50, B/NS1 58/60/64 und B/NS1 77/78 wurde auch eIF2α, ein Substrat der PKR, phosphoryliert (Abb. 3.29 C). In Zellen, die kontrollbehandelt oder mit den Viren B/Lee, B/NS1 52/54/58 oder B/NS1 83/86 infiziert wurden, konnte dagegen kein phosphoryliertes eIF-2α detektiert werden. Überraschenderweise konnte nach B/ΔNS1 Virus Infektion, trotz starker Phosphorylierung der PKR, keine eIF-2α Phosphorylierung nachgewiesen werden. Die Gesamtmenge an eIF-2α war in allen Lysaten gleich (Abb. 3.29 D). Außerdem wurde durch Detektion der viralen Proteine NP und B/NS1 gezeigt, dass die Zellen mit ähnlichen Infektionsdosen behandelt wurden (Abb. 3.29 E/F).

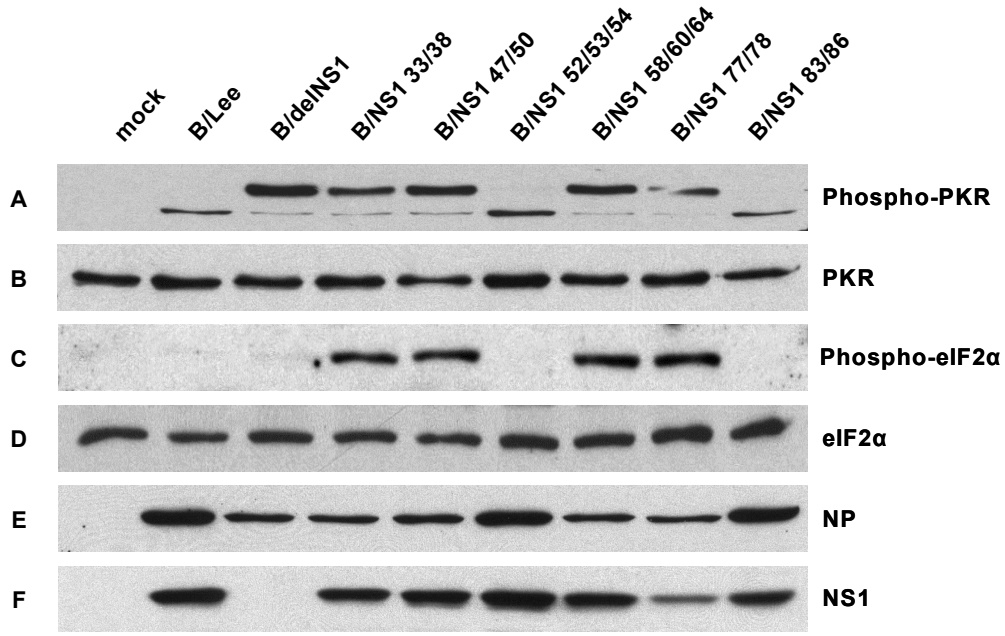


Abb. 3.29: Die dsRNA-Bindungsfähigkeit des B/NS1 Proteins ist notwendig für die Inhibition von PKR. A549 Zellen wurden Kontroll-behandelt oder mit B/Lee Virus, B/ΔNS1 Virus oder den B/NS1 Virusmutanten mit einer MOI von 1 infiziert. Zellextrakte wurden 10h p. i. hergestellt, über ein 7,5%iges denaturierendes PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Immunoblot mit Antikörpern spezifisch für Phospho-PKR, PKR, Phospho-eIF2α, eIF2α, virales NP und virales B/NS1 analysiert.

3.3.6 Herstellung eines Influenza B Virus mit C-terminal trunkiertem B/NS1 Protein

Die Analyse der IFN-ß Induktion durch die B/NS1 Virusmutanten hatte gezeigt, dass die dsRNA-Bindungsfähigkeit des B/NS1 Proteins nicht ausschlaggebend für die

Antagonisierung der IFN-ß Induktion hat. Des weiteren war von unseren Kooperationspartnern in Reportergenversuchen gezeigt worden, dass die ektopische Expression des C-terminalen Teils des B/NS1 Proteins (AS 94-281), der keine dsRNA bindet, die Virus-vermittelte Stimulation des IFN-ß Promotors inhibieren kann (Donelan et al., 2004). Dies deutet darauf hin, das diese B/NS1-Domäne für die Inhibition der IFN-ß Induktion notwendig ist. Um die Bedeutung der C-terminalen Domäne im viralen Kontext weiter zu untersuchen, wurde ein rekombinantes Influenza B Virus generiert, dessen B/NS1 Protein C-terminal trunkiert ist (B/Lee NS1-104) (Abb. 3.30 A). Dazu wurden mittels gerichteter Mutagenese des Plasmids pHW-Lee-NS-XhoI die Kodons 105 und 106 des NS1 Leserahmens zu STOP-Kodons mutiert, sowie eine Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym *Eco*RV eingeführt. Nach Transfektion des Plasmids pHW-Lee-NS1-104 zusammen mit den Plasmiden der sieben übrigen viralen Segmente in 293T Zellen und Passage der Überstände in 6 Tage alten embryonierten Hühnereiern konnte das rekombinante Virus B/NS1-104 in der Allantoisflüssigkeit nachgewiesen werden. Isolation der viralen RNA, RT-PCR Amplifikation des NS Segments und Restriktionsverdau mit dem Enzym *Eco*RV bestätigte die Identität des rekombinanten B/NS1-104 Virus (Abb. 3.30 B). Die korrekte Nukleotidsequenz des NS-Segments wurde außerdem über Sequenzierung eines amplifizierten RT-PCR Produkts überprüft.

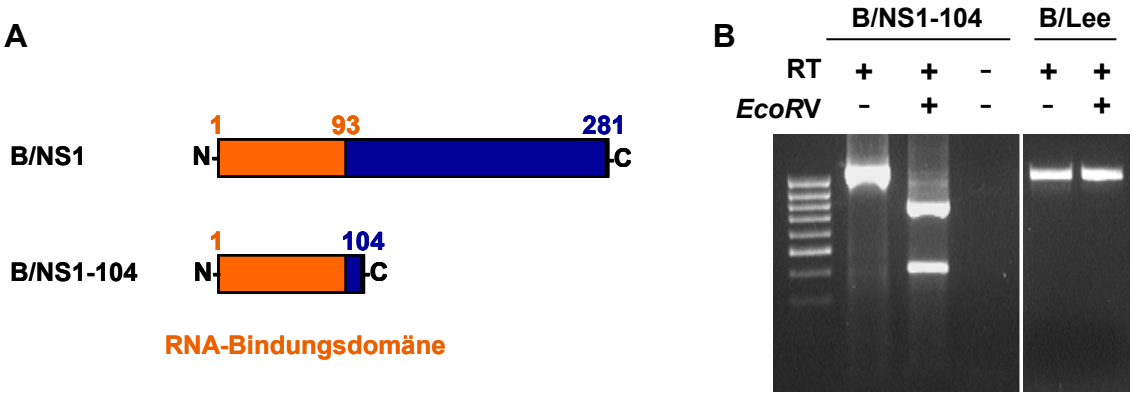


Abb. 3.30: Das C-terminal trunkierte NS1 Protein des B/NS1-104 Virus. (**A**) Durch Mutation der Kodons 105 und 106 des B/NS1-Leserahmens zu STOP-Kodons werden nur die ersten 104 AS des B/NS1 Proteins exprimiert. (**B**) RT-PCR Analyse des NS Segments des B/NS1-104 Virus. Nach Extraktion der viralen RNA des B/Lee Virus sowie der Virusmutante B/NS1-104 wurden die NS-Segmente revers transkribiert und amplifiziert. Die Identität des NS-Segments des B/Lee NS1-104 Virus wurde durch Verdau mit dem Restriktionsenzym *Eco*RV bestätigt.

Die metabolische Markierung von infizierten MDCKII Zellen zeigte, dass das trunkierte B/NS1 Protein synthetisiert wurde und die Expressionsstärke der viralen Proteine des B/NS1-104 Virus mit der des WT Virus vergleichbar war (Abb. 3.31).

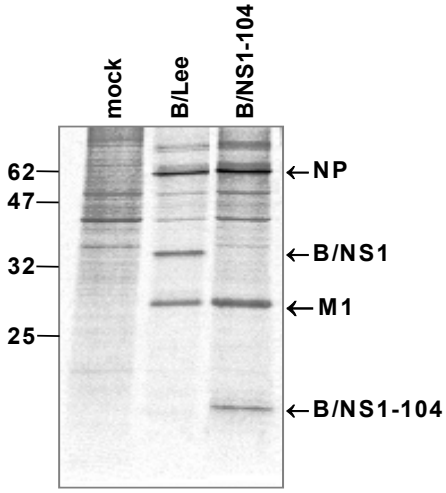


Abb. 3.31: Die Expressionsstärke viraler Proteine von WT B/Lee Virus und B/NS1-104 Virus ist vergleichbar. MDCKII Zellen wurden Kontroll-behandelt oder mit B/Lee Virus oder B/NS1-104 Virus mit einer MOI von 10 infiziert. 7h p.I wurden die Zellen mit [^{35}S]-Methionin für 1h metabolisch markiert. Zellextrakte wurden 8h p. i. präpariert, über ein 15%iges PAA-Gel aufgetrennt und mittels Autoradiographie analysiert. Die Laufhöhe der Molekulargewichtsmarkerbanden (kDa) und die Position der viralen Proteine NP, B/NS1, B/NS1-104 und M1 sind am linken bzw. rechten Rand angezeigt.

3.3.7 Die RNA-Bindungsdomäne des B/NS1 Proteins ist ausreichend für eine effiziente virale Replikation

Anhand der Virusmutante wurde untersucht, welchen Einfluss die C-terminale Domäne des B/NS1 Proteins auf die Replikationsfähigkeit hat. Dazu wurden 6 und 11 Tage alte embryonierte Hühnereier mit WT B/Lee Virus, dem B/ΔNS1 Virus und der Virusmutante B/NS1-104 inokuliert. Wie bereits gezeigt, führt die Reifung des Typ I Interferon Systems in 11 Tage alten Bruteiern im Vergleich zu 6 Tage alten Bruteiern zu einer starken Attenuierung des NS1-defizienten B/ΔNS1 Virus. Die Reifung des IFN-Systems hatte jedoch kaum Einfluss auf die Replikation des B/NS1-104 Virus (Abb. 3.32), dessen Titer mit ca. 1 x 10^8 ffu/ml im Bereich der Titer des WT Virus lagen.

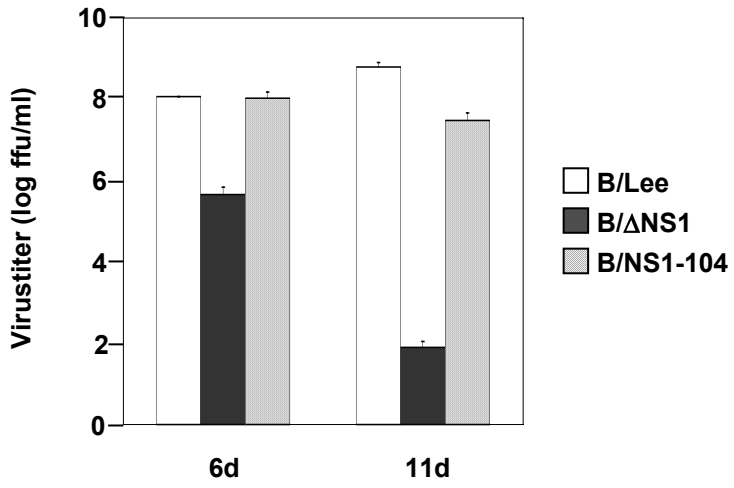


Abb. 3.32: Die AS 1-104 des B/NS1 Proteins sind ausreichend für die virale Replikation in 11 Tage alten embryonierten Hühnereiern. 6 und 11 Tage alte embryonierte Hühnereier wurden mit 1000 infektiösen Einheiten des WT Virus B/Lee, des B/ΔNS1 Virus oder der Virusmutante B/NS1-104 inokuliert und für 72h bei 33°C inkubiert. Die Virustiter wurden bestimmt, wie in Kap. 2.2.2.2 beschrieben. Dargestellt sind Durchschnittswerte von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Die multizyklische Replikation der Virusmutante B/NS1-104 in MDCKII Zellen war jedoch eingeschränkt. Die Titer lagen ca. 1-2 Log-Stufen unter denen des WT Virus (Tab. 3.3).

Zelltyp MOI	Virustiter (ffu/ml)	
	B/Lee	B/NS1-104
MDCKII		
0,01	$3,8 \times 10^7$	$1,7 \times 10^6$
0,01	$4,3 \times 10^7$	$1,5 \times 10^6$
0,01	$7,7 \times 10^7$	$1,2 \times 10^6$
0,01	$7,1 \times 10^7$	$3,5 \times 10^5$

Tab. 3.3: Die RNA-Bindungsdomäne des B/NS1 Proteins unterstützt eine effiziente virale Replikation in MDCKII Zellen. Je vier konfluente Zellkulturschalen wurden mit B/Lee Virus oder B/NS1-104 Virus mit einer MOI von 1 infiziert und für 3 Tage bei 33°C inkubiert. Die Virustiter wurden bestimmt, wie in Kap. 2.2.2.2 beschrieben.

Die dsRNA-Bindungsdomäne des B/NS1 Proteins scheint also ausreichend zu sein, um eine effiziente Replikation des Virus in 11 Tage alten embryonierten Hühnereiern zu gewährleisten, während die Replikation in MDCKII Zellen um 1-2 Log-Stufen eingeschränkt ist.

3.3.8 Die Virusmutante B/NS1-104 ist ein starker Induktor von Typ I IFN

In Kap. 3.3.2 ist gezeigt, dass die B/NS1 Proteine trotz Verlust der dsRNA-Bindungsfähigkeit die IFN-ß Induktion immer noch inhibieren können. Unsere Kollaborationspartner konnten zeigen, dass auch der C-terminale Teil des B/NS1 Proteins die IFN-ß Induktion verhinderte. Deshalb wurde im Folgenden untersucht, welche Auswirkungen der Verlust der C-terminalen Domäne auf die Virus-vermittelte Induktion des IFN-ß Gens hat.

Zunächst wurden MDCK-C3 Zellen, die ein IFN-ß Reportergen enthalten, mit B/Lee Virus, B/ΔNS1 Virus und B/NS1-104 Virus infiziert. Die Infektion mit der Virusmutante B/NS1-104 induzierte eine ca. 80fache Aktivierung des IFN-ß Promotors und erreicht damit Werte, die mit der Promotoraktivierung des B/ΔNS1 Virus vergleichbar waren (Abb. 3.33 A). Nach Infektion von A549 Zellen mit der Virusmutante B/NS1-104 zeigte sich ebenfalls eine starke Induktion des endogenen IFN-ß Gens. Mittels RT-PCR Analyse konnten vergleichbare Mengen IFN-ß mRNA in

B/NS1-104 Virus und B/ΔNS1 Virus infizierten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.33 B). Die RNA-Bindungsdomäne des B/NS1 Proteins allein scheint also nicht in der Lage zu sein, die Virus-vermittelte Induktion des IFN-ß Gens zu inhibieren. Zur starken IFN-ß Induktion könnte auch die hohe RNP-Synthese beitragen.

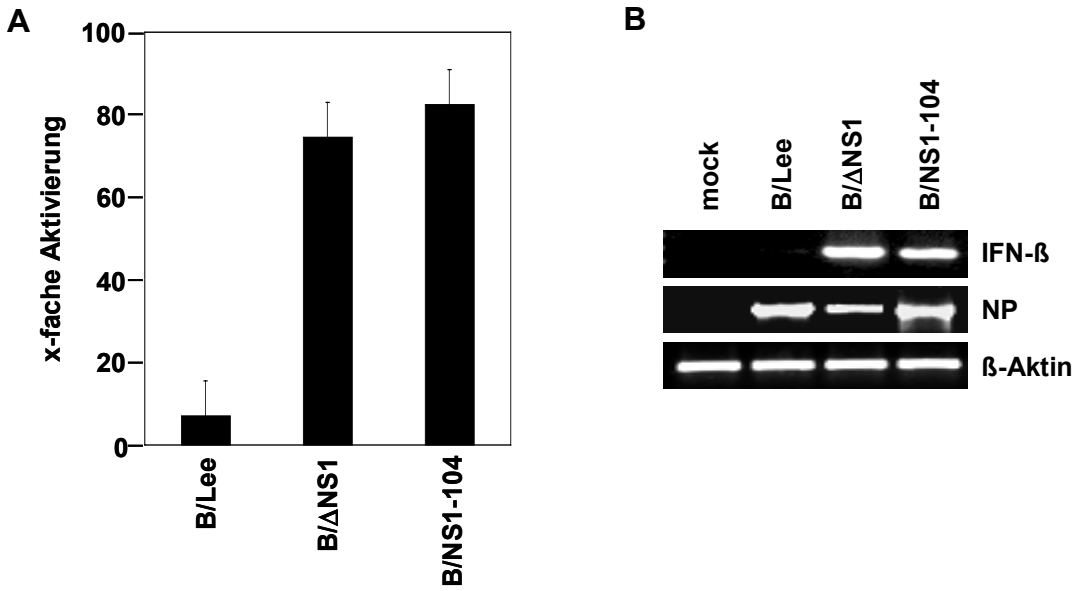


Abb. 3.33: Die Virusmutante B/NS1-104 aktiviert den IFN-ß Promotor ebenso stark wie das B/ΔNS1 Virus. (**A**) MDCK-C3 Zellen, die mit einem IFN-ß Promotor Luziferase Reportergen transfiziert wurden, wurden Kontroll-behandelt oder mit dem B/Lee Virus, dem B/ΔNS1 Virus oder der Virusmutante B/NS1-104 mit einer MOI von 1 infiziert. Die Luziferaseaktivität wurde 8h p. i. bestimmt und ist als x-fache Aktivierung verglichen mit Kontroll-behandelten Zellen dargestellt, nachdem die Zellextrakte auf gleichen Proteingehalt normalisiert worden waren. Das Diagramm zeigt Durchschnittswerte von 2 typischen Experimenten, welche in Doppelansätzen durchgeführt wurde. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. (**B**) A549 Zellen wurden Kontroll-behandelt oder mit B/Lee Virus, B/ΔNS1 Virus oder der Virusmutante B/NS1-104 mit einer MOI von 1 infiziert. Die Gesamt-RNA wurde 18h p. i. extrahiert und mittels RT-PCR mit spezifischen Oligonukleotiden für humane IFN-ß mRNA, virale NP vRNA und ß-Aktin mRNA analysiert.

Des weiteren wurde mittels ELISA die Mengen an IFN-ß und IFN-α in den Überständen der infizierten Zellen bestimmt (Abb. 3.34). Im Gegensatz zu den B/ΔNS1 Virus infizierten Zellen, in deren Überstand 330 IU/ml IFN-ß gemessen wurde, lag die IFN-ß Konzentration nach Infektion mit der B/NS1-104 Virusmutanten mit 738 IU/ml doppelt so hoch (Abb. 3.34 A). Die Sekretion von biologisch aktivem IFN-ß führt über auto- und parakrine Mechanismen zur Synthese von IFN-α (Marie et al., 1998, Sato et al., 1998, Yoneyama et al., 1996). Entsprechend dieser positiven Rückkopplung konnte in den Überstanden der B/NS1-104 Virus infizierten Zellen mit 167 pg/ml eine mehr

als doppelt so hohe IFN-α Konzentration gemessen werden als nach B/ΔNS1 Virus Infektion (67 pg/ml) (Abb. 3.34 B). Obwohl nach B/NS1-104 und B/ΔNS1 Virus Infektion vergleichbare Mengen IFN-ß mRNA vorliegen, scheint also die Anwesenheit der RNA-Bindungsdomäne in den B/NS1-104 Virus infizierten Zellen eine verstärkte Expression und Sekretion von Typ I IFN zu begünstigen. Dies könnte auf eine effektivere Translation im Vergleich zu B/ΔNS1 infizierten Zellen zurückzuführen sein.

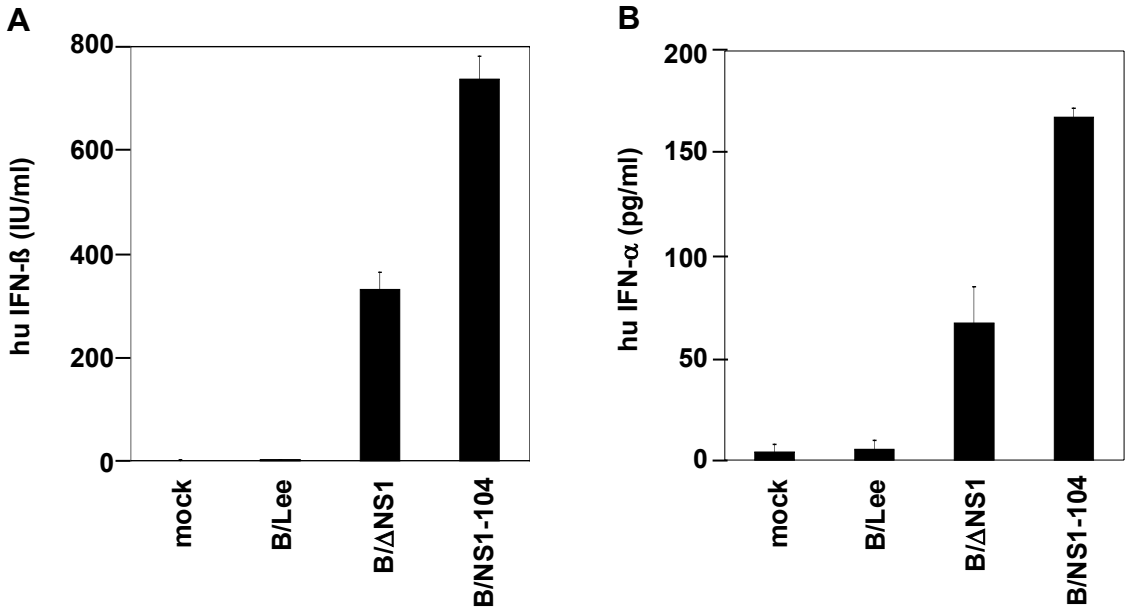


Abb. 3.34: Die Virusmutante B/NS1-104 induziert eine stärkere Sekretion von Typ I IFN als das B/ΔNS1 Virus. A549 Zellen wurden Kontroll-behandelt oder mit B/Lee Virus, B/ΔNS1 Virus oder der Virusmutante B/NS1-104 mit einer MOI von 1 infiziert. Die Überstände der Zellen wurden 18h p. i. abgenommen und mittels ELISA für humanes IFN-ß (**A**) oder humane IFN-α Isoformen (**B**) analysiert. Die Diagramme zeigen Durchschnittswerte von drei unabhängigen Experimenten, die in Doppelansätzen durchgeführt wurden. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

3.3.9 Die dsRNA-Bindungsdomäne des B/NS1 Proteins ist ausreichend für die Inhibition der Proteinkinase R

In den vorangegangenen Kapiteln wurde dargestellt, dass die Fähigkeit des B/NS1 Proteins, die PKR zu inhibieren, von seiner dsRNA-Bindungskapazität abhängig ist (Kap. 3.3.5) und diese Aktivität mit der effektiven Replikation der beschriebenen dsRNA-Bindungsmutanten in IFN-kompetenten Wirten korreliert (Kap 3.3.2). Da auch das B/NS1-104 Virus in IFN-kompetenten Wirten gut replizierte und das trunkierte B/NS1 Protein an dsRNA bindet, ist anzunehmen, dass das trunkierte B/NS1 Protein auch die Aktivierung von PKR während der Infektion inhibiert. Um dies zu

untersuchen, wurden A549 Zellen mit WT B/Lee Virus, der Deletionsmutante B/ΔNS1 und der Virusmutante B/NS1-104 infiziert und die Phosphorylierung von PKR mittels Immunoblotanalyse untersucht (Abb. 3.35). Hierbei zeigte sich, dass die Infektion der Zellen mit dem B/NS1-104 Virus genauso wie die Infektion mit dem WT Virus nicht zur Phosphorylierung von PKR führte, während in B/ΔNS1 Virus infizierten Zellen eine PKR Phosphorylierung nachgewiesen wurde. Die RNA-Bindungsdomäne des B/NS1 Proteins scheint also für die Inhibition der PKR Aktivierung ausreichend zu sein.

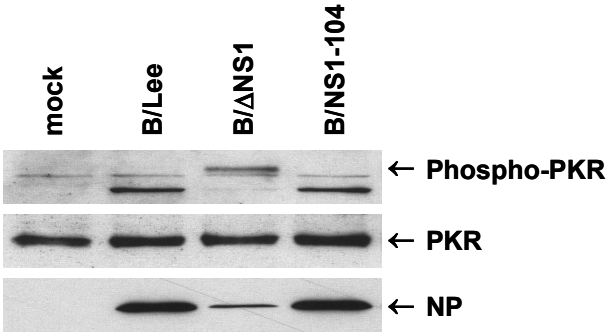


Abb. 3.35 Infektion mit der Virusmutante B/NS1-104 führt nicht zur Phosphorylierung der Proteinkinase R. A549 Zellen wurden Kontroll-behandelt oder mit B/Lee Virus, B/ΔNS1 Virus oder der Virusmutante B/NS1-104 mit einer MOI von 1 infiziert. Zellextrakte wurden 10h p. i. hergestellt, über ein 7,5%iges denaturierendes PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Immunoblot mit Antikörpern spezifisch für Phospho-PKR, PKR und virales NP analysiert.

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Arbeit konnte mit Hilfe einer revers-genetischen Analyse das Nichtstrukturprotein NS1 des Influenza B Virus als Antagonist der transkriptionellen Aktivierung des IFN-ß Gens identifiziert werden. Dazu wurde zunächst ein auf acht Plasmiden basierendes revers-genetisches System zur Herstellung von rekombinanten Influenza B Viren etabliert. Dies ermöglichte die Herstellung des B/NS1-defizienten B/ΔNS1 Virus. Der Verlust des B/NS1 Proteins hatte eine starke Attenuierung der Replikation des B/ΔNS1 Virus in IFN-kompetenten 11 Tage alten embryonierten Hühnereiern und MDCKII Zellen, aber auch in IFN-defizienten Vero Zellen zur Folge. Durch den Vergleich des B/ΔNS1 Virus mit dem isogenen rekombinanten WT Virus konnte gezeigt werden, dass das B/NS1 Protein die Virus-vermittelte Induktion des IFN-ß Gens inhibiert. Dies ließ sich auf die Blockade der Aktivierung des

entscheidenden Transkriptionsfaktors IRF-3 in Anwesenheit des B/NS1 Proteins zurückführen. Im Verlauf einer B/ΔNS1 Virus Infektion dagegen kam es zur Aktivierung der IRF-3 Kinase TBK-1, zur Phosphorylierung und Dimerisierung von IRF-3, Translokation von IRF-3 in den Nukleus und schließlich zur Assoziation von IRF-3 und dem Transkriptionsfaktor CBP.

Um die Bedeutung der dsRNA-Bindung für die IFN-Antagonisierung zu untersuchen, wurden rekombinante Influenza B Viren mit Mutationen in der N-terminalen RNA-Bindungsdomäne und eine Virusmutante mit C-terminal trunkiertem B/NS1 Protein (B/NS1-104) hergestellt. Die Charakterisierung der Virusmutanten ist in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

Tab. 3.4: Vergleich der Eigenschaften von WT Virus und den Virusmutanten

Virus	WT	ΔNS1	33/38	47/50	52/53/ 54	58/60/ 64	77/78	83/86	1-104
dsRNA-Bindung des B/NS1 Proteins[1]	+	-	+/-	-	+/-	-	-	+	+
Inhibition der IFN-α/ß Induktion[2]	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Inhibition der PKR Aktivierung[3]	+	-	-	-	+	-	-	+	+
Replikation (6 Tage alte Bruteier)[4]	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+
Replikation (11 Tage alte Bruteier)[4]	+	-	+/-	-	+	-	-	+	+
Replikation (MDCKII Zellen)[5]	+	-	-	-	+	-	-	+	+

1) +: wie WT, +/-: eingeschränkt, - : nicht nachweisbar (Donelan et al., 2004)
2) +: 100-70%, - : <70%
3) +: keine PKR-Phosphorylierung, - : PKR-Phosphorylierung
4) Virustiter (ffu/ml): +: 10^8-10^7, +/-: 10^6-10^5, - : <10^5
5) Virustiter (ffu/ml): +: 10^7-10^6, +/-: 10^5-10^3, - : <10^3

Viren, deren B/NS1 Proteine in der Bindung von dsRNA stark eingeschränkt waren, replizierten nur sehr schlecht in IFN-kompetenten Systemen. Die Virusmutante B/NS1-104 zeigte hingegen kaum Einschränkungen der Replikationskapazität in 11 Tage alten Bruteiern und geringe Einschränkungen in MDCKII Zellen. Der Verlust der dsRNA-Bindungsfähigkeit wirkte sich jedoch nur schwach auf die Inhibition des IFN-α/ß Induktion aus, wohingegen der Verlust der C-terminalen Domäne des B/NS1 Proteins eine starke Expression von IFN-α/ß in infizierten Zellen zur Folge hatte. Dies deutet darauf hin, dass die Inhibition der IFN-ß Induktion nicht allein von der dsRNA-Bindungsfähigkeit des B/NS1 Proteins beeinflusst wird, wie durch das dsRNA–

Sequestrierungsmodell postuliert, sondern möglicherweise durch Interaktionen des C-terminalen Teils des B/NS1 Proteins mit RIG-I oder anderen an diesem Signalweg beteiligten Proteinen vermittelt wird. Dagegen konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der dsRNA aktivierten Proteinkinase R durch das B/NS1 Protein von der dsRNA-Bindungsfähigkeit des B/NS1 Proteins abhängig ist. Der Verlust der C-terminalen Domäne hatte darauf keinen Einfluss. Interessanterweise korrelierte die Kapazität der B/NS1 Proteine, die Aktivierung der PKR zu verhindern, mit der Fähigkeit der rekombinanten Viren, in IFN-kompetenten Wirten effizient zu replizieren. Dies deutet an, dass in den untersuchten Wirten die Inhibition von PKR für die effiziente Replikation der Viren von größerer Bedeutung ist als die Inhibition der IFN-ß Induktion. Dieses Ergebnis ist unerwartet, da für Influenza A Viren die Attenuierung dsRNA-bindungsdefizienter Viren auf die Induktion von IFN-α/ß zurückgeführt wurde. Abschließend lässt sich sagen, dass die dsRNA-Bindung durch das B/NS1 Protein nicht entscheidend für die Inhibition der IFN-Induktion ist. Sie ist jedoch eine essentielle Voraussetzung für die Inhibition von PKR und um eine effiziente virale Replikation zu gewährleisten.

4. Diskussion

4.1 Übersicht über die Ziele der Arbeit

Die Auseinandersetzung von Viren mit dem angeborenen Immunsystem des Wirts ist mitentscheidend für den Verlauf einer Infektion. Daher sind IFN-antagonistische Proteine wichtige Determinanten viraler Virulenz. Obwohl bekannt ist, dass Influenza B Viren IFN-α/ß sensitiv sind (Smart & Kilbourne, 1966), gibt es bisher nur wenige Studien über das IFN-antagonistische Potential dieser Viren. Bislang war die Inhibition des antiviralen Proteins ISG15 sowie die Inhibition von PKR durch das B/NS1 Protein *in vitro* beschrieben worden (Wang & Krug, 1996, Yuan & Krug, 2001). Ein Einfluss auf die transkriptionelle Aktivierung von IFN-ß wurde jedoch kontrovers diskutiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb die Typ I IFN-antagonistischen Eigenschaften von Influenza B Viren vertieft charakterisiert. Mit der Konstruktion eines revers-genetischen Systems zur Herstellung rekombinanter Influenza B Viren wurde zunächst die Grundlage für die gezielte Manipulation viraler Gene geschaffen. Anhand eines B/NS1-defizienten Virus (B/ΔNS1) wurde die Bedeutung des B/NS1 Proteins für die Inhibition der IFN-α/ß Induktion und die Replikationsfähigkeit des Virus gezeigt. Durch die Charakterisierung weiterer rekombinanter Viren mit Mutationen in der N-terminalen RNA-Bindungsdomäne des B/NS1 Proteins sowie einer Virusmutante mit C-terminal trunkiertem B/NS1 Protein wurde die Bedeutung der dsRNA-Sequestrierung für die virale Replikation sowie für die Inhibition der IFN-α/ß Induktion und der PKR Aktivierung analysiert.

4.2 Etablierung eines revers-genetischen Systems für Influenza B Viren

In dieser Arbeit wurde zunächst ein revers-genetisches System für die Erzeugung rekombinanter Influenza B Viren etabliert. Vor Beginn dieser Arbeit war es nur in einigen Fällen gelungen, rekombinante Influenza B Viren mittels der RNP-Transfektionsmethode zu generieren (Barclay & Palese, 1995, Rowley et al., 1999). Deshalb wurde zunächst ein revers-genetisches System zu Erzeugung von Influenza B Viren allein von cDNA konstruiert, das auf dem bidirektionalen Plasmidsystem von

Hoffmann et al. basiert (Hoffmann et al., 2000). Entscheidend für die erfolgreiche Konstruktion des revers-genetischen Systems war die Auswahl der Oligonukleotidsequenzen zur reversen Transkription und Amplifikation der vRNA Segmente. Die Oligonukleotide überspannen die 3'- und 5'-terminalen Nukleotide der vRNA Segmente, die als Promotorstrukturen für den viralen Polymerasekomplex dienen. Werden durch die Oligonukleotide bei der RT-PCR Mutationen in diese Sequenzen eingeführt, kann sich dies negativ auf die Synthese von cRNA/vRNA und/oder mRNA auswirken (Lee & Seong, 1998, Li & Palese, 1992). Dies hätte eine erfolgreiche Generierung rekombinanter Viren verhindern können. Da nur geringe und zum Teil widersprüchliche Sequenzdaten der vRNA-Termini vorlagen, wurde die Sequenz der Oligonukleotide anhand von Konsensussequenzen ausgewählt, die aus verschiedenen Publikationen ermittelt wurden (Desselberger et al., 1980, Stoeckle et al., 1987, Yamashita et al., 1988). Die erfolgreiche Generierung der rekombinanten Influenza B/Lee Viren bestätigte die korrekte Auswahl der Oligonukleotidsequenzen, da das rekombinante WT Virus keine Einschränkung des Replikationsverhaltens gegenüber dem Ausgangsvirus zeigte. Beide Viren erreichten Titer um 1 x 10^8 ffu/ml in 6, 8 und 11 Tage alten Bruteiern. Dies stellte über die Sequenzierung der viralen cDNA hinaus sicher, dass durch RT-PCR und Subklonierung keine Mutationen in das virale Genom eingeführt wurden, die sich negativ auf die Replikationsfähigkeit auswirken. Im Verlauf der Etablierung dieses Systems zur Generierung rekombinanter Influenza B/Lee Viren, gelang zwei weiteren Arbeitsgruppen die Etablierung ähnlicher Systeme für Influenza B Viren (Hoffmann et al., 2002, Jackson et al., 2002).

4.3 Identifizierung des B/NS1 Proteins als IFN-Antagonist

Mittels des revers-genetischen Systems wurde das B/ΔNS1 Virus hergestellt, das aufgrund einer Deletion des B/NS1 Leserahmens kein B/NS1 Protein exprimiert. Durch die Charakterisierung dieser Virusmutante konnte erstmals gezeigt werden, dass das B/NS1 Protein die Virus-vermittelte Induktion des IFN-ß Gens verhindert. Dies stützt sich auf folgende experimentelle Ergebnisse: (1) Der Verlust des B/NS1 Protein führte zur Reduktion der viralen Replikationsfähigkeit in IFN-kompetenten Systemen. (2) Die Infektion mit dem B/ΔNS1 Virus, aber nicht mit dem isogenen WT Virus induzierte den IFN-ß Promotor in Reportergenstudien. (3) Die Induktion des IFN-ß Promotors konnte durch ektopische Expression des B/NS1 Proteins verhindert werden. (4) Die Infektion

mit dem B/ΔNS1 Virus aber nicht mit dem isogenen WT Virus führte zur Transkription von IFN-ß mRNA und zur Sekretion von IFN-ß. (5) Der für die IFN-ß Induktion entscheidende Transkriptionsfaktors IRF-3 wurde durch eine B/ΔNS1 Virus Infektion aktiviert, während dies in WT Virus infizierten Zellen durch das B/NS1 Protein verhindert wurde.

Das Replikationsverhalten des B/ΔNS1 Virus in verschiedenen Wirtssystemen gab den ersten Hinweis auf die Bedeutung des B/NS1 Proteins als IFN-Antagonist. Die höchsten Virustiter mit ca. 5 x 10^5 ffu/ml wurden in 6 Tage alten embryonierten Hühnereiern erzielt, die im Vergleich zu älteren Bruteiern durch ein unreifes IFN-System und geringe IFN-Induzierbarkeit gekennzeichnet sind (Isaacs & Baron, 1960, Morahan & Grossberg, 1970, Sekellick & Marcus, 1985). Die Reifung des IFN-Systems in 8 und 11 Tage alten Bruteiern führte zur drastischen Reduktion der Virustiter auf 3 x 10^3 bzw. unter 1 x 10^2 ffu/ml. Dies zeigt, dass das Replikationsvermögen des B/ΔNS1 Virus invers mit dem IFN-Status korreliert. Die multizyklische Replikation des B/ΔNS1 Virus in MDCKII Zellen, die über ein funktionelles IFN-System verfügen, bestätigte dieses Ergebnis. Durch den Verlust des B/NS1 Protein reduzierte sich der Virustiter des B/ΔNS1 Virus um mindestens 6 Log-Stufen im Vergleich zum WT Virus, was die Bedeutung des B/NS1 Proteins als IFN-Antagonist unterstützt.

Unerwartet war jedoch die im Vergleich zum WT Virus mindestens 3 Log-Stufen reduzierte Replikation der B/ΔNS1 Viren in Vero Zellen. Diese exprimieren kein Typ I IFN und unterstützen daher die Replikation von Viren, deren IFN-antagonistische Proteine ausgeschaltet wurden (Garcia-Sastre et al., 1998, He et al., 2002, Schlender et al., 2000). Dies wurde auch durch die gute Replikation des Influenza A/delNS1 Virus bestätigt, das mit einem Titer von ca. 5 x 10^6 ffu/ml nur 1 Log-Stufe unter dem Titer des isogenen WT Virus lag. Dieser Befund weist darauf hin, dass das B/NS1 Protein über die direkte Antagonisierung von IFN-ß hinaus für eine virale Funktion wichtig ist, die die virale Vermehrung auf andere Art unterstützt. Sowohl B/ΔNS1 Virus als auch A/delNS1 Virus Infektionen führen zur Aktivierung von IRF-3, das in der frühen Phase der IFN-Antwort sogenannte IFN-stimulierte Gene, wie zum Beispiel ISG15, ISG54 und ISG56, ohne Beteiligung von IFN-ß induziert (Bandyopadhyay et al., 1995, Grandvaux et al., 2002, Nakaya et al., 2001, Wathelet et al., 1992). Die antivirale Wirkung dieser Proteine hat möglicherweise einen stärkeren Einfluss auf die

Replikation der Influenza B Viren, als dies bei Influenza A Viren der Fall ist. Diese Vermutung wird gestützt durch die Tatsache, dass Influenza B Viren, aber nicht Influenza A Viren, über einen spezifischen Mechanismus verfügen, die antivirale Wirkung des ISG15 Proteins zu inhibieren. Die Konjugation von ISG15 an seine Zielproteine führt zu einer Verstärkung des Jak/STAT Signalweges und vermehrter Expression von ISGs (Malakhova et al., 2003) und kann virale Replikation inhibieren (Ritchie et al., 2004). Das B/NS1 Protein bindet ISG15 und verhindert die Konjugation von ISG15 an seine Zielproteine (Yuan & Krug, 2001). Der Verlust dieser Funktion könnte zur starken Einschränkung der Replikation der B/ΔNS1 Viren beitragen. Derzeit ist jedoch unklar, ob das ISG15-aktivierende Enzym UEB1L in Vero Zellen exprimiert wird oder wie in einigen Tumorzelllinien deletiert ist (McLaughlin et al., 2000).

Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass das B/NS1 Protein neben seiner Funktion als IFN-Antagonist eine wichtige Rolle bei der Replikation und/oder Transkription viraler Gene spielt. So führt die Expression von B/NS1 Protein während einer Infektion oder durch ektopische Expression zu Veränderungen der Struktur von SC35 Domänen („Speckles“). Diese Eigenschaft wird interessanterweise vom A/NS1 Protein nicht geteilt (Jana Schneider, unveröffentlichte Ergebnisse). Speckles sind dynamische Subkompartimente im Zellkern, die sich aus Spleißfaktoren, wie SC35 Protein, snRNPs, SR-Proteinen, sowie regulatorischen Kinasen und Phosphatasen konstituieren und auch mit Transkriptions-, Translationsfaktoren (eIF4E) und Strukturproteinen assoziiert sind. Sie dienen möglicherweise als Sammel- und/oder Verteilerstelle für die genannten Faktoren (Lamond & Spector, 2003). Das B/NS1 Protein kolokalisiert mit SC35 und bewirkt die Umgestaltung der SC35 Domänen von kleinen, unregelmäßig geformten Arealen zu großen, ballonartigen Strukturen (Jana Schneider, unv. Erg.). Für das B/NS1 Protein wurde zwar, im Gegensatz zum A/NS1 Protein, keine Inhibition des Spleißens zellulärer prä-mRNAs gezeigt (Wang & Krug, 1996). Dies schließt jedoch nicht aus, dass das B/NS1 Protein möglicherweise Komponenten der SC35-Domänen für virale Translation und Replikation vereinnahmt. Ein genereller Einfluss des B/NS1 Proteins auf virale Replikationsprozesse könnte auch für die geringen Virustiter selbst in 6 Tage alten Bruteiern verantwortlich sein. Dennoch zeigte die weitere Reduktion der viralen Replikation in IFN-kompetenten 11 Tage alten Bruteiern die Bedeutung der IFN-antagonistischen Eigenschaft des B/NS1 Proteins.

In einem nächsten Schritt konnte sowohl in Reportergenstudien als auch nach Infektion von A549 Zellen gezeigt werden, dass das B/NS1 Protein die Aktivierung des IFN-ß Promotors, die Transkription von IFN-ß mRNA und die Sekretion von IFN-ß während einer Influenza B Virus Infektion inhibiert. Der Unterschied der IFN-ß Induktion durch WT Virus und B/ΔNS1 Virus lag in der Größenordnung, die nach Infektionen mit dem A/delNS1 Virus, das als starker IFN-ß Induktor bekannt ist, und dem isogenen WT Virus beobachtet wird. Zudem konnte durch ektopische Expression des B/NS1 Proteins die Aktivierung des IFN-ß Promotors sowohl durch das B/NS1 Virus als auch durch das A/delNS1 Virus nahezu vollständig unterdrückt werden. Auch das A/NS1 Protein konnte die Aktivierung des IFN-ß Promotors durch beide Viren verhindern. Dies zeigt, dass die Fähigkeit zur Inhibition der IFN-ß Induktion zwischen den NS1 Proteinen der Influenza A und B Viren trotz der großen Sequenzunterschiede konserviert ist.

Um die Inhibition der IFN-ß Induktion durch das B/NS1 Protein genauer zu charakterisieren, wurde die Aktivierung des entscheidenden Transkriptionsfaktors IRF-3 während einer Influenza B Virus Infektion untersucht. Intrazelluläre dsRNA, die während einer viralen Infektion entsteht, wird durch die RNA-Helikasen RIG-I oder mda-5 erkannt, die daraufhin über FADD oder andere bislang unbekannte Proteine die ubiquitäre Proteinkinase TBK-1 oder die induzierbare Kinase IKK_{ε} aktivieren, welche wiederum den Transkriptionsfaktor IRF-3 phosphorylieren (Balachandran et al., 2004, Fitzgerald et al., 2003, McWhirter et al., 2004, Sharma et al., 2003). Dies führt zur Bildung von IRF-3 Dimeren, zur Translokation in den Nukleus und zur Assoziation mit dem Transkriptionskoaktiviator CBP, wodurch die Transkription des IFN-ß Gens induziert wird (Juang et al., 1998, Kim & Maniatis, 1997, Lin et al., 1998, Peters et al., 2002, Sato et al., 1998, Weaver et al., 1998, Yoneyama et al., 1998). In B/ΔNS1 infizierten Zellen konnte die Aktivierung von TBK-1, IRF-3 Phosphorylierung, Dimerisierung, nukleäre Translokation und Assoziation mit CBP nachgewiesen werden, während die beschriebene IRF-3 Aktivierung aufgrund der Anwesenheit des B/NS1 Proteins in WT Virus infizierten Zellen unterblieb. Auch die nukleäre Translokation von IRF-3 nach Stimulation mit dem A/delNS1 Virus konnte durch ektopische Expression des B/NS1 Proteins inhibiert werden. Dies zeigt, dass das B/NS1 Protein die Virus-vermittelte Aktivierung von IRF-3 verhindert. Da IRF-3 der entscheidende Faktor für die transkriptionelle Aktivierung des IFN-ß Gens ist, erklärt dies die sehr geringe Induktion des IFN-ß Gens während einer WT Virus Infektion. Damit steht das B/NS1

Protein in einer Reihe mit vielen anderen viralen IFN-antagonistischen Proteinen, wie z.B. dem A/NS1 Protein des Influenza A Virus, dem VP35 Protein des Ebola Virus oder den V Proteinen einiger Paramyxoviren, die ebenfalls die Aktivierung von IRF-3 und somit die transkriptionelle Aktivierung von IFN-ß im Verlauf der Virusinfektion verhindern (Andrejeva et al., 2004, Basler et al., 2003, Talon et al., 2000a).

Die hier demonstrierte Inhibition der IRF-3 Aktivierung durch das B/NS1 Protein steht scheinbar im Widerspruch zu einer Publikation von Kim et al., die eine Aktivierung von IRF-3 sowie die Expression der IRF-3-responsiven Gene ISG15 und ISG56 nach Infektion mit dem WT B/Lee/40 Virus beobachteten (Kim et al., 2002). Aus der Aktivierung von IRF-3 wurde gefolgert, dass auch WT Influenza B Virus Infektionen zur Expression von IFN-ß führen, dies wurde jedoch nicht mit experimentellen Daten belegt (Krug et al., 2003). Eine mögliche Erklärung dieser Ergebnisse, ist der Einfluss der bei den Versuchen verwendeten MOI. Eigene Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen eingesetzter MOI und Induktion des IFN-ß Promotors auf Reportergenebene. Während bei einer Infektion mit WT B/Lee/40 Virus mit einer MOI ≤ 1 der IFN-ß Promotor nur mäßig aktiviert wurde, führte die Steigerung der MOI auf 10 zu einer 5fach stärkeren Aktivierung (nicht gezeigte Daten). Da bei Kim et al. die eingesetzte MOI nicht nachvollziehbar ist, bzw. in einem Experiment eine MOI von 7 verwendet wurde, könnte die Aktivierung von IRF-3 auf die hohe MOI oder auch auf eine Viruspräparation mit einem hohen Anteil von d.i. Partikeln („defective interfering particles“) zurückzuführen sein. Zum einen könnte die sich daraus ergebende verstärkte Akkumulation von dsRNA zu einer unverhältnismäßig robusten IRF-3 Aktivierung führen, die durch das B/NS1 Protein nicht vollständig inhibiert werden kann. Hinzu kommt, dass die Aktivierung von IRF-3 zu einem sehr frühen Zeitpunkt, ca. 4h p.I. beobachtet wurde, zu dem erst geringe Mengen B/NS1 Protein in der Zelle verfügbar sind. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass durch die hohe MOI oder d.i. Partikel IRF-3 durch Signalwege aktiviert wird, die nicht durch das B/NS1 Protein inhibiert werden können. Denkbar wäre, dass solche Signalwege durch andere Viruskomponenten als dsRNA und unabhängig von viraler Replikation induziert werden, wie es für das Nukleokapsid Protein von Masernviren oder die RNPs des Vesikulären Stomatitis Virus beschrieben wurde (tenOever et al., 2002, tenOever et al., 2004). Weiterhin könnte allein durch den Eintritt einer hohen Anzahl von Viruspartikeln die Transkription von ISG56 induziert worden sein, wie es für UV-inaktivierte membranumhüllte Viren, wie Herpes Simplex Virus 1, Vaccinia Virus,

Newcastle Disease Virus oder Sendai Virus gezeigt wurde (Collins et al., 2004). Gestützt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass auch UV-inaktiviertes Influenza B Virus die Transkription von ISG56 mRNA induzierte (Kim et al., 2002). Es ist jedoch anzunehmen, dass die beschriebenen Vorgänge für die in dieser Arbeit analysierte IRF-3 Aktivierung und IFN-ß Induktion eine untergeordnete Rolle spielen, da bei den hier durchgeführten Experimenten eine MOI von 1 eingesetzt wurde. Diese Versuchsbedingungen könnten dazu führen, dass erst in einer späteren Phase des Replikationszyklus größere Mengen dsRNA als Auslöser der IFN-Antwort in der Zelle vorliegen (Majde, 2000), aber auch ausreichende Mengen B/NS1 Protein, um die Aktivierung von IRF-3 zu verhindern.

Zusammenfassend lässt sich daher festhalten, dass in dieser Arbeit durch den Vergleich der B/NS1 Deletionsmutante B/ΔNS1 mit dem WT Virus das B/NS1 Proteins als Antagonist der Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-3 und der darauf folgenden Induktion von IFN-ß identifiziert werden konnte.

4.4 Die dsRNA-Bindungskapazität des B/NS1 Proteins ist nicht ausschlaggebend für die Inhibition der IFN-ß Induktion aber essentiell für eine effiziente virale Replikation sowie die Inhibition der PKR Aktivierung

4.4.1 Die dsRNA-Bindungsfähigkeit des B/NS1 Protein ist nicht entscheidend für seine Eigenschaft als IFN-Antagonist

Wie beschrieben, zeigte die Analyse von IRF-3 in B/ΔNS1 und WT Virus infizierten Zellen, dass durch das B/NS1 Protein die TBK-1 vermittelt IRF-3 Aktivierung inhibiert wird. Für die Blockade der IRF-3 Aktivierung sind verschiedene Mechanismen vorstellbar. Zum einen könnte das B/NS1 Protein über Protein-Protein-Wechselwirkungen Faktoren der IRF-3 aktivierenden Signalkaskade inhibieren. Dies wurde zum Beispiel für das V Protein einiger Paramyxoviren, wie Simian Virus 5, Parainfluenza Virus 2, Mumps Virus, Sendai Virus und Hendra Virus, gezeigt. Das V Protein bindet das dsRNA-Sensorprotein, die RNA-Helikase mda-5, und verhindert die Initiation der Signalkaskade (Andrejeva et al., 2004). Das P Protein des Bornavirus blockiert einen späteren Schritt der Signalkaskade. Es bindet TBK-1 und inhibiert als

Pseudosubstrat die Phosphorylierung von IRF-3 (Unterstab et al., eingereicht). Zum anderen musste die Sequestrierung von dsRNA durch die NS1 Proteine als ein weiterer Wirkmechanismus in Betracht gezogen werden. Aufgrund der Bindung und Maskierung der dsRNA würde diese dann nicht von potentiellen dsRNA Sensorproteinen wie RIG-I oder mda-5 erkannt werden können und somit wäre die Initiation des Signalweges verhindert. Dieser Mechanismus wurde zur Erklärung der IFN-antagonistischen Eigenschaften des A/NS1 Proteins favorisiert (Wang et al., 2002, Wang et al., 2000).

Die Bedeutung der dsRNA-Sequestrierung für die IFN-antagonistische Eigenschaft des B/NS1 Protein wurde durch eine revers-genetische Analyse untersucht. Dazu wurden Gruppen basischer Aminosäuren in der N-terminalen RNA-Bindungsdomäne der B/NS1 Proteine der Viren mutiert. Die Mutation der Aminosäuren 47/50, 58/60/64 und 77/78 zu Alanin führt zu einem Verlust der dsRNA-Bindungsfähigkeit des B/NS1 Protein, während B/NS1 Proteine mit den Mutationen 33/38 und 52/53/54 einen intermediären Phänotyp aufweisen und die Mutationen 83/86 die dsRNA-Bindung nicht beeinträchtigt (Donelan et al., 2004). Erstaunlicherweise erwiesen sich alle Viren unabhängig von der dsRNA-Bindungskapazität ihrer B/NS1 Proteine als schwache Induktoren von IFN-ß, im Vergleich zum B/ΔNS1 Virus. Die dsRNA-Bindungskapazität der mutierten B/NS1 Proteine korrelierte also nicht mit der Fähigkeit, die IFN-ß Induktion zu inhibieren. Die RT-PCR-Analyse der IFN-ß Transkripte zeigte zwar eine Erhöhung der mRNA Menge durch die Virusmutanten, die mRNA Menge war insgesamt jedoch deutlich geringer als nach B/ΔNS1 Virus Infektion.

Während in den ELISA Experimenten noch eine schwache IFN-ß Sekretion nach Infektion mit den Virusmutanten nachgewiesen wurde, lag die Sekretion von IFN-α nach Infektion mit dem WT Virus und den dsRNA-Bindungsmutanten kaum über der IFN-α Sekretion Kontroll-behandelter Zellen. Dies könnte daran liegen, dass die IFN-ß Konzentration nach Infektion mit den Virusmutanten zu gering war, um die Expression von IRF-7 und darüber die transkriptionelle Aktivierung des IFN-α Gens zu induzieren. Möglicherweise kann das B/NS1 Protein aber auch unabhängig von seiner dsRNA-Bindungskapazität die Aktivierung von IRF-7 verhindern, ähnlich wie es für das A/NS1 Protein beobachtet wurde (Smith et al., 2001).
Neuere Untersuchungen deuteten auch für das A/NS1 Protein eine IFN-antagonistische Wirkung unabhängig von der dsRNA-Bindung an. Das NS1 Protein eines

rekombinanten Influenza A Virus war an den AS-Positionen R38/K41 mutiert worden und konnte dadurch weder dsRNA binden noch die IFN-ß Induktion inhibieren. Durch Mutation der AS 42 des A/NS1 Proteins wurde zwar nicht die dsRNA-Bindung, aber die IFN-antagonistische Eigenschaft wieder hergestellt (Donelan et al., 2003). Die AS R38 und K41 des A/NS1 Proteins entsprechen den AS R50 und R53 des B/NS1 Proteins, wie Strukturvergleiche der beiden Proteine ergaben (Yuan et al., 2002). Mutationen dieser AS finden sich in den hier beschriebenen Virusmutanten B/NS1 47/50 und B/NS1 52/53/54, die dsRNA nicht bzw. eingeschränkt binden, aber in ihrer IFN-ß Antagonisierung kaum beeinträchtigt sind. Zusammengenommen sprechen diese Ergebnisse gegen die dsRNA Sequestrierung als alleinigen Wirkmechanismus des B/NS1 Proteins.

Die Analyse der IRF-3 Aktivierung durch die Virusmutanten zeigte ein etwas komplexeres Bild. Die Infektion mit den Virusmutanten führte zur IRF-3 Homodimerisierung und bei dsRNA-bindungsdefizienten B/NS1 Proteinen zur Translokation in den Kern. IRF-3 wurde jedoch in keinem der Fälle hyperphosphoryliert und zeigte nur eine sehr geringe Komplexbildung mit CBP, was zur Folge hatte, dass das IFN-ß Gen durch keine der Virusmutanten vergleichbar stark induziert wurde, wie durch das B/ΔNS1 Virus. Diese Ergebnisse sind zunächst unerwartet, da die funktionelle Aktivität von IRF-3 nach Phosphorylierung durch die Kinasen TBK-1 und IKKε (Fitzgerald et al., 2003, Sharma et al., 2003) bislang gleichgesetzt wurde mit der sequentiellen Abfolge von IRF-3 Homodimerisierung, nukleärer Translokation und Komplexbildung mit CBP (Lin et al., 1998, Lin et al., 1999, Servant et al., 2001, Suhara et al., 2002). Die Beobachtung, dass IRF-3 nach Infektion mit dsRNA-bindungsdefizienten Virusmutanten zwar dimerisierte und in den Kern translozierte, aber kaum mit CBP assoziierte und nur in einem geringen Maß transkriptionell aktiv war, deutet darauf hin, dass IRF-3 nicht vollständig aktiviert wurde. Auch die fehlende Hyperphosphorylierung nach Infektion mit den Virusmutanten ist ein Zeichen für eine nur partielle Aktivierung, während die Infektion mit dem B/NS1 Virus die Hyperphosphorylierung von IRF-3 induzierte. Vorstellbar wäre, dass die Inhibition eines frühen Schrittes der IRF-3 Aktivierung durch das B/NS1 Protein von dessen dsRNA-Bindungsfähigkeit abhängt, während ein weiterer Schritt, der zur vollständigen Aktivierung von IRF-3 führt, durch das B/NS1 Protein unabhängig von seiner dsRNA-Bindungsfähigkeit inhibiert wird.

Neuste Befunde lassen vermuten, dass die Aktivierung von IRF-3 tatsächlich komplexer ist, als bisher angenommen wurde. IRF-3 besitzt verschiedene potentielle Phosphorylierungsstellen, von denen sieben für die transkriptionelle Aktivität infolge Virusinfektion oder dsRNA-Behandlung von Bedeutung sind. Ser385 und Ser386 sind Teil eines SSL Motivs und werden auch als Gruppe I bezeichnet, Gruppe II umfasst Ser396, Ser398, Ser402, Thr404 und Ser405. Die Interpretation von Ergebnissen wird weiter erschwert, weil der Zusammenhang zwischen spezifischer Phosphorylierung und Aktivierung bisher nicht vollständig geklärt ist. In unterschiedlichen Publikationen führte sowohl die Mutation der Gruppe I als auch der Gruppe II zu Alanin zur Blockade der IRF-3 Aktivierung, während der Austausch der Gruppe II zu phosphomimetischem Aspartat ein dominant aktives IRF-3 generierte (Lin et al., 1998, Lin et al., 1999, Servant et al., 2001, Yoneyama et al., 1998). Als Ziel für die Kinasen TBK-1 und IKK_{ε} scheinen vor allem die AS der Gruppe II von Bedeutung zu sein (McWhirter et al., 2004). Als minimal nötige Phosphorylierungstelle für die Aktivierung von IRF-3 durch TBK-1 wurden in unterschiedlichen Arbeiten Ser396 bzw. Ser386 identifiziert (Mori et al., 2004, Servant et al., 2003). Interessanterweise wurde die Phosphorylierung von Ser396 durch TBK-1 auch bei blockierter PI3-Kinase detektiert. Die Phosphorylierung von Ser386 war aber vom PI3 Kinase Signalweg abhängig. Studien von Erhardt et al. zeigten außerdem, dass auch die RhoGTPase Rac1 und die Kinase PAK1 an der Virus-vermittelten Aktivierung von IRF3 beteiligt sind. Die Expression von dominant-negativem Rac1 oder PAK1 beeinträchtigten die Phosphorylierung, Dimerisierung und CBP-Interaktion von IRF-3 und inhibierten die Induktion eines IRF-3-responsiven Promotors oder des IFN-ß Promotors (Ehrhardt et al., 2004).

Sarkar et al. postulierten kürzlich einen zwei- oder mehrstufigen Mechanismus zur IRF-3 Aktivierung (Sarkar et al., 2004). Der durch extrazelluläre dsRNA initiierte Signalweg über TLR3, TRIF und TBK-1 führte in Zellen, in denen die PI3-Kinase blockiert war, zwar zur Homodimerisierung und nukleären Translokation von IRF-3, aber nicht zur Assoziation mit CBP und transkriptionellen Aktivierung von IFN-ß und ISG56. Den dafür nötigen Phosphorylierungsstatus erreichte IRF-3 nur durch die zusätzliche Aktivierung über den TLR3/PI3-Kinase/Akt Signalweg. Die Analyse der IRF-3 Aktivierung während einer SARS-Coronavirus Infektion gibt ebenfalls Hinweise auf eine zweistufige IRF-3 Aktivierung. In der frühen Phase der Infektion kam es zur vorübergehenden nukleären Translokation von IRF-3, ohne dass Hyperphosphorylierung, Homodimerisierung oder CBP-Assoziation beobachtet wurden

(Spiegel et al., 2005). Auch das IFN-antagonistische ML Protein des Thogoto Virus verhindert die Virus-vermittelte Dimerisierung von IRF-3 und die Interaktion mit CBP, aber nicht dessen nukleäre Translokation (Jennings et al., 2005). Möglicherweise spielen die Blockade des PI3 Kinase Akt Signalwegs, des Signalwegs über Rac1 und PAK1 oder anderer noch unbekannter Kinasen durch das B/NS1 Protein auch bei der Inhibition der IRF-3 Aktivierung während einer Influenza B Viren Infektion eine zusätzliche Rolle.

Die Analyse der Virusmutanten legt nahe, dass das B/NS1 Protein sowohl durch dsRNA-Bindung als auch unabhängig von seiner dsRNA-Bindungsfähigkeit unterschiedliche Phasen der IRF-3 Aktivierung inhibiert. Für die Inhibition der IFN-α/ß Induktion durch das B/NS1 Protein ist die dsRNA-Sequestrierung jedoch nicht ausschlaggebend. Weitere experimentelle Belege für diese Hypothese lieferte die Charakterisierung eines Influenza B Virus mit C-terminal trunkiertem B/NS1 Protein (B/NS1-104). Die Infektion mit dem B/NS1-104 Virus führte zu einer sehr starken Induktion von IFN-α/ß. Die dsRNA-Bindungsdomäne des trunkierten B/NS1 Proteins ist also nicht in der Lage, die IFN-α/ß Induktion zu verhindern. Die nach B/NS1-104 sezernierte IFN-ß Menge lag sogar höher als nach B/ΔNS1 Infektion. Dies könnte auf die bessere Replikation des B/NS1-104 Virus zurückzuführen sein, die zu einer stärkeren Synthese von dsRNA führt. Möglicherweise wird aber auch mehr IFN-ß translatiert, da das trunkierte B/NS1 Protein die Aktivierung von PKR und damit eine Blockade der Translation in der späten Phase des Replikationszyklus verhindert.

Es ist nicht anzunehmen, dass die dsRNA-Bindungsfähigkeit des B/NS1 Proteins durch den Verlust der C-terminalen Domäne beeinträchtigt wird (Donelan et al., 2004). Die N-terminalen 103 AS des B/NS1 Proteins sind ausreichend für seine Dimerisierung, welche eine Voraussetzung für seine dsRNA-Bindungsfähigkeit sind (Wang & Krug, 1996, Wang et al., 1999). Für ein trunkiertes A/NS1 Protein wurde zwar eine eingeschränkte dsRNA-Bindung *in vivo* aufgrund schwächerer Dimerisierung postuliert (Wang et al., 2002), dies ist jedoch nicht ohne weiteres auf das B/NS1 Protein übertragbar. Ein weiterer Hinweis auf die gute dsRNA-Bindungskapazität des B/NS1 Proteins ist, dass das trunkierte B/NS1 Protein die Aktivierung von PKR in infizierten Zellen inhibiert. Diese Eigenschaft ist, wie später diskutiert, von der dsRNA-Bindungsfähigkeit des B/NS1 Proteins abhängig.

In zwei Studien mit Influenza A Viren mit C-terminal trunkierten A/NS1 Proteinen wurde die erhöhte IFN-Induktion durch die verringerte Stabilität der trunkierten A/NS1 Proteine erklärt (Quinlivan et al., 2005, Solorzano et al., 2005). Die metabolische Markierung infizierter Zellen mit dem B/NS1-104 Virus und dem WT Virus zeigte jedoch keine Einschränkung der Expressionsstärke des trunkierten B/NS1 Proteins.

Eine weitere Ursache für die hohe IFN-ß Induktion durch das B/NS1-104 Virus könnte die Aktivierung von ISG15 sein. ISG15 wird während einer Influenza B Virus Infektion und durch IFN-ß induziert. Die Konjugation von ISG15 an seine Zielproteine führt zu einer Verstärkung des Jak/STAT Signalweges und vermehrter Expression von ISGs (Malakhova et al., 2003). Das B/NS1 Protein bindet ISG15 und verhindert dadurch diese Konjugationsprozesse (Yuan & Krug, 2001). Für die ISG15 Bindung sind Bereiche der N-terminalen 103 AS notwendig, für die Inhibition der ISG15 Konjugation ist der Bereich bis AS 145 des B/NS1 Proteins nötig (Yuan et al., 2002). Der Vergleich eines rekombinanten Influenza B Virus B/NS1-162 mit einem trunkierten B/NS1 Protein von 162 AS Länge mit dem B/NS1-104 Virus zeigte jedoch, dass beide Viren vergleichbare Mengen IFN-α/ß induzieren (nicht gezeigt). Dies lässt vermuten, dass die Inhibition von ISG15 in diesem Fall keinen Einfluss auf die IFN-α/ß Induktion hat.

Interessanterweise konnte in Reportergenstudien durch ektopische Expression sowohl des N-terminalen Teils (AS 1-93) als auch des C-terminalen Teils (AS 94-281), der kaum dsRNA binden kann, die Induktion des IFN-ß Promotors inhibiert werden (Donelan et al., 2004). Dies stützt die These, dass der C-terminale Teil IFN-antagonistisches Potential besitzt. Unklar ist jedoch, warum der N-terminale Teil auf Reportergenebene aber nicht im viralen Kontext die IFN-ß Induktion inhibiert. Möglicherweise liegt dies daran, dass in der Reportergenstudie Sendai Virus als Stimulus benutzt wurde oder dass das B/NS1-104 Virus aufgrund seiner guten Replikationsfähigkeit als stärkerer Induktor wirkt.
Zusammengenommen sprechen diese Ergebnisse gegen die dsRNA Sequestrierung als alleinigen Wirkmechanismus des B/NS1 Proteins und deuten auf eine Beteiligung des C-terminalen Teils des B/NS1 Proteins bei der IFN-Antagonisierung hin. Für diesen Mechanismus spielen wahrscheinlich Protein-Protein Interaktionen eine wichtige Rolle.

4.4.2 Die dsRNA-Bindungsfähigkeit des B/NS1 Proteins ist essentiell für die effiziente Replikation von Influenza B Viren und nötig für die Inhibition der Proteinkinase R

Im Zuge der Charakterisierung der dsRNA-Bindungsmutanten und der Virusmutante B/NS1-104 wurde auch die Replikation dieser Viren analysiert. Da der Verlust der dsRNA-Bindungsfähigkeit des B/NS1 Proteins sich kaum auf dessen IFN-antagonistische Eigenschaft ausgewirkt hatte, war die starke Attenuierung der dsRNA-bindungsdefizienten Viren in IFN-kompetenten Wirten ein unerwartetes Ergebnis. Der Vergleich der Replikationsfähigkeit in 6 Tage alten Bruteiern, deren IFN-System noch nicht ausgereift ist und IFN-kompetenten 11 Tage alten Bruteiern und MDCK Zellen zeigte eine klare Korrelation zwischen dsRNA-Bindungskapazität der B/NS1 Proteine und Replikation der rekombinanten Viren in IFN-kompetenten Systemen. Überraschend war auch, dass die Virusmutante B/NS1-104, die sich als ein noch stärkerer IFN-Induktor als das B/ΔNS1 Virus erwiesen hatte, sowohl in 6 als auch in 11 Tage alten Bruteiern ähnlich gut wie das WT Virus replizierte. Auf die multizyklische Replikation in MDCKII Zellen wirkte sich die hohe IFN-α/ß Induktion etwas stärker aus. Hier waren die Virustiter um ca. 1-2 Log-Stufen gegenüber dem WT Virus eingeschränkt. Diese Reduktion der Virustiter war aber dennoch weit geringer, als die starke IFN-Produktion vermuten ließ. Das trunkierte B/NS1 Protein, das dsRNA bindet, ermöglichte also eine gute Replikation des B/NS1-104 Virus, während der Verlust der dsRNA-Bindungsfähigkeit zu einer starken Attenuierung der entsprechenden B/NS1 Virusmutanten in IFN-kompetenten Systemen führte. Diese Ergebnisse zeigten deutlich, dass die dsRNA-Bindung durch das B/NS1 Protein essentiell für eine effiziente virale Replikation ist.

Auf der Suche nach möglichen Ursachen für die Attenuierung der dsRNA-bindungsdefizienten Virusmutanten wurde die Aktivierung der Proteinkinase R analysiert. PKR wird durch dsRNA aktiviert, was zur Autophosphorylierung und zur Phosphorylierung des Translationsinitiationsfaktors eIF2α führt. Dies inhibiert die Translation sowohl zellulärer als auch viraler Proteine und beeinträchtigt dadurch die virale Replikation (Samuel, 2001). Bislang gab es nur einen indirekten Hinweis, dass das B/NS1 Protein die Aktivierung der PKR verhindert, da eine dsRNA induzierte Blockade der *in vitro* Translation durch das B/NS1 Protein verhindert wurde (Wang &

Krug, 1996). In dieser Arbeit konnte nun erstmals gezeigt werden, dass das B/NS1 Protein die Aktivierung von PKR auch im Verlauf einer Infektion inhibiert. Die Immunoblotanalysen infizierter Zellen zeigten dabei eine deutliche Korrelation zwischen der dsRNA-Bindungsfähigkeit der B/NS1 Proteine und der Fähigkeit die Phosphorylierung von PKR und seinem Substrat eIF2α zu verhindern. Die durch die Phosphorylierung von eIF2α induzierte Blockade der zellulären Translation könnte ein Grund für die eingeschränkte Replikation der dsRNA-bindungsdefizienten Viren sein. Der Verlust der C-terminalen Domäne des B/NS1 Proteins hatte keinen Einfluss auf die Inhibition der PKR Aktivierung.

Erstaunlicherweise konnte in den B/ΔNS1 Virus infizierten Zellen zwar eine deutliche Phosphorylierung von PKR gezeigt werden, im Gegensatz zu Zellen, die mit den dsRNA-bindungsdefizienten Virusmutanten infiziert worden waren, war jedoch keine Phosphorylierung von eIF2α nachweisbar. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die hohe IFN-ß Sekretion Phosphatasen induziert, die eIF2α dephosphorylieren.

Das B/NS1 Protein zeigt hier funktionelle Gemeinsamkeiten zum NS1 Protein der Influenza A Viren, das ebenfalls abhängig von seiner dsRNA-Bindungskapazität die Aktivierung von PKR inhibieren kann, wie Experimente mit Temperatur-sensitiven Influenza A Virusmutanten zeigten (Hatada et al., 1999). Überdies ist es weiterhin möglich, dass das B/NS1 Protein abhängig von seiner dsRNA-Bindungsfähigkeit, auch andere dsRNA-aktivierte antivirale Faktoren wie das 2',5'-Oligoadenylatsynthetase/ RNaseL-System inhibiert. Dies könnte in zukünftigen Studien untersucht werden.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die dsRNA-Bindung durch das B/NS1 Protein nötig ist für die Inhibition von PKR und möglicherweise weiterer dsRNA-aktivierter antiviraler Proteine und dadurch eine effiziente virale Replikation unterstützt.

4.4.3 Bedeutung der antiviralen Wirkung von IFN-α/ß und PKR

Der Vergleich von IFN-α/ß Antagonisierung und PKR Inhibition durch die B/NS1 Proteine der verschiedenen Virusmutanten erlaubt eine erste Einschätzung der Bedeutung dieser Eigenschaften. Die direkte Korrelation von dsRNA-Bindungskapazität des B/NS1 Protein, Inhibition der PKR Aktivierung durch das

B/NS1 Protein und Replikationsfähigkeit der Virusmutanten in 11 Tage alten Bruteiern und MDCKII Zellen verdeutlicht den starken Einfluss der antiviralen Wirkung von PKR. Dem gegenüber steht die, trotz starker IFN-α/ß Induktion, gute Replikation des B/NS1-104 Virus in 11 Tage alten Eiern und etwas stärker eingeschränkte Replikation in MDCKII Zellen. Dies deutet an, dass die IFN-α/ß Sekretion abhängig vom Wirtssystem die virale Replikation nur eingeschränkt hemmt. Die virale Replikation in den genannten Wirtssystemen lässt natürlich nur bedingte Rückschlüsse auf die Verhältnisse in Versuchstieren oder während einer natürlichen Infektion im Menschen zu. Es ist anzunehmen, dass eine hohe IFN-α/ß Sekretion sich aufgrund der immunmodulatorischen Wirkung hier stärker auf die Replikation und Virulenz des Virus auswirken würde. Genauere Informationen bieten Infektionsversuche mit PKR-, IFNAR- oder STAT1-Knock-out Mäusen. Infektionsversuche mit Influenza A Viren zeigten, dass das in WT Mäusen avirulente A/delNS1 Virus sowohl in $PKR^{0/0}$-Mäusen als auch in $STAT1^{0/0}$-Mäusen einen deutlich virulenteren Phänotyp zeigte und die Virustiter in den Lungen der Knock-out Mäuse gegenüber den WT Mäusen um ca. 4 Log-Stufen erhöht waren (Bergmann et al., 2000, Garcia-Sastre et al., 1998). Entsprechende Versuche mit den verschiedenen Influenza B Virusmutanten würden eine genauere Differenzierung der antiviralen Wirkung von IFN-α/ß und PKR erlauben.

4.5 Ausblick

Die Identifikation des B/NS1 Proteins als Antagonist der antiviralen IFN-Antwort bedeutet einen wichtigen Schritt zum Verständnis der Auseinandersetzung von Influenza B Viren mit dem Immunsystem ihres Wirts.

Die Analyse struktureller und funktioneller Eigenschaften des B/NS1 Proteins zeigte, dass die Induktion von IFN-α/ß nicht durch Sequestrierung von dsRNA sondern wahrscheinlich über den C-terminalen Teil des B/NS1 Proteins inhibiert wird. Es ist vorstellbar, dass die IFN-antagonistische Funktion des B/NS1 Proteins möglicherweise durch Interaktion mit dsRNA-Sensorproteinen, wie RIG-I oder mda-5, oder anderen Faktoren der IFN-α/ß induzierenden Signalkaskade vermittelt wird. Ähnliche Mechanismen wurden bereits für die V Proteine einiger Paramyxoviren gezeigt, die die RNA-Helikase mda-5 binden und so die Initiation der Signalkaskade verhindern

(Andrejeva et al., 2004) oder das P Protein des Bornavirus, das TBK-1 bindet und als Pseudosubstrat die Phosphorylierung von IRF-3 inhibiert (Unterstab et al., im Druck). Die Identifikation eines solchen zellulären Interaktionspartners wäre ein wichtiger Schritt bei der molekularen Entschlüsselung der durch das B/NS1 Protein vermittelten Inhibition der transkriptionellen Aktivierung von IFN-α/ß.

Eine Eigenschaft der Influenza B Viren, die sie von Influenza A Viren unterscheidet, ist ihr enges Wirtspektrum, das auf Menschen und eventuell auch Seehunde beschränkt ist. Diese Wirtsspezifität wurde mit dem M1 Proteins in Verbindung gebracht, da die Mutation des M1 Proteins eine gesteigerte Virulenz des Virus in Mäusen bewirkte (McCullers et al., 2005). Es wäre daher interessant zu untersuchen, ob auch eine mangelnde Inhibition des IFN-Systems in nichthumanen Wirten zum engen Wirtsspektrum beiträgt. Eine Determinante der Speziesspezifität könnte dabei die Interaktion des B/NS1 Proteins mit einem Faktor innerhalb der IFN-α/ß Signalkaskade sein. Ein erster experimenteller Ansatz zur Identifikation einer speziesspezifischen IFN-Antagonisierung durch das B/NS1 Protein, wäre der Austausch des B/NS1 Proteins des rekombinanten Influenza B/Lee Virus, das im Gegensatz zu den meisten Influenza B Viren für Mäuse pathogen ist, gegen B/NS1 Proteine anderer nicht mauspathogener Influenza B Virusstämme.

Die starke Attenuierung des B/ΔNS1 Virus und der dsRNA-bindungsdefizienten Virusmutanten in IFN-kompetenten Systemen verdeutlicht die Bedeutung des B/NS1 Proteins als entscheidender Virulenzfaktor. Dies macht die Manipulation des B/NS1 Proteins zu einer erfolgversprechenden Strategie zur Entwicklung attenuierter Lebendimpfstoffe (Talon et al., 2000b). Dabei scheint vor allem die Proteinkinase R für die Attenuierung der Virusmutanten zumindest in Bruteiern und auf Zellkulturebene verantwortlich zu sein. Infektionsversuche in Mäusen könnten eine bessere Differenzierung der relativen antiviralen Wirkung von PKR und IFN-α/ß Sekretion ermöglichen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die dsRNA-Bindung für die PKR Inhibition bzw. die C-terminale Domäne des B/NS1 Proteins für die Inhibition der IFN-α/ß Sekretion nötig ist. Diese Erkenntnisse lassen sich nutzen, um über gezielte Manipulation dieser Eigenschaften Virusmutanten herzustellen, die sowohl in ihrer Replikation eingeschränkt sind als auch die Sekretion von IFN-α/ß und möglicherweise auch anderen immunmodulatorischen Zytokinen (z.B. IL-6) induzieren. Ein solches Influenza B Virus wäre ein geeigneter Kandidat für einen Lebend-Impfstoff, da die

Sekretion von IFN-α/ß ein wichtiger Induktor einer starken adaptiven Immunantwort ist. Erste Immunisierungen von Balb/c-Mäusen mit B/ΔNS1 Viren induzierte eine gute Antikörperantwort und schützten vor letalen Infektionen mit dem isogenen WT Virus (N. Donelan, pers. Mitteilung). Die Erzeugung großer Mengen B/ΔNS1 Virus ist jedoch sehr aufwendig, da die Replikation sogar in Vero Zellen und 6 Tage alten Bruteiern stark attenuiert ist. Ein Influenza B Virus mit trunkiertem B/NS1 Protein und eingeschränkter dsRNA-Bindungsfähigkeit könnte vergleichbar gute Ergebnisse bei der Immunisierung erzielen. Um die Anzucht größerer Virusmengen zu verbessern, könnten Zelllinien etabliert werden, deren PKR Expression eingeschränkt ist oder deren PKR nicht funktionell ist. Ähnliche Strategien für die Generierung attenuierter Influenza A Viren brachten ebenfalls bereits gute Resultate. So zeigten Schweine-Influenza A Viren mit C-terminal trunkierten A/NS1 Proteinen eine geringe Pathogenität aber induzierten gute Antikörpertiter (Quinlivan et al., 2005). Auch die Infektion von Mäusen mit Influenza A Viren mit C-terminal trunkierten A/NS1 Proteinen erzeugte einen gute Immunität gegenüber den WT Viren (Egorov et al., 1998, Ferko et al., 2004, Talon et al., 2000b, Wang et al., 2002). Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die IFN-antagonistischen Eigenschaften des B/NS1 Protein bilden gute Voraussetzungen für die Analyse der Wirtsspezifität der Influenza B Viren oder die Entwicklung attenuierter Lebendimpfstoffe.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte das NS1 Protein des Influenza B Virus als Antagonist der zellulären IFN-α/ß Antwort identifiziert werden. Die Grundlage dafür lieferte die erfolgreiche Konstruktion eines Plasmid-gestützten revers-genetischen Systems zur Herstellung rekombinanter Influenza B Viren. Der Vergleich des so generierten WT Influenza B/Lee Virus mit dem B/ΔNS1 Virus, dessen B/NS1 Leserahmen deletiert ist und das somit kein B/NS1 Protein exprimiert, brachte folgende Ergebnisse. (1) Die Anwesenheit des B/NS1 Proteins verhinderte die Induktion der IFN-α/ß Gene während einer Influenza B Virus Infektion, so dass in der Folge kein IFN-α/ß sezerniert wurde. (2) Die Inhibition der IFN-ß Induktion ließ sich darauf zurückführen, dass das B/NS1 Protein die Aktivierung des entscheidende Transkriptionsfaktors IRF-3 während der Infektion verhinderte. (3) Das B/NS1 Protein inhibiert darüber hinaus die Aktivierung der antiviralen dsRNA-abhängigen Proteinkinase R. (4) Der Verlust des B/NS1 Proteins führte zu einer sehr starken Attenuierung des B/ΔNS1 Virus in IFN-kompetenten Wirten. Die Summe dieser Eigenschaften demonstriert die Bedeutung des B/NS1 Proteins als entscheidende Determinante der biologischen Fitness von Influenza B Viren.

Zur Analyse der strukturellen und funktionellen Voraussetzungen für die IFN-antagonistische Funktion des B/NS1 Proteins wurden weitere Influenza B Viren mit Mutationen im B/NS1 Protein generiert. Die Charakterisierung der Virusmutanten zeigte, dass die dsRNA-Bindung durch das B/NS1 Protein nicht entscheidend für die Inhibition der IFN-α/ß Induktion ist. Der Verlust der C-terminalen Domäne des B/NS1 Proteins führte dagegen zu einer drastischen Reduktion der IFN-α/ß-inhibitorischen Funktion. Die Inhibition der IN-α/ß Induktion durch das B/NS1 Protein scheint also nicht vornehmlich auf die Sequestrierung von dsRNA zurückzuführen zu sein, wie es für das IFN-antagonistische NS1 Protein der Influenza A Viren angenommen wird. Vielmehr deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Inhibition der IFN-α/ß Induktion durch Interaktionen der C-terminalen Domäne des B/NS1 Proteins mit dsRNA-Sensorproteinen, wie RIG-I und/oder mda-5, oder anderen Faktoren der IFN-α/ß induzierenden Signalkaskade vermittelt werden könnte (Abb. 5.1).

Im Gegensatz zur IFN-α/ß Induktion zeigte sich eine direkte Korrelation von dsRNA-Bindungskapazität des B/NS1 Protein, Replikationsfähigkeit der Virusmutanten in IFN-kompetenten Wirten und Inhibition der PKR Aktivierung durch das B/NS1 Protein. Die Abhängigkeit der Replikation von der dsRNA-Bindungsfähigkeit des B/NS1 Proteins war zunächst ein überraschender Befund, da alle Virusmutanten nur schwach IFN-α/ß induziert hatten. Die Attenuierung der dsRNA-bindungsdefizienten Virusmutanten lässt sich jedoch durch die Aktivierung von PKR erklären, da PKR die zelluläre Translationsmaschinerie blockiert und damit auch die virale Replikation beeinträchtigen kann. Dem gegenüber steht die trotz starker IFN-α/ß Induktion gute Replikation des Influenza B Virus mit C-terminal trunkiertem B/NS1 Protein, da PKR hier nicht aktiviert wurde (Abb. 5.1).

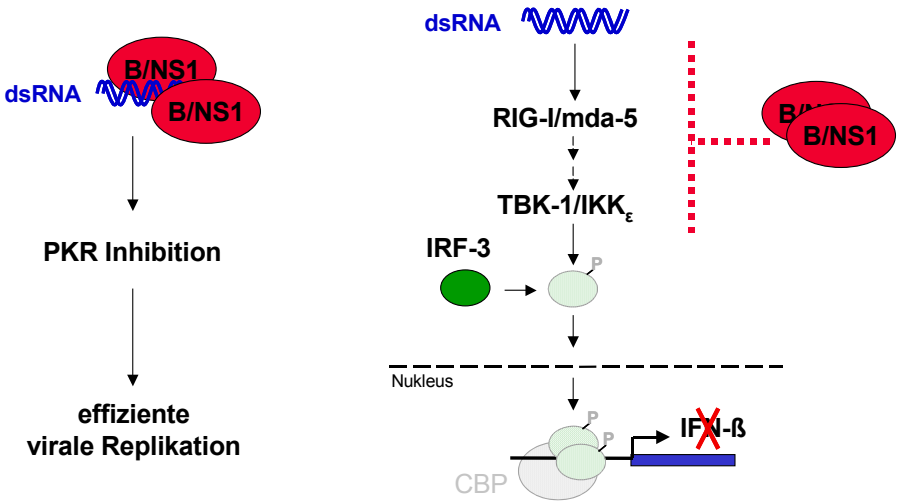


Abb. 5.1: Die dsRNA-Bindung durch das B/NS1 Protein ist notwendig für die Inhibition der PKR und eine effiziente virale Replikation aber nicht für die IFN-ß Antagonisierung

Diese Ergebnisse verdeutlichen den starken Einfluss der antiviralen Wirkung von PKR zur Kontrolle von Influenza B Virus Infektionen in den hier verwendeten Wirtssystemen. Es ist jedoch anzunehmen, dass eine hohe IFN-α/ß Sekretion die virale Replikation in Versuchstieren oder während einer natürlichen Infektion im Menschen deutlicher beeinflusst, da die immunmodulatorischen Wirkung von IFN-α/ß hier stärker zum tragen kommt. Die gezeigte Differenzierung der strukturellen Grundlagen für die Funktionen des B/NS1 Proteins bietet eine gute Voraussetzungen für die Entwicklung von Influenza B Viren als Lebend-Impfstoffe, die sowohl in ihrer Replikation eingeschränkt sind als auch die Sekretion von IFN-α/ß zur Aktivierung der Immunantwort induzieren können.

6. Literaturverzeichnis

Andrejeva, J., Childs, K. S., Young, D. F., Carlos, T. S., Stock, N., Goodbourn, S. & Randall, R. E. (2004). The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 17264-9.

Aragon, T., de la Luna, S., Novoa, I., Carrasco, L., Ortin, J. & Nieto, A. (2000). Eukaryotic translation initiation factor 4GI is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus. *Mol Cell Biol* **20**, 6259-68.

Balachandran, S., Thomas, E. & Barber, G. N. (2004). A FADD-dependent innate immune mechanism in mammalian cells. *Nature* **432**, 401-5.

Bandyopadhyay, S. K., Leonard, G. T., Jr., Bandyopadhyay, T., Stark, G. R. & Sen, G. C. (1995). Transcriptional induction by double-stranded RNA is mediated by interferon-stimulated response elements without activation of interferon-stimulated gene factor 3. *J Biol Chem* **270**, 19624-9.

Barchet, W., Cella, M., Odermatt, B., Asselin-Paturel, C., Colonna, M. & Kalinke, U. (2002). Virus-induced interferon alpha production by a dendritic cell subset in the absence of feedback signaling in vivo. *J Exp Med* **195**, 507-16.

Barclay, W. S. & Palese, P. (1995). Influenza B viruses with site-specific mutations introduced into the HA gene. *J Virol* **69**, 1275-9.

Basler, C. F., Mikulasova, A., Martinez-Sobrido, L., Paragas, J., Muhlberger, E., Bray, M., Klenk, H. D., Palese, P. & Garcia-Sastre, A. (2003). The Ebola virus VP35 protein inhibits activation of interferon regulatory factor 3. *J Virol* **77**, 7945-56.

Basler, C. F., Reid, A. H., Dybing, J. K., Janczewski, T. A., Fanning, T. G., Zheng, H., Salvatore, M., Perdue, M. L., Swayne, D. E., Garcia-Sastre, A., Palese, P. & Taubenberger, J. K. (2001). Sequence of the 1918 pandemic influenza virus nonstructural gene (NS) segment and characterization of recombinant viruses bearing the 1918 NS genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2746-51.

Basler, C. F., Wang, X., Muhlberger, E., Volchkov, V., Paragas, J., Klenk, H. D., Garcia-Sastre, A. & Palese, P. (2000). The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12289-94.

Bergmann, M., Garcia-Sastre, A., Carnero, E., Pehamberger, H., Wolff, K., Palese, P. & Muster, T. (2000). Influenza virus NS1 protein counteracts PKR-mediated inhibition of replication. *J Virol* **74**, 6203-6.

Betakova, T., Nermut, M. V. & Hay, A. J. (1996). The NB protein is an integral component of the membrane of influenza B virus. *J Gen Virol* **77**, 2689-94.

Billecocq, A., Spiegel, M., Vialat, P., Kohl, A., Weber, F., Bouloy, M. & Haller, O. (2004). NSs protein of Rift Valley fever virus blocks interferon production by inhibiting host gene transcription. *J Virol* **78**, 9798-806.

Bossert, B. & Conzelmann, K. K. (2002). Respiratory syncytial virus (RSV) nonstructural (NS) proteins as host range determinants: a chimeric bovine RSV with NS genes from human RSV is attenuated in interferon-competent bovine cells. *J Virol* **76**, 4287-93.

Bossert, B., Marozin, S. & Conzelmann, K. K. (2003). Nonstructural proteins NS1 and NS2 of bovine respiratory syncytial virus block activation of interferon regulatory factor 3. *J Virol* **77**, 8661-8.

Burgui, I., Aragon, T., Ortin, J. & Nieto, A. (2003). PABP1 and eIF4GI associate with influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. *J Gen Virol* **84**, 3263-74.

Burysek, L. & Pitha, P. M. (2001). Latently expressed human herpesvirus 8-encoded interferon regulatory factor 2 inhibits double-stranded RNA-activated protein kinase. *J Virol* **75**, 2345-52.

Burysek, L., Yeow, W. S., Lubyova, B., Kellum, M., Schafer, S. L., Huang, Y. Q. & Pitha, P. M. (1999). Functional analysis of human herpesvirus 8-encoded viral interferon regulatory factor 1 and its association with cellular interferon regulatory factors and p300. *J Virol* **73**, 7334-42.

Chen, W., Calvo, P. A., Malide, D., Gibbs, J., Schubert, U., Bacik, I., Basta, S., O'Neill, R., Schickli, J., Palese, P., Henklein, P., Bennink, J. R. & Yewdell, J. W. (2001). A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med* **7**, 1306-1312.

Chen, Z., Li, Y. & Krug, R. M. (1999). Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *Embo J* **18**, 2273-83.

Chu, W. M., Ostertag, D., Li, Z. W., Chang, L., Chen, Y., Hu, Y., Williams, B., Perrault, J. & Karin, M. (1999). JNK2 and IKKbeta are required for activating the innate response to viral infection. *Immunity* **11**, 721-31.

Collins, S. E., Noyce, R. S. & Mossman, K. L. (2004). Innate cellular response to virus particle entry requires IRF3 but not virus replication. *J Virol* **78**, 1706-17.

Compans, R. W., Content, J. & Duesberg, P. H. (1972). Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus. *J Virol* **10**, 795-800.

Conzelmann, K. K. (2005). Transcriptional activation of alpha/beta interferon genes: interference by nonsegmented negative-strand RNA viruses. *J Virol* **79**, 5241-8.

Davies, M. V., Elroy-Stein, O., Jagus, R., Moss, B. & Kaufman, R. J. (1992). The vaccinia virus K3L gene product potentiates translation by inhibiting double-stranded-RNA-activated protein kinase and phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2. *J Virol* **66**, 1943-50.

Der, S. D., Zhou, A., Williams, B. R. & Silverman, R. H. (1998). Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15623-8.

Desselberger, U., Racaniello, V. R., Zazra, J. J. & Palese, P. (1980). The 3' and 5'-terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity. *Gene* **8**, 315-28.

Diaz, M. O., Ziemin, S., Le Beau, M. M., Pitha, P., Smith, S. D., Chilcote, R. R. & Rowley, J. D. (1988). Homozygous deletion of the alpha- and beta 1-interferon genes in human leukemia and derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 5259-63.

Didcock, L., Young, D. F., Goodbourn, S. & Randall, R. E. (1999). Sendai virus and simian virus 5 block activation of interferon-responsive genes: importance for virus pathogenesis. *J Virol* **73**, 3125-33.

Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. & Reis e Sousa, C. (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**, 1529-31.

Donelan, N. R., Basler, C. F. & Garcia-Sastre, A. (2003). A recombinant influenza A virus expressing an RNA-binding-defective NS1 protein induces high levels of beta interferon and is attenuated in mice. *J Virol* **77**, 13257-66.

Donelan, N. R., Dauber, B., Wang, X., Basler, C. F., Wolff, T. & Garcia-Sastre, A. (2004). The N- and C-terminal domains of the NS1 protein of influenza B virus can independently inhibit IRF-3 and beta interferon promoter activation. *J Virol* **78**, 11574-82.

Du, W. & Maniatis, T. (1992). An ATF/CREB binding site is required for virus induction of the human interferon beta gene [corrected]. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2150-4.

Dupuis, S., Jouanguy, E., Al-Hajjar, S., Fieschi, C., Al-Mohsen, I. Z., Al-Jumaah, S., Yang, K., Chapgier, A., Eidenschenk, C., Eid, P., Al Ghonaium, A., Tufenkeji, H., Frayha, H., Al-Gazlan, S., Al-Rayes, H., Schreiber, R. D., Gresser, I. & Casanova, J. L. (2003). Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nat Genet* **33**, 388-91.

Egorov, A., Brandt, S., Sereinig, S., Romanova, J., Ferko, B., Katinger, D., Grassauer, A., Alexandrova, G., Katinger, H. & Muster, T. (1998). Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells. *J Virol* **72**, 6437-41.

Ehrhardt, C., Kardinal, C., Wurzer, W. J., Wolff, T., von Eichel-Streiber, C., Pleschka, S., Planz, O. & Ludwig, S. (2004). Rac1 and PAK1 are upstream of IKK-epsilon and TBK-1 in the viral activation of interferon regulatory factor-3. *FEBS Lett* **567**, 230-8.

Enami, M., Luytjes, W., Krystal, M. & Palese, P. (1990). Introduction of site-specific mutations into the genome of influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 3802-5.

Ferko, B., Stasakova, J., Romanova, J., Kittel, C., Sereinig, S., Katinger, H. & Egorov, A. (2004). Immunogenicity and protection efficacy of replication-deficient influenza A viruses with altered NS1 genes. *J Virol* **78**, 13037-45.

Fiette, L., Aubert, C., Muller, U., Huang, S., Aguet, M., Brahic, M. & Bureau, J. F. (1995). Theiler's virus infection of 129Sv mice that lack the interferon alpha/beta or interferon gamma receptors. *J Exp Med* **181**, 2069-76.

Fitzgerald, K. A., McWhirter, S. M., Faia, K. L., Rowe, D. C., Latz, E., Golenbock, D. T., Coyle, A. J., Liao, S. M. & Maniatis, T. (2003). IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* **4**, 491-6.

Flick, R., Neumann, G., Hoffmann, E., Neumeier, E. & Hobom, G. (1996). Promoter elements in the influenza vRNA terminal structure. *Rna* **2**, 1046-57.

Fodor, E., Devenish, L., Engelhardt, O. G., Palese, P., Brownlee, G. G. & Garcia-Sastre, A. (1999). Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. *J Virol* **73**, 9679-9682.

Fortes, P., Beloso, A. & Ortin, J. (1994). Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks mRNA nucleocytoplasmic transport. *Embo J* **13**, 704-12.

Garcia-Sastre, A. (2002). Mechanisms of inhibition of the host interferon alpha/beta-mediated antiviral responses by viruses. *Microbes Infect* **4**, 647-55.

Garcia-Sastre, A. (2004). Identification and characterization of viral antagonists of type I interferon in negative-strand RNA viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **283**, 249-80.

Garcia-Sastre, A., Egorov, A., Matassov, D., Brandt, S., Levy, D. E., Durbin, J. E., Palese, P. & Muster, T. (1998). Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology* **252**, 324-30.

Geiss, G. K., Salvatore, M., Tumpey, T. M., Carter, V. S., Wang, X., Basler, C. F., Taubenberger, J. K., Bumgarner, R. E., Palese, P., Katze, M. G. & Garcia-Sastre, A. (2002). Cellular transcriptional profiling in influenza A virus-infected lung epithelial cells: the role of the nonstructural NS1 protein in the evasion of the host innate defense and its potential contribution to pandemic influenza. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 10736-41.

Gomez-Puertas, P., Albo, C., Perez-Pastrana, E., Vivo, A. & Portela, A. (2000). Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. *J Virol* **74**, 11538-47.

Grandvaux, N., Servant, M. J., tenOever, B., Sen, G. C., Balachandran, S., Barber, G. N., Lin, R. & Hiscott, J. (2002). Transcriptional profiling of interferon regulatory factor 3 target genes: direct involvement in the regulation of interferon-stimulated genes. *J Virol* **76**, 5532-9.

Guo, J., Hui, D. J., Merrick, W. C. & Sen, G. C. (2000a). A new pathway of translational regulation mediated by eukaryotic initiation factor 3. *Embo J* **19**, 6891-9.

Guo, J., Peters, K. L. & Sen, G. C. (2000b). Induction of the human protein P56 by interferon, double-stranded RNA, or virus infection. *Virology* **267**, 209-19.

Haas, A. L., Ahrens, P., Bright, P. M. & Ankel, H. (1987). Interferon induces a 15-kilodalton protein exhibiting marked homology to ubiquitin. *J Biol Chem* **262**, 11315-23.

Hagmaier, K., Jennings, S., Buse, J., Weber, F. & Kochs, G. (2003). Novel gene product of Thogoto virus segment 6 codes for an interferon antagonist. *J Virol* **77**, 2747-52.

Haller, O. & Kochs, G. (2002). Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic* **3**, 710-7.

Hatada, E. & Fukuda, R. (1992). Binding of influenza A virus NS1 protein to dsRNA in vitro. *J Gen Virol* **73 (Pt 12)**, 3325-9.

Hatada, E., Saito, S. & Fukuda, R. (1999). Mutant influenza viruses with a defective NS1 protein cannot block the activation of PKR in infected cells. *J Virol* **73**, 2425-33.

Hatta, M., Gao, P., Halfmann, P. & Kawaoka, Y. (2001). Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* **293**, 1840-1842.

Hay, A. J. (1992). The action of amantadinamines against influenza A viruses: inhibition of the M2 ion channel protein. *Sem Virol* **3**, 21-30.

He, B., Gross, M. & Roizman, B. (1997). The gamma(1)34.5 protein of herpes simplex virus 1 complexes with protein phosphatase 1alpha to dephosphorylate the alpha subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 and preclude the shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 843-8.

He, B., Paterson, R. G., Stock, N., Durbin, J. E., Durbin, R. K., Goodbourn, S., Randall, R. E. & Lamb, R. A. (2002). Recovery of paramyxovirus simian virus 5 with a V protein lacking the conserved cysteine-rich domain: the multifunctional V protein blocks both interferon-beta induction and interferon signaling. *Virology* **303**, 15-32.

Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H. & Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**, 1526-9.

Helenius, A. (1992). Unpacking the incoming influenza virus. *Cell* **69**, 577-578.

Hemmi, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yamamoto, M., Kaisho, T., Sanjo, H., Kawai, T., Hoshino, K., Takeda, K. & Akira, S. (2004). The roles of two IkappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J Exp Med* **199**, 1641-50.

Hiscott, J., Pitha, P., Genin, P., Nguyen, H., Heylbroeck, C., Mamane, Y., Algarte, M. & Lin, R. (1999). Triggering the interferon response: the role of IRF-3 transcription factor. *J Interferon Cytokine Res* **19**, 1-13.

Hoffmann, E., Mahmood, K., Yang, C. F., Webster, R. G., Greenberg, H. B. & Kemble, G. (2002). Rescue of influenza B virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11411-6.

Hoffmann, E., Neumann, G., Kawaoka, Y., Hobom, G. & Webster, R. G. (2000). A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6108-13.

Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N. & Taniguchi, T. (2005). IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* **434**, 772-7.

Hornung, V., Schlender, J., Guenthner-Biller, M., Rothenfusser, S., Endres, S., Conzelmann, K. K. & Hartmann, G. (2004). Replication-dependent potent IFN-alpha induction in human plasmacytoid dendritic cells by a single-stranded RNA virus. *J Immunol* **173**, 5935-43.

Horvath, C. M., Williams, M. A. & Lamb, R. A. (1990). Eukaryotic coupled translation of tandem cistrons: identification of the influenza B virus BM2 polypeptide. *Embo J* **9**, 2639-47.

Hsu, M. T., Parvin, J. D., Gupta, S., Krystal, M. & Palese, P. (1987). Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal panhandle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 8140-4.

Imai, M., Watanabe, S., Ninomiya, A., Obuchi, M. & Odagiri, T. (2004). Influenza B virus BM2 protein is a crucial component for incorporation of viral ribonucleoprotein complex into virions during virus assembly. *J Virol* **78**, 11007-15.

Inglis, S. C. & Brown, C. M. (1981). Spliced and unspliced RNAs encoded by virion RNA segment 7 of influenza virus. *Nucleic Acids Res* **9**, 2727-40.

Isaacs, A. & Baron, S. (1960). Antiviral action of interferon in embryonic cells. *Lancet* **2**, 946-7.

Isaacs, A. & Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **147**, 258-67.

Izaguirre, A., Barnes, B. J., Amrute, S., Yeow, W. S., Megjugorac, N., Dai, J., Feng, D., Chung, E., Pitha, P. M. & Fitzgerald-Bocarsly, P. (2003). Comparative analysis of IRF and IFN-alpha expression in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol* **74**, 1125-38.

Jackson, D., Cadman, A., Zurcher, T. & Barclay, W. S. (2002). A reverse genetics approach for recovery of recombinant influenza B viruses entirely from cDNA. *J Virol* **76**, 11744-7.

Jacobs, B. L. & Langland, J. O. (1996). When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology* **219**, 339-49.

Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. (2001). Part I: An introduction to immunobiology and innate immunity. In *Immunobiology: The immun system in health and disease*, Fifth Edition edn, pp. 1-92. Edited by C. A. Janeway. New York: Garland Publishing.

Jennings, S., Martinez-Sobrido, L., Garcia-Sastre, A., Weber, F. & Kochs, G. (2005). Thogoto virus ML protein suppresses IRF3 function. *Virology* **331**, 63-72.

Juang, Y. T., Lowther, W., Kellum, M., Au, W. C., Lin, R., Hiscott, J. & Pitha, P. M. (1998). Primary activation of interferon A and interferon B gene transcription by interferon regulatory factor 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9837-42.

Kates, M., Allison, A. C., Tyrell, D. A. & James, A. T. (1962). Origin of lipids in influenza virus. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **27**, 293-301.

Kawaoka, Y., Krauss, S. & Webster, R. G. (1989). Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol* **63**, 4603-4608.

Kerr, I. M. & Brown, R. E. (1978). pppA2'p5'A2'p5'A: an inhibitor of protein synthesis synthesized with an enzyme fraction from interferon-treated cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 256-60.

Kido, H., Murakami, M., Oba, K., Chen, Y. & Towatari, T. (1999). Cellular proteinases trigger the infectivity of the influenza A and Sendai viruses. *Mol Cells* **9**, 235-244.

Kim, M. J., Latham, A. G. & Krug, R. M. (2002). Human influenza viruses activate an interferon-independent transcription of cellular antiviral genes: outcome with influenza A virus is unique. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 10096-101.

Kim, T. K. & Maniatis, T. (1997). The mechanism of transcriptional synergy of an in vitro assembled interferon-beta enhanceosome. *Mol Cell* **1**, 119-29.

Klenk, H. D. & Garten, W. (1994). Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends Microbiol* **2**, 39-43.

Krug, A., Luker, G. D., Barchet, W., Leib, D. A., Akira, S. & Colonna, M. (2004). Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* **103**, 1433-7.

Krug, R. M., Yuan, W., Noah, D. L. & Latham, A. G. (2003). Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: the roles of the viral NS1 protein. *Virology* **309**, 181-9.

Lamb, R. A. & Krug, R. M. (2001). Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. In *Virology*, Fourth edition edn, pp. 1487-1531. Edited by B. N. e. a. Fields. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.

Lamb, R. A. & Lai, C. J. (1980). Sequence of interrupted and uninterrupted mRNAs and cloned DNA coding for the two overlapping nonstructural proteins of influenza virus. *Cell* **21**, 475-85.

Lamond, A. I. & Spector, D. L. (2003). Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 605-12.

Le Bon, A., Etchart, N., Rossmann, C., Ashton, M., Hou, S., Gewert, D., Borrow, P. & Tough, D. F. (2003). Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat Immunol* **4**, 1009-15.

Le Bon, A., Schiavoni, G., D'Agostino, G., Gresser, I., Belardelli, F. & Tough, D. F. (2001). Type i interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* **14**, 461-70.

Le Bon, A. & Tough, D. F. (2002). Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr Opin Immunol* **14**, 432-6.

Lee, K. H. & Seong, B. L. (1998). The position 4 nucleotide at the 3' end of the influenza virus neuraminidase vRNA is involved in temporal regulation of transcription and replication of neuraminidase RNAs and affects the repertoire of influenza virus surface antigens. *J Gen Virol* **79 (Pt 8)**, 1923-34.

Lee, T. G., Tomita, J., Hovanessian, A. G. & Katze, M. G. (1990). Purification and partial characterization of a cellular inhibitor of the interferon-induced protein kinase of Mr 68,000 from influenza virus-infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 6208-12.

Lee, T. G., Tomita, J., Hovanessian, A. G. & Katze, M. G. (1992). Characterization and regulation of the 58,000-dalton cellular inhibitor of the interferon-induced, dsRNA-activated protein kinase. *J Biol Chem* **267**, 14238-43.

Leonard, G. T. & Sen, G. C. (1997). Restoration of interferon responses of adenovirus E1A-expressing HT1080 cell lines by overexpression of p48 protein. *J Virol* **71**, 5095-101.

Li, M., Damania, B., Alvarez, X., Ogryzko, V., Ozato, K. & Jung, J. U. (2000). Inhibition of p300 histone acetyltransferase by viral interferon regulatory factor. *Mol Cell Biol* **20**, 8254-63.

Li, M., Lee, H., Guo, J., Neipel, F., Fleckenstein, B., Ozato, K. & Jung, J. U. (1998). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral interferon regulatory factor. *J Virol* **72**, 5433-40.

Li, X. & Palese, P. (1992). Mutational analysis of the promoter required for influenza virus virion RNA synthesis. *J Virol* **66**, 4331-8.

Lin, R., Heylbroeck, C., Pitha, P. M. & Hiscott, J. (1998). Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol* **18**, 2986-96.

Lin, R., Mamane, Y. & Hiscott, J. (1999). Structural and functional analysis of interferon regulatory factor 3: localization of the transactivation and autoinhibitory domains. *Mol Cell Biol* **19**, 2465-74.

Look, D. C., Roswit, W. T., Frick, A. G., Gris-Alevy, Y., Dickhaus, D. M., Walter, M. J. & Holtzman, M. J. (1998). Direct suppression of Stat1 function during adenoviral infection. *Immunity* **9**, 871-80.

Lu, Y., Qian, X. Y. & Krug, R. M. (1994). The influenza virus NS1 protein: a novel inhibitor of pre-mRNA splicing. *Genes Dev* **8**, 1817-28.

Lu, Y., Wambach, M., Katze, M. G. & Krug, R. M. (1995). Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the elF-2 translation initiation factor. *Virology* **214**, 222-8.

Lubyova, B. & Pitha, P. M. (2000). Characterization of a novel human herpesvirus 8-encoded protein, vIRF-3, that shows homology to viral and cellular interferon regulatory factors. *J Virol* **74**, 8194-201.

Ludwig, S., Wang, X., Ehrhardt, C., Zheng, H., Donelan, N., Planz, O., Pleschka, S., Garcia-Sastre, A., Heins, G. & Wolff, T. (2002). The influenza A virus NS1 protein inhibits activation of Jun N-terminal kinase and AP-1 transcription factors. *J Virol* **76**, 11166-71.

Lund, J. M., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N. C., Gale, N. W., Iwasaki, A. & Flavell, R. A. (2004). Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 5598-603.

Luo, G. X., Luytjes, W., Enami, M. & Palese, P. (1991). The polyadenylation signal of influenza virus RNA involves a stretch of uridines followed by the RNA duplex of the panhandle structure. *J Virol* **65**, 2861-2867.

Majde, J. A. (2000). Viral double-stranded RNA, cytokines, and the flu. *J Interferon Cytokine Res* **20**, 259-72.

Malakhova, O. A., Yan, M., Malakhov, M. P., Yuan, Y., Ritchie, K. J., Kim, K. I., Peterson, L. F., Shuai, K. & Zhang, D. E. (2003). Protein ISGylation modulates the JAK-STAT signaling pathway. *Genes Dev* **17**, 455-60.

Marie, I., Durbin, J. E. & Levy, D. E. (1998). Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *Embo J* **17**, 6660-9.

Mathews, M. B. & Shenk, T. (1991). Adenovirus virus-associated RNA and translation control. *J Virol* **65**, 5657-62.

Matlin, K. S., Reggio, H., Helenius, A. & Simons, K. (1981). Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line. *J Cell Biol* **91**, 601-613.

McCullers, J. A., Hoffmann, E., Huber, V. C. & Nickerson, A. D. (2005). A single amino acid change in the C-terminal domain of the matrix protein M1 of influenza B virus confers mouse adaptation and virulence. *Virology* **336**, 318-26.

McLaughlin, P. M., Helfrich, W., Kok, K., Mulder, M., Hu, S. W., Brinker, M. G., Ruiters, M. H., de Leij, L. F. & Buys, C. H. (2000). The ubiquitin-activating enzyme E1-like protein in lung cancer cell lines. *Int J Cancer* **85**, 871-6.

McWhirter, S. M., Fitzgerald, K. A., Rosains, J., Rowe, D. C., Golenbock, D. T. & Maniatis, T. (2004). IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 233-8.

Montoya, M., Schiavoni, G., Mattei, F., Gresser, I., Belardelli, F., Borrow, P. & Tough, D. F. (2002). Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation. *Blood* **99**, 3263-71.

Morahan, P. S. & Grossberg, S. E. (1970). Age-related cellular resistance of the chicken embryo to viral infections. I. Interferon and natural resistance to myxoviruses and vesicular stomatitis virus. *J Infect Dis* **121**, 615-23.

Mori, M., Yoneyama, M., Ito, T., Takahashi, K., Inagaki, F. & Fujita, T. (2004). Identification of Ser-386 of interferon regulatory factor 3 as critical target for inducible phosphorylation that determines activation. *J Biol Chem* **279**, 9698-702.

Mould, J. A., Paterson, R. G., Takeda, M., Ohigashi, Y., Venkataraman, P., Lamb, R. A. & Pinto, L. H. (2003). Influenza B virus BM2 protein has ion channel activity that conducts protons across membranes. *Dev Cell* **5**, 175-84.

Muller, U., Steinhoff, U., Reis, L. F., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R. M. & Aguet, M. (1994). Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* **264**, 1918-21.

Nagai, Y. & Kato, A. (2004). Accessory genes of the paramyxoviridae, a large family of nonsegmented negative-strand RNA viruses, as a focus of active investigation by reverse genetics. *Curr Top Microbiol Immunol* **283**, 197-248.

Nakaya, T., Sato, M., Hata, N., Asagiri, M., Suemori, H., Noguchi, S., Tanaka, N. & Taniguchi, T. (2001). Gene induction pathways mediated by distinct IRFs during viral infection. *Biochem Biophys Res Commun* **283**, 1150-6.

Nemeroff, M. E., Barabino, S. M., Li, Y., Keller, W. & Krug, R. M. (1998). Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3'end formation of cellular pre-mRNAs. *Mol Cell* **1**, 991-1000.

Nemeroff, M. E., Qian, X. Y. & Krug, R. M. (1995). The influenza virus NS1 protein forms multimers in vitro and in vivo. *Virology* **212**, 422-8.

Neumann, G., Brownlee, G. G., Fodor, E. & Kawaoka, Y. (2004). Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation. *Curr Top Microbiol Immunol* **283**, 121-43.

Neumann, G., Watanabe, T., Ito, H., Watanabe, S., Goto, H., Gao, P., Hughes, M., Perez, D. R., Donis, R., Hoffmann, E., Hobom, G. & Kawaoka, Y. (1999). Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9345-50.

Noah, D. L., Twu, K. Y. & Krug, R. M. (2003). Cellular antiviral responses against influenza A virus are countered at the posttranscriptional level by the viral NS1A protein via its binding to a cellular protein required for the 3' end processing of cellular pre-mRNAS. *Virology* **307**, 386-95.

Odagiri, T., Hong, J. & Ohara, Y. (1999). The BM2 protein of influenza B virus is synthesized in the late phase of infection and incorporated into virions as a subviral component. *J Gen Virol* **80 (Pt 10)**, 2573-2581.

O'Neill, R. E., Talon, J. & Palese, P. (1998). The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *Embo J* **17**, 288-296.

Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funami, K., Akazawa, T. & Seya, T. (2003). TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* **4**, 161-7.

Osiak, A., Utermohlen, O., Niendorf, S., Horak, I. & Knobeloch, K. P. (2005). ISG15, an interferon-stimulated ubiquitin-like protein, is not essential for STAT1 signaling and responses against vesicular stomatitis and lymphocytic choriomeningitis virus. *Mol Cell Biol* **25**, 6338-45.

Palese, P. (1977). The genes of influenza virus. *Cell* **10**, 1-10.

Palese, P., Tobita, K., Ueda, M. & Compans, R. W. (1974). Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology* **61**, 397-410.

Paragas, J., Talon, J., O'Neill, R. E., Anderson, D. K., Garcia-Sastre, A. & Palese, P. (2001). Influenza B and C virus NEP (NS2) proteins possess nuclear export activities. *J Virol* **75**, 7375-83.

Parisien, J. P., Lau, J. F. & Horvath, C. M. (2002). STAT2 acts as a host range determinant for species-specific paramyxovirus interferon antagonism and simian virus 5 replication. *J Virol* **76**, 6435-41.

Park, Y. W. & Katze, M. G. (1995). Translational control by influenza virus. Identification of cis-acting sequences and trans-acting factors which may regulate selective viral mRNA translation. *J Biol Chem* **270**, 28433-9.

Paterson, R. G., Takeda, M., Ohigashi, Y., Pinto, L. H. & Lamb, R. A. (2003). Influenza B virus BM2 protein is an oligomeric integral membrane protein expressed at the cell surface. *Virology* **306**, 7-17.

Pathak, V. K., Schindler, D. & Hershey, J. W. (1988). Generation of a mutant form of protein synthesis initiation factor eIF-2 lacking the site of phosphorylation by eIF-2 kinases. *Mol Cell Biol* **8**, 993-5.

Pestka, S., Krause, C. D. & Walter, M. R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* **202**, 8-32.

Peters, K. L., Smith, H. L., Stark, G. R. & Sen, G. C. (2002). IRF-3-dependent, NFkappa B- and JNK-independent activation of the 561 and IFN-beta genes in response to double-stranded RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6322-7.

Pinto, L. H., Holsinger, L. J. & Lamb, R. A. (1992). Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* **69**, 517-528.

Platanias, L. C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* **5**, 375-86.

Pleschka, S., Wolff, T., Ehrhardt, C., Hobom, G., Planz, O., Rapp, U. R. & Ludwig, S. (2001). Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade. *Nat Cell Biol* **3**, 301-305.

Plotch, S. J., Bouloy, M., Ulmanen, I. & Krug, R. M. (1981). A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell* **23**, 847-858.

Qian, X. Y., Chien, C. Y., Lu, Y., Montelione, G. T. & Krug, R. M. (1995). An amino-terminal polypeptide fragment of the influenza virus NS1 protein possesses specific RNA-binding activity and largely helical backbone structure. *Rna* **1**, 948-56.

Qiu, Y. & Krug, R. M. (1994). The influenza virus NS1 protein is a poly(A)-binding protein that inhibits nuclear export of mRNAs containing poly(A). *J Virol* **68**, 2425-32.

Qiu, Y., Nemeroff, M. & Krug, R. M. (1995). The influenza virus NS1 protein binds to a specific region in human U6 snRNA and inhibits U6-U2 and U6-U4 snRNA interactions during splicing. *Rna* **1**, 304-16.

Quinlivan, M., Zamarin, D., Garcia-Sastre, A., Cullinane, A., Chambers, T. & Palese, P. (2005). Attenuation of equine influenza viruses through truncations of the NS1 protein. *J Virol* **79**, 8431-9.

Rebouillat, D. & Hovanessian, A. G. (1999). The human 2',5'-oligoadenylate synthetase family: interferon-induced proteins with unique enzymatic properties. *J Interferon Cytokine Res* **19**, 295-308.

Ritchie, K. J., Hahn, C. S., Kim, K. I., Yan, M., Rosario, D., Li, L., de la Torre, J. C. & Zhang, D. E. (2004). Role of ISG15 protease UBP43 (USP18) in innate immunity to viral infection. *Nat Med* **10**, 1374-8.

Rowley, K. V., Harvey, R. & Barclay, W. S. (1999). Isolation and characterization of a transfectant influenza B virus altered in RNA segment 6. *J Gen Virol* **80 (Pt 9)**, 2353-9.

Samuel, C. E. (1993). The eIF-2 alpha protein kinases, regulators of translation in eukaryotes from yeasts to humans. *J Biol Chem* **268**, 7603-6.

Samuel, C. E. (2001). Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* **14**, 778-809, table of contents.

Sarkar, S. N., Peters, K. L., Elco, C. P., Sakamoto, S., Pal, S. & Sen, G. C. (2004). Novel roles of TLR3 tyrosine phosphorylation and PI3 kinase in double-stranded RNA signaling. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 1060-7.

Sato, M., Suemori, H., Hata, N., Asagiri, M., Ogasawara, K., Nakao, K., Nakaya, T., Katsuki, M., Noguchi, S., Tanaka, N. & Taniguchi, T. (2000). Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* **13**, 539-48.

Sato, M., Tanaka, N., Hata, N., Oda, E. & Taniguchi, T. (1998). Involvement of the IRF family transcription factor IRF-3 in virus-induced activation of the IFN-beta gene. *FEBS Lett* **425**, 112-6.

Schlender, J., Bossert, B., Buchholz, U. & Conzelmann, K. K. (2000). Bovine respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 cooperatively antagonize alpha/beta interferon-induced antiviral response. *J Virol* **74**, 8234-42.

Schoenemeyer, A., Barnes, B. J., Mancl, M. E., Latz, E., Goutagny, N., Pitha, P. M., Fitzgerald, K. A. & Golenbock, D. T. (2005). The interferon regulatory factor, IRF5, is a central mediator of toll-like receptor 7 signaling. *J Biol Chem* **280**, 17005-12.

Scholtissek, C., Rohde, W., Von Hoyningen, V. & Rott, R. (1978). On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. *Virology* **87**, 13-20.

Sekellick, M. J. & Marcus, P. I. (1985). Interferon induction by viruses. XIV. Development of interferon inducibility and its inhibition in chick embryo cells "aged" in vitro. *J Interferon Res* **5**, 651-67.

Sen, G. C. (2001). Viruses and interferons. *Annu Rev Microbiol* **55**, 255-81.

Seo, S. H., Hoffmann, E. & Webster, R. G. (2002). Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. *Nat Med* **8**, 950-4.

Servant, M. J., Grandvaux, N., tenOever, B. R., Duguay, D., Lin, R. & Hiscott, J. (2003). Identification of the minimal phosphoacceptor site required for in vivo activation of interferon regulatory factor 3 in response to virus and double-stranded RNA. *J Biol Chem* **278**, 9441-7.

Servant, M. J., ten Oever, B., LePage, C., Conti, L., Gessani, S., Julkunen, I., Lin, R. & Hiscott, J. (2001). Identification of distinct signaling pathways leading to the phosphorylation of interferon regulatory factor 3. *J Biol Chem* **276**, 355-63.

Sharma, S., tenOever, B. R., Grandvaux, N., Zhou, G. P., Lin, R. & Hiscott, J. (2003). Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* **300**, 1148-51.

Shaw, M. W., Choppin, P. W. & Lamb, R. A. (1983). A previously unrecognized influenza B virus glycoprotein from a bicistronic mRNA that also encodes the viral neuraminidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 4879-83.

Skehel, J. J. & Wiley, D. C. (2000). Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* **69**, 531-569.

Smart, K. M. & Kilbourne, E. D. (1966). The influence of cortisone on experimental viral infection. VII. Kinetics of interferon formation and its inhibition with hydrocortisone in relation to viral strain and virulence. *J Exp Med* **123**, 309-25.

Smith, E. J., Marie, I., Prakash, A., Garcia-Sastre, A. & Levy, D. E. (2001). IRF3 and IRF7 phosphorylation in virus-infected cells does not require double-stranded RNA-dependent protein kinase R or Ikappa B kinase but is blocked by Vaccinia virus E3L protein. *J Biol Chem* **276**, 8951-7.

Solorzano, A., Webby, R. J., Lager, K. M., Janke, B. H., Garcia-Sastre, A. & Richt, J. A. (2005). Mutations in the NS1 protein of swine influenza virus impair anti-interferon activity and confer attenuation in pigs. *J Virol* **79**, 7535-43.

Spiegel, M., Pichlmair, A., Martinez-Sobrido, L., Cros, J., Garcia-Sastre, A., Haller, O. & Weber, F. (2005). Inhibition of Beta interferon induction by severe acute respiratory syndrome coronavirus suggests a two-step model for activation of interferon regulatory factor 3. *J Virol* **79**, 2079-86.

Stieneke-Grober, A., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E., Thomas, G., Roberts, C., Klenk, H. D. & Garten, W. (1992). Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *Embo J* **11**, 2407-14.

Stoeckle, M. Y., Shaw, M. W. & Choppin, P. W. (1987). Segment-specific and common nucleotide sequences in the noncoding regions of influenza B virus genome RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 2703-7.

Sugrue, R. J. & Hay, A. J. (1991). Structural characteristics of the M2 protein of influenza A viruses: evidence that it forms a tetrameric channel. *Virology* **180**, 617-24.

Suhara, W., Yoneyama, M., Kitabayashi, I. & Fujita, T. (2002). Direct involvement of CREB-binding protein/p300 in sequence-specific DNA binding of virus-activated interferon regulatory factor-3 holocomplex. *J Biol Chem* **277**, 22304-13.

Talon, J., Horvath, C. M., Polley, R., Basler, C. F., Muster, T., Palese, P. & Garcia-Sastre, A. (2000a). Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein. *J Virol* **74**, 7989-96.

Talon, J., Salvatore, M., O'Neill, R. E., Nakaya, Y., Zheng, H., Muster, T., Garcia-Sastre, A. & Palese, P. (2000b). Influenza A and B viruses expressing altered NS1 proteins: A vaccine approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4309-14.

Tan, S. L. & Katze, M. G. (1998). Biochemical and genetic evidence for complex formation between the influenza A virus NS1 protein and the interferon-induced PKR protein kinase. *J Interferon Cytokine Res* **18**, 757-66.

Tanaka, T., Odagiri, T. & Tobita, K. (1988). Biological functions of the NS1 protein of an influenza B virus mutant which has a long carboxyl terminal deletion. *Arch Virol* **102**, 173-85.

Taubenberger, J. K., Reid, A. H., Krafft, A. E., Bijwaard, K. E. & Fanning, T. G. (1997). Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus. *Science* **275**, 1793-1766.

tenOever, B. R., Servant, M. J., Grandvaux, N., Lin, R. & Hiscott, J. (2002). Recognition of the measles virus nucleocapsid as a mechanism of IRF-3 activation. *J Virol* **76**, 3659-69.

tenOever, B. R., Sharma, S., Zou, W., Sun, Q., Grandvaux, N., Julkunen, I., Hemmi, H., Yamamoto, M., Akira, S., Yeh, W. C., Lin, R. & Hiscott, J. (2004). Activation of TBK1 and IKKvarepsilon kinases by vesicular stomatitis virus infection and the role of viral ribonucleoprotein in the development of interferon antiviral immunity. *J Virol* **78**, 10636-49.

Thomas, D., Blakqori, G., Wagner, V., Banholzer, M., Kessler, N., Elliott, R. M., Haller, O. & Weber, F. (2004). Inhibition of RNA polymerase II phosphorylation by a viral interferon antagonist. *J Biol Chem* **279**, 31471-7.

Thomis, D. C. & Samuel, C. E. (1993). Mechanism of interferon action: evidence for intermolecular autophosphorylation and autoactivation of the interferon-induced, RNA-dependent protein kinase PKR. *J Virol* **67**, 7695-700.

Unterstab, G., Ludwig, S., Anton, A., Planz, O., Dauber, B., Krappmann, D., Heins, G., Erhardt, C., Wolff, T. Viral targeting of the interferon-ß inducing TANK-binding kinase-1. *PNAS,* (im Druck)

Visvanathan, K. V. & Goodbourn, S. (1989). Double-stranded RNA activates binding of NF-kappa B to an inducible element in the human beta-interferon promoter. *Embo J* **8**, 1129-38.

Wang, P., Palese, P. & O'Neill, R. E. (1997). The NPI-1/NPI-3 (karyopherin alpha) binding site on the influenza a virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear localization signal. *J Virol* **71**, 1850-6.

Wang, W. & Krug, R. M. (1996). The RNA-binding and effector domains of the viral NS1 protein are conserved to different extents among influenza A and B viruses. *Virology* **223**, 41-50.

Wang, W., Riedel, K., Lynch, P., Chien, C. Y., Montelione, G. T. & Krug, R. M. (1999). RNA binding by the novel helical domain of the influenza virus NS1 protein requires its dimer structure and a small number of specific basic amino acids. *Rna* **5**, 195-205.

Wang, X., Basler, C. F., Williams, B. R., Silverman, R. H., Palese, P. & Garcia-Sastre, A. (2002). Functional replacement of the carboxy-terminal two-thirds of the influenza A virus NS1 protein with short heterologous dimerization domains. *J Virol* **76**, 12951-62.

Wang, X., Li, M., Zheng, H., Muster, T., Palese, P., Beg, A. A. & Garcia-Sastre, A. (2000). Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappaB and induction of alpha/beta interferon. *J Virol* **74**, 11566-73.

Wathelet, M. G., Berr, P. M. & Huez, G. A. (1992). Regulation of gene expression by cytokines and virus in human cells lacking the type-I interferon locus. *Eur J Biochem* **206**, 901-10.

Wathelet, M. G., Lin, C. H., Parekh, B. S., Ronco, L. V., Howley, P. M. & Maniatis, T. (1998). Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer in vivo. *Mol Cell* **1**, 507-18.

Weaver, B. K., Kumar, K. P. & Reich, N. C. (1998). Interferon regulatory factor 3 and CREB-binding protein/p300 are subunits of double-stranded RNA-activated transcription factor DRAF1. *Mol Cell Biol* **18**, 1359-68.

Whittaker, G., Bui, M. & Helenius, A. (1996). The role of nuclear import and export in influenza virus infection. *Trends Cell Biol* **6**, 67-71.

Yamashita, M., Krystal, M., Fitch, W. M. & Palese, P. (1988). Influenza B virus evolution: co-circulating lineages and comparison of evolutionary pattern with those of influenza A and C viruses. *Virology* **163**, 112-22.

Yasuda, J., Nakada, S., Kato, A., Toyoda, T. & Ishihama, A. (1993). Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix. *Virology* **196**, 249-55.

Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S. & Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* **5**, 730-7.

Yoneyama, M., Suhara, W., Fukuhara, Y., Fukuda, M., Nishida, E. & Fujita, T. (1998). Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *Embo J* **17**, 1087-95.

Yoneyama, M., Suhara, W., Fukuhara, Y., Sato, M., Ozato, K. & Fujita, T. (1996). Autocrine amplification of type I interferon gene expression mediated by interferon stimulated gene factor 3 (ISGF3). *J Biochem (Tokyo)* **120**, 160-9.

Yuan, W., Aramini, J. M., Montelione, G. T. & Krug, R. M. (2002). Structural Basis for Ubiquitin-like ISG 15 Protein Binding to the NS1 Protein of Influenza B Virus: A Protein-Protein Interaction Function That Is Not Shared by the Corresponding N-terminal Domain of the NS1 Protein of Influenza A Virus. *Virology* **304**, 291-301.

Yuan, W. & Krug, R. M. (2001). Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein. *Embo J* **20**, 362-71.

Zhao, C., Beaudenon, S. L., Kelley, M. L., Waddell, M. B., Yuan, W., Schulman, B. A., Huibregtse, J. M. & Krug, R. M. (2004). The UbcH8 ubiquitin E2 enzyme is also the E2 enzyme for ISG15, an IFN-alpha/beta-induced ubiquitin-like protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7578-82.

Zhao, C., Denison, C., Huibregtse, J. M., Gygi, S. & Krug, R. M. (2005). Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 10200-5.

Zimring, J. C., Goodbourn, S. & Offermann, M. K. (1998). Human herpesvirus 8 encodes an interferon regulatory factor (IRF) homolog that represses IRF-1-mediated transcription. *J Virol* **72**, 701-7.

7. Abkürzungsverzeichnis

µ	Mikro
A	Ampere
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATF	*activated transcription factor*
ATP	Adenosin 5´-triphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinder Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
CBP	*CREB binding protein*
CO_2	Kohlendioxid
cRNA	*copy/complementary RNA*
C-terminal	carboxyterminal
d	Tag
d.h.	das heißt
DMEM	*Dulbecco's modified Eagle's Medium*
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige RNA
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	*enhanced green fluorescent protein*
FBS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
GTPase	Guanosintriphosphatase
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
H_2O	Wasser
IFN	Interferon
IκB	*Inhibitor of κB*
IKK	IκB Kinase
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
IRF	Interferon Regulatorischer Faktor
JAK	Janus Kinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
m	Milli
M	molar
M	Matrixprotein
Mda-5	*melanoma differentiation-associated gene 5*
MEM	*minimal essential medium*
MKK	MEK Kinase
MOI	*multiplicity of infection*
min	Minute

NA	Neuraminidase
NFκB	*nuclear factor kappa B*
nm	Nanometer
NP	Nukleoprotein
NS	Nichtstrukturprotein
N-terminal	aminoterminal
OD	optische Dichte
PA	Polymeraseuntereinheit, azidisch
p.I.	post infectionem
PB	Polymeraseuntereinheit, basisch
PBS	*Phosphate buffered saline*
PKR	dsRNA-abhängige Proteinkinase
pH	potentia hydrogenii
PRD	*positive regulatory domain*
RIG-I	*Retinoicacid inducible gene I*
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
ssRNA	*singlestranded RNA*
STAT	*Signal transducer and activator of transcription*
TBK-1	*Traf family member-associated NFκB activator (TANK) binding kinase 1*
TBST	*tris buffered saline with tween*
TEMED	N,N,N´,N´,-Tetramethylendiamin
TLR	*Toll-like receptor*
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Unit
UV	ultra violett
V	Volt
vRNA	virale RNA
WT	Wildtyp

Teile dieser Arbeit wurden bzw. werden wie folgt veröffentlicht:

Dauber, B., Heins, G., Wolff, T.
The influenza B Virus nonstructural NS1 protein is essential for efficient viral growth and antagonizes beta interferon induction
J. Virol. (2004), **78**: 1865-72

Donelan, N. R., Dauber, B., Wang, X., Basler, C. F., Wolff, T., Garcia-Sastre, A.
The N- and C-terminal domains of the NS1 protein of influenza B virus can independently inhibit IRF-3 and beta interferon promoter activation
J. Virol. (2004), **78**: 11574-82

Dauber, B., Schneider, J., Heins, G., Wolff, T.
DsRNA-binding of the influenza B virus NS1 protein is essential for inhibition of PKR activation and viral replication but not for IFN-ß antagonization
(in Vorbereitung)

Von dieser Arbeit unabhängige Veröffentlichungen:

Unterstab, G., Ludwig, S., Anton, A., Planz, O., Dauber, B., Krappmann, D., Heins, G., Erhardt, C., Wolff, T.
Viral targeting of the interferon-ß inducing TANK-binding kinase-1
PNAS (im Druck)

Mehmetoglu, G., Dauber, B., Wolff, T., Planz, O., Klenk, H.-D., Stech, J.
Influenza Virus Polymerase – Driving Force of Species Transmission?
(eingereicht)

AUSZEICHNUNG:

ESWI Young Scientists Award 2005
Einladung zur Second European Influenza Conference in Malta, 2005

BEITRÄGE AUF KONFERENZEN:

Dauber, B., Schneider, J., Heins, G., Wolff, T.
DsRNA-binding of the influenza B virus NS1 protein is not decisive for IFN-ß antagonization but essential for inhibition of PKR activation and efficient viral replication
3rd Orthomyxovirus Research Conference, 2005, Cambridge/UK

Dauber, B., Schneider, J., Heins, G., Wolff, T.
The dsRNA-binding capacity of the influenza B virus NS1 protein is dispensable for inhibition of type I interferon induction
Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, 2005, Hannover

Dauber, B., Schneider, J., Heins, G., Wolff, T.
The dsRNA-binding capacity of the influenza B virus NS1 protein is dispensable for inhibition of type I interferon induction
Berlin Influenza Conference, 2005, Berlin
Dauber, B., Unterstab, G., Heins, G., Wolff, T.
The influenza B virus NS1 Protein is essential for efficient viral growth and antagonizes interferon(IFN)-beta induction
Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, 2004, Tübingen

Dauber, B., Schneider, J., Heins, G., Wolff, T.
Influence of dsRNA-binding capacity of the influenza B virus NS1 protein on IRF-3 activation and type I interferon induction
Society for Virology, Study group "Immunobiology of Viral Infections", 3. Workshop 2004, Schloss Zeilitzheim

Dauber, B, Wolff, T.
Deletion of the NS1 gene severely restricts replication of influenza B virus
XII. International Conference on Negative Strand Viruses, 2003, Pisa/Italien

Dauber, B., Wolff, T.
Analysis of the interferon-antagonistic properties of influenza B viruses
Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, 2003, Berlin

Dauber, B., Heins, G., Wolff, T.
The influenza B virus NS1-B protein prevents activation of IRF-3 and induction of interferon-ß
Society for Virology, Study group "Immunobiology of Viral Infections", 2. Workshop 2003, Schloss Zeilitzheim

TABELLARISCHER LEBENSLAUF

Persönliche Daten:	Bianca Helene Dauber geb. am 10. September 1975 in Miltenberg ledig
Schulbildung:	
1981-1986	Grundschule Großheubach
1986-1995	Johannes-Butzbach-Gymnasium Miltenberg
1995	Allgemeine Hochschulreife
Praktikum:	
September 1995-März 1996	Technischer Umweltschutz am Landratsamt Miltenberg
Akademische Ausbildung:	
1996-2001	Studium der Humanbiologie an der Philipps-Universität Marburg
2000	Diplomprüfungen in Virologie (Hauptfach), Zellbiologie und Molekularbiologie (Nebenfächer)
2000- 2001	Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Klenk am Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg Thema: „Herstellung rekombinanter Influenza A Viren für Pathogenitätsstudien im Mausmodell“
2002-2005	Anfertigung der Dissertation in der Arbeitsgruppe von Dr. Wolff am Robert Koch-Institut in Berlin Thema: „Charakterisierung der Typ I IFN-antagonistischen Eigenschaften des Influenza B Virus“

VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Aurich, Daut, Eilers, Elsässer, Garten, Hartmann, Heimbrodt, McGregor, Müller, Kern, Kirchner, Klenk, Körle, Koolman, Lammel, Lill, Niessing, Seitz,
in Berlin: Wolff

DANKSAGUNG

Herrn Priv.-Doz. Dr. Thorsten Wolff danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas, für seine umfassende wissenschaftliche Unterstützung bei der Betreuung meiner Arbeit und für seine stete Bereitschaft zur Diskussion.

Bei Herrn Prof. Dr. H.-D. Klenk vom Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg möchte ich mich für die Zusammenarbeit und die Übernahme des Koreferats bedanken.

Vielen lieben Dank an alle netten Menschen der NG2 für das gute Laborklima. Ein besonderes Dankeschön gilt Gudrun, die immer dafür gesorgt hat, dass es uns an nichts fehlt und Gunhild und Jana für die vielen (nicht immer) fachlichen Diskussionen.

Mein ganz herzlicher Dank gilt meinen Freunden und meiner Familie für ihre stete uneingeschränkte Unterstützung.

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich,
dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg
zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit
mit dem Titel

Charakterisierung der Typ I IFN-antagonistischen Eigenschaften des Influenza B Virus

am Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg
unter Leitung von Prof. Dr. Klenk
in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch-Institut Berlin
unter der Leitung von Prof. Dr. Kurth
mit Unterstützung durch Herrn Priv.-Doz. Dr. Thorsten Wolff
ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden im *Journal of Virology* (Dauber et al., 2004; Donelan et al., 2004) veröffentlicht.

Marburg, den 18. August 2005

Bianca Dauber