

Der Einfluss der Wirtszell-Interferonantwort auf die Influenza-Impfstoffproduktion in MDCK-Zellen

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktoringenieur
(Dr.-Ing.)

von Dipl.-Ing. (FH) Claudius Seitz

geb. am 22.10.1981 in Hagen, NRW

genehmigt durch die Fakultät für Verfahrens- und Systemtechnik
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Promotionskommission

Vorsitz: Prof. Dr. Andreas Seidel-Morgenstern

Gutachter: Dr. Hansjörg Hauser

Prof. Dr. Timm Harder

Prof. Dr. Udo Reichl

eingereicht am 04. September 2012

Promotionskolloquium am 19. Dezember 2012

Kurzfassung

Madin-Darby canine kidney (MDCK) Zellen sind eine gängige Wirtszelllinie für die Herstellung zellkulturbasierter Influenza-Impfstoffe. Diese Zellen sind permissiv für ein breites Spektrum von Influenza-Viren und produzieren hohe Virustiter. In einer vorangehenden Proteomstudie unserer Arbeitsgruppe zeigte sich jedoch, dass Mx1 (myxovirus resistance protein 1) in Influenza-virusinfizierten MDCK-Zellen stark induziert wird. Die Induktion von Mx1 ist ein allgemein anerkannter Marker für Interferonaktivität. In der Literatur ist die Interferonantwort der Wirtszellen als starker inhibitorischer Faktor für die Influenza-Virusreplikation beschrieben. In dieser Arbeit sollte daher der limitierende Einfluss dieser Interferonantwort auf die Influenza-Virusausbeute in der MDCK-zellkulturbasierten Impfstoffproduktion untersucht werden.

Als erstes wurden die Induktion von Interferon (IFN) und die nachfolgende Aktivierung des IFN-induzierten Mx1 für verschiedene Influenza-Virusstämme untersucht. Durch A/PR/8/34-delNS1 - ein Virusstamm, dem der IFN-Antagonist NS1 (nonstructural protein 1) fehlt - wurden IFN- β und Mx1 stark induziert. Für die Impfstoffproduktion werden gegenwärtig aber Wildtypstämme oder High Growth Reassortanten verwendet, die über NS1 verfügen. Von den in dieser Arbeit untersuchten Wildtypstämmen zeigte nur PR8-NIBSC eine deutlich messbare Mx1-Aktivierung, wogegen alle anderen die IFN-Antwort nur schwach induzierten. Hohe Mengen nicht-infektiöser, „defective interfering“ Viruspartikel (DI-Partikel) im PR8-NIBSC Saatmaterial waren für die vergleichbar starke IFN-Induktion durch diesen Virusstamm verantwortlich. Wurde der Anteil DI-Partikel durch Passagieren von PR8-NIBSC bei geringer MOI (multiplicity of infection) reduziert, verringerte sich auch die IFN-Induktion. Solange also NS1-kompetente Virusstämme verwendet werden und das Auftreten großer Mengen DI-Partikel vermieden wird, ist bei der Impfstoffproduktion in MDCK-Zellen nur eine schwache Aktivierung der IFN-Antwort zu erwarten.

Entsprechend sollte die IFN-Antwort die Replikation von Wildtypstämmen nur in geringem Maße hemmen. Tatsächlich verbesserte eine Unterdrückung der IFN-Antwort durch transiente Überexpression viraler IFN-Antagonisten (Influenza A/PR/8/34 NS1 oder Tollwutvirus Phosphoprotein) nur die Virusreplikation von PR8-delNS1, nicht jedoch von Wildtypstämmen. Diese Beobachtung traf für unterschiedliche MOIs zu. Von unserer Arbeitsgruppe wurden mehrere Ursachen für diesen ungewöhnlich geringen, inhibitorischen Einfluss der IFN-Antwort in MDCK-Zellen ermittelt. So zeigt diese Doktorarbeit, dass das bei der Impfstoffproduktion verwendete Trypsin (pankreatisches Trypsin aus Schweinen, Konzentration 5 BAEE U/mL bzw. 4,5 μ g/mL) effektiv IFN proteolytisch abbaut und auf diese Weise die IFN-Antwort reduziert. Trypsin wird bei der Impfstoffproduktion zur Spaltung des viralen Hämagglutinins eingesetzt. Influenza-Viren sind erst

nach HA-Spaltung infektiös, so dass Trypsin bei geringer MOI die Ausbreitung der Infektion in mehreren Infektionswellen auf alle verfügbaren Zellen („multi-cycle replication“) ermöglicht. In dieser Arbeit wurden bei Verzicht auf Trypsinzugabe eine stärkere IFN- und Apoptoseinduktion sowie geringere Virustiter beobachtet. Gleichzeitig verzögerte die Abwesenheit von Trypsin den Infektionsverlauf, jedoch fand trotzdem noch multi-cycle Virusreplikation statt. Eine unvollständige Infektion aller Zellen konnte daher als Ursache für die geringeren Virustiter in Abwesenheit von Trypsin ausgeschlossen werden. Dagegen verbesserte eine transiente Überexpression viraler IFN-Antagonisten in Abwesenheit von Trypsin den Titer für delNS1 deutlich. Weiterhin konnten durch eine trypsinunabhängige Beschleunigung des Infektionsverlaufs auch in Abwesenheit von Trypsin trotz stärkerer IFN-Induktion nahezu dieselben Virustiter erreicht werden wie mit Trypsin beobachtet. Entsprechend verhindert Trypsin wahrscheinlich auf zweierlei Weise einen limitierenden Einfluss der IFN-Antwort auf die Influenza-Impfstoffproduktion in MDCK-Zellen. Zum einen bleibt durch den schnellen Infektionsfortschritt in Anwesenheit von Trypsin nicht genügend Zeit zum Aufbau der IFN-induzierten, antiviralen Abwehrmechanismen der Wirtszellen. Zum anderen reduziert trypsinvermittelter, proteolytischer IFN-Abbau die IFN-Signaltransduktion.

Zusammenfassend beugen die aktuell verwendeten Prozessbedingungen bei MDCK-zellkulturbasierter Influenza-Impfstoffproduktion einem negativen Einfluss der IFN-Antwort auf die Virusausbeuten vor. Durch Verwendung NS1-kompetenter Impfstämme wird IFN bei der Virusinfektion nur schwach induziert. Gleichzeitig verhindern trypsinvermittelter IFN-Abbau und schneller Infektionsfortschritt einen inhibitorischen Effekt der verbleibenden IFN-Antwort auf die Virusreplikation.

Abstract

Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells are a common substrate for cell culture-based influenza vaccine production. These cells are highly susceptible to a wide range of influenza virus strains and produce high virus titers. Yet, our group observed a strong up-regulation of the myxovirus resistance protein 1 (Mx1) in a proteome study of influenza virus-infected MDCK cells. Mx1 is a widely accepted marker for interferon (IFN) activity. Activation of the type I IFN response is described as a factor strongly inhibiting influenza virus replication. Therefore the limiting impact of IFN signaling on influenza virus yields in MDCK cell culture-based vaccine manufacturing was analyzed.

First, IFN- β induction and corresponding up-regulation of the IFN induced Mx1 were analyzed for a set of influenza virus strains. Strong induction of both genes was detected for influenza A/PR/8/34-delNS1 (PR8-delNS1), a virus strain lacking the IFN-antagonist nonstructural protein 1 (NS1). However, NS1 competent wild type (wt) strains or high growth reassortants are currently used for vaccine manufacturing. Just one of the tested wt strains, PR8-NIBSC, showed robust activation of Mx1, whereas only weak induction of IFN signaling was observed for the others. A high content of non-infectious, defective interfering (DI) virus particles was responsible for the comparably strong IFN activation found for PR8-NIBSC. Reduction of DI particles by passaging this strain at low multiplicity of infection efficiently decreased IFN induction. Therefore, only weak induction of IFN signaling is expected during vaccine manufacturing in MDCK cells, as long as NS1 competent virus strains with low content of DI particles are used.

Consequently, IFN signaling should inhibit replication of wt virus strains only weakly. Inhibition of IFN signaling by transient expression of the viral IFN antagonists influenza A/PR/8/34 NS1 or rabies virus phosphoprotein indeed only enhanced replication of PR8-delNS1, but not of wt strains. This observation was valid for different multiplicities of infection. Several reasons for this unusually low inhibitory potential of IFN signaling in MDCK cells were identified by our group. In this thesis we found that a trypsin concentration of 5 BAEE U/mL (4.5 μ g/mL porcine trypsin) used in vaccine manufacturing efficiently degraded secreted IFN, which interfered with IFN signaling. The medium used for virus infection is commonly supplemented with low concentrations of trypsin to ensure the cleavage of hemagglutinin, which is necessary for multi-cycle replication. However, trypsin-free infections showed stronger induction of IFN signaling and apoptosis, causing lower virus yields. Absence of trypsin delayed, but did not prevent multi-cycle virus replication in MDCK. Thus, incomplete infection can be ruled out as the reason for the lower yields. Suppression of IFN signaling by overexpression of viral IFN antagonists clearly improved PR8-delNS1 titres in the absence of trypsin. Furthermore, a trypsin-independent acceleration of virus infection was sufficient to almost restore virus yields in experiments without trypsin, despite higher extracellular IFN levels. Therefore,

addition of trypsin likely limits the impact of IFN signaling on influenza virus replication in MDCK cells by two means. On the one hand, an enhanced virus spread outruns the induction of the antiviral state and on the other hand, proteolytic degradation of IFN keeps cellular defense at a low level.

In summary, current process conditions in MDCK cell culture-based vaccine production obviate a negative impact of IFN signaling on virus yields. Due to the use of NS1 competent virus strains, IFN is induced only weakly during virus replication. In parallel, trypsin mediated proteolytic IFN degradation and fast virus propagation prevent a negative effect of the remaining IFN levels.

Inhaltsverzeichnis

1	Motivation und Aufgabenstellung	1
2	Theoretische Grundlagen.....	3
2.1	Das Influenza-Virus.....	3
2.1.1	Aufbau von Influenza A-Viren	3
2.1.2	Virusreplikation.....	4
2.1.3	Epidemiologie.....	6
2.1.4	Antivirale Medikamente.....	7
2.1.5	Influenza-Impfstoffe.....	8
2.2	Influenza-Impfstoffproduktion	10
2.3	Interferon	11
2.3.1	Typ I-Interferone	11
2.3.2	Interferoninduktion.....	12
2.3.3	IFN-induzierte antivirale Mechanismen.....	14
2.3.3.1	IFITM-Proteine.....	14
2.3.3.2	Mx-Proteine.....	15
2.3.3.3	Das OAS/RNaseL-System.....	15
2.3.3.4	PKR.....	16
2.3.3.5	Viperin	16
2.3.3.6	ISG15.....	16
2.3.3.7	IFN und Apoptose.....	16
2.3.4	Virale Gegenmaßnahmen	17
2.3.4.1	Das NS1-Protein.....	17
2.3.4.2	NS1-unabhängige Mechanismen.....	18
2.3.4.3	Ebola-Virus VP35 und Tollwut-Virus P.....	19
2.4	Der Einfluss nicht-infektiöser Viruspartikel auf Virusreplikation und IFN-Induktion.....	20
2.5	HA-Spaltung durch Trypsin.....	21
3	Material und Methoden.....	23
3.1	Puffer und Medien für die Zell- und Viruskultur	23
3.1.1	Zellkultur- und Virusinfektionsmedium	23
3.1.2	Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS).....	23
3.1.3	10-fach Trypsinlösung für das Passagieren von Zellen	23
3.1.4	500 U/mL Trypsinlösung für die Infektion von MDCK-Zellen mit Influenza-Viren.....	24
3.2	Primer für qPCR- und reverse Transkriptase-Reaktionen	24
3.3	Plasmide	25
3.4	Zell- und Viruskultivierung.....	25
3.4.1	Kultivierung von MDCK-Zellen	25
3.4.2	Passagieren von MDCK-Zellen.....	26
3.4.3	Transfektion von MDCK-Zellen.....	26

3.4.3.1	Chemische Transfektionsmethoden.....	26
3.4.3.1.1	Metafectene Pro	27
3.4.3.1.2	Lipofectamine 2000	27
3.4.3.1.3	Lipofectamine LTX.....	27
3.4.3.2	Chemische Transfektion frisch ausgesäter MDCK-Zellen.....	27
3.4.3.3	Nucleofector.....	28
3.4.3.4	Elektroporation mit dem Microporator	28
3.4.4	Infektion mit Influenza-Viren	29
3.4.5	Herstellung eines PR8-NIBSC Saatvirus mit hohem Anteil infektiöser Viren an der Gesamtpartikelzahl (21,3 %).....	30
3.4.6	Thermische und chemische Inaktivierung von Influenza-Viren.....	30
3.4.7	Stimulation von MDCK-Zellen mit konditioniertem Medium	31
3.5	Analytik.....	31
3.5.1	Zellzahlbestimmung	31
3.5.2	HA-Assay.....	31
3.5.3	TCID ₅₀	32
3.5.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	32
3.5.5	Genexpressionsbestimmung mit quantitativer reverse Transkriptase PCR	32
3.5.5.1	Probenahme	32
3.5.5.2	Isolation der zellulären RNA	33
3.5.5.3	Reverse Transkription der zellulären RNA.....	33
3.5.5.4	qPCR.....	33
3.5.5.5	Berechnung der relativen Genexpression	34
3.5.6	Bestimmung von Virustitern mittels qRT-PCR	35
3.5.7	Luciferasebasierte Reporter-Gen-Assays in MDCK-Zellen	35
3.5.7.1	Transfektion von Reportervektoren.....	35
3.5.7.2	Probenahme für den Reporter-Gen-Assay.....	36
3.5.7.3	Bestimmung der Luciferaseaktivität.....	36
3.5.7.4	Berechnung der relativen Induktion der Reportervektoren	37
3.5.8	Proteinanalytik	37
3.5.8.1	RIPA-Puffer	37
3.5.8.2	Probenahme für die Western Blot-Analyse von IFN- β aus dem Kulturüberstand von infizierten MDCK-Zellen	38
3.5.8.3	Probenahme für die Western Blot-Analyse von viralen Proteinen aus dem Kulturüberstand von infizierten MDCK-Zellen	38
3.5.8.4	Probenahme für die Western Blot-Analyse von zellulären Proteinen	38
3.5.8.5	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	39
3.5.8.6	SDS-PAGE / Western Blot	39
3.5.8.7	SYPRO Ruby Färbung von SDS-PAGE Gelen.....	39
3.5.9	Durchflusszytometrische Untersuchung des Infektionsgrades und der Apoptose-Induktion	40
3.5.10	Fluoreszenzmikroskopie.....	40

3.5.11	Statistik.....	40
3.6	Vektorproduktion in <i>E. coli</i>	40
3.6.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	40
3.6.2	Transformation von <i>E. coli</i>	40
3.6.3	Plasmid-Anzucht und –Präparation.....	41
4	Ergebnisse	42
4.1	Methodenetablierung und Datenqualität	42
4.1.1	Etablierung einer effizienten Transfektionsmethode für MDCK-Zellen.....	42
4.1.2	Reporter-Gen-Assays in MDCK-Zellen.....	44
4.1.3	Datenqualität	46
4.1.3.1	Lineare Messbereiche und PCR-Effizienzen der qRT-PCR-Assays	46
4.1.3.2	Reproduzierbarkeit von Versuchsergebnissen.....	49
4.2	Aktivierung der IFN-Antwort in Influenza-virusinfizierten MDCK-Zellen	53
4.3	Der Beitrag nicht-infektiöser Viruspartikel zu der IFN-Induktion.....	55
4.3.1	IFN-Induktion durch Hitze- und β -Propiolacton-inaktivierte Influenza-Viren.....	55
4.3.2	Einfluss nicht-infektiöser Viruspartikel auf die IFN-Induktion in der frühen Phase der Virusinfektion	57
4.3.3	Beeinträchtigung der Virusreplikation durch nicht-infektiöse Viruspartikel	59
4.4	Unterdrückung der Interferonantwort.....	61
4.4.1	Unterdrückung der IFN-Antwort durch Überexpression von NS1 – verschiedene Influenza-Virusstämme	61
4.4.2	Unterdrückung der IFN-Antwort durch Überexpression von NS1 – verschiedene MOIs	62
4.4.3	Unterdrückung der IFN-Antwort durch Überexpression von Rabies-Virus P und Ebola-Virus VP35	63
4.5	Der Einfluss von Trypsin auf die IFN-Antwort	66
4.5.1	Aktivierung der IFN-Antwort in Gegenwart und Abwesenheit von Trypsin	66
4.5.1.1	Influenza-Virusreplikation und IFN-Induktion in An- und Abwesenheit von Trypsin.....	66
4.5.1.2	Hemmung der IFN-Antwort durch unterschiedliche Trypsinkonzentrationen	68
4.5.1.3	Aktivierung des IFN-induzierten, antiviralen Status in Gegenwart und Abwesenheit von Trypsin auf Proteinebene.....	70
4.5.2	Die Ursache für die Reduktion des IFN-Antwort in Gegenwart von Trypsin	72
4.5.2.1	Proteolytischer Abbau von IFN durch Trypsin.....	72
4.5.2.2	Der Einfluss der Infektionsdynamik auf die IFN-Induktion.....	74
4.5.2.2.1	Einfluss einer Beschleunigung der Infektionsdynamik in Abwesenheit von Trypsin auf die IFN-Antwort.....	75
4.5.2.2.2	Einfluss einer verlangsamten Infektionsdynamik in Anwesenheit von Trypsin auf die IFN-Induktion.....	77

4.5.3	Der Einfluss von Trypsin auf das inhibitorische Potential des IFN-induzierten antiviralen Status.....	78
4.5.3.1	Die Bedeutung von Trypsin für die Replikation von delNS1 in MDCK-Zellen.....	78
4.5.3.2	Trypsinvermittelte Überwindung des IFN-induzierten, antiviralen Status in Influenza-virusinfizierten MDCK-Zellen	81
5	Diskussion.....	85
5.1	Methodenetablierung und Datenqualität	85
5.1.1	Etablierung einer effizienten Transfektionsmethode für MDCK-Zellen.....	85
5.1.2	Reporter-Gen-Assays in MDCK-Zellen.....	85
5.1.3	Datenqualität	86
5.2	Aktivierung der IFN-Antwort in Influenza-virusinfizierten MDCK-Zellen	89
5.3	Der Beitrag nicht-infektiöser Viruspartikel zu der IFN-Induktion.....	91
5.4	Unterdrückung der Interferonantwort.....	94
5.5	Der Einfluss von Trypsin auf die IFN-Antwort	97
5.5.1	IFN-Signaltransduktion in Gegenwart und Abwesenheit von Trypsin	97
5.5.2	Die Ursache für die Reduktion der IFN-Antwort in Gegenwart von Trypsin.....	98
5.5.3	Bedeutung von trypsinvermittelter, schneller Infektionsdynamik und IFN-Abbau für die Virusproduktion.....	100
5.5.3.1	Die Bedeutung von Trypsin für die Replikation von delNS1 in MDCK-Zellen.....	100
5.5.3.2	Trypsinvermittelte Überwindung des IFN-induzierten, antiviralen Status in Influenza-virusinfizierten MDCK-Zellen	102
5.5.4	Bedeutung der Ergebnisse für die Impfstoffproduktion in MDCK-Zellen	103
6	Zusammenfassung.....	106
7	Ausblick	109
8	Verzeichnisse.....	111
8.1	Literaturverzeichnis	111
8.2	Abbildungsverzeichnis	127
8.3	Tabellenverzeichnis	128
9	Anhang	129
9.1	Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien	129
9.2	Verwendete Chemikalien und Kits	131
9.3	Arbeitsanweisungen	133
9.3.1	M 02: Herstellung von Glasgow-MEM-Vollmedium aus gebrauchsfertigen Teillösungen	133
9.3.2	M 03: Herstellung von Glasgow-MEM-Medium aus Pulvermedium	135
9.3.3	Z 02: Auftauen von MDCK-Zellen	137
9.3.4	Z 04: Passagieren von MDCK-Zellen in serumhaltigem Medium	138
9.3.5	Kurzanleitung Zellzählgerät ViCell XR.....	141
9.3.6	V05: HA-Assay	144
9.3.7	V 08: Bestimmung des TCID ₅₀	149
9.3.8	Chemische Inaktivierung von Influenza-Viren mit β -Propiolacton	154
9.3.9	MoBi 1: Western Blot mit anschließender Immundetektion.....	163

9.4	Veröffentlichungen über Teilgebiete der Dissertation.....	167
9.5	Betreute Studien- und Abschlussarbeiten.....	168
9.6	Lebenslauf.....	169

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AP1	Aktivatorprotein 1
CM	Konditioniertes Medium
CPSF30	cleavage and polyadenylation specificity factor 30
DI-Partikel	defective interfering Partikel
diRNA	defective interfering RNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
eIF2 α	eukaryotic initiation factor 2 α
EMA	European Medicines Agency
ER	endoplasmatisches Retikulum
FADD	Fas-associated protein with death domain
FCS	fetales Kälberserum
GMEM	Glasgow Minimum Essential Medium
HA	Hämagglutinin
HAT	human airway trypsin-like protease
HGR	high growth reassortant
IFITM	Interferon-induzierbare transmembran Proteine
IFN	Interferon
IFNAR	Typ-I IFN-Rezeptor
IKK ϵ	inhibitor of kappa B kinase ϵ
IPS-1	IFN- β promoter stimulator 1
IRF3	interferon regulatory factor 3
IRF7	interferon regulatory factor 7
ISG	Interferon stimuliertes Gen
ISGF-3	IFN-stimulated gene factor 3
ISRE	Interferon stimulated response element
JAK	Januskinase
M1	Matrixprotein
M2	membranständiger Ionenkanal bei Influenza-Viren
MAD	Median absolute deviation
MAP	Mitogen-activated protein kinase
MDCK	Madin-Darby canine kidney
MEF	murine embryonic fibroblast
MOI	multiplicity of infection
mRNA	messenger RNA
Mx	myxovirus resistance protein
NA	Neuraminidase
NEP	nuclear export protein
NF κ B	nuclear factor κ B
NIBSC	National Institute for biological Standards and Control
NP	Nukleoprotein
NS1	Nonstructural Protein 1
OAS	Oligoadenylat Synthetase
P	Phosphoprotein vom Tollwut-Virus

Abkürzung	Bedeutung
PA	Polymerase acidic protein
PABPI	Poly(A)-binding protein I
PB1	Polymerase basic protein 1
PB1-F2	PB1 Frame 2
PB2	Polymerase basic protein 2
PBS	Phosphate-buffered saline
PKR	Proteinkinase R
qRT-PCR	quantitative reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
RIG-I	retinoic acid inducible gene I
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SOCS	suppressor of cytokine signalling
STAT	signal transducers and activators of transcription
TBK-1	TANK-binding kinase-1
TCA	Trichloressigsäure
TCID50	50 % tissue culture infective dose
TMPRSS2	transmembrane protease, serine 2
TRAF3	tumor necrosis factor receptor-associated factor 3
TRIM25	Tripartite motif-containing protein 25
vmRNA	viral messenger RNA
VP35	viral protein 35 des Ebola-Virus
vRNA	genomische virale RNA
VSV	Vesicular stomatitis virus
WHO	World Health Organisation
WT	Wildtyp

1 Motivation und Aufgabenstellung

Die Herstellung von Influenza-Impfstoffen in Zellkultur hat in den letzten Jahren stetig an Bedeutung gewonnen (Audsley & Tannock, 2008). Verglichen mit der konventionellen Impfstoffproduktion in bebrüteten Hühnereiern sind zellkulturbasierte Prozesse flexibler und in ihren Kapazitäten unbegrenzt erweiterbar (Couch, 2008). Madin-Darby canine kidney (MDCK) Zellen, eine kontinuierliche Epithelzelllinie aus der Niere des Cocker Spaniels, sind als Wirtszellen für die Influenza-Impfstoffproduktion in Zellkultur zurzeit am weitesten verbreitet (Patriarca, 2007). Influenza-Impfstoffe aus MDCK-Zellen gelten als sicher in der Anwendung und sind seit kurzem im europäischen Raum zugelassen (Doroshenko & Halperin, 2009). MDCK-Zellen sind permissiv für ein breites Spektrum von Influenza-Viren (Gaush & Smith, 1968) und produzieren hohe Virustiter (Hussain *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009). Die aktuell vorhandenen Kapazitäten sowohl eils auch zellkulturbasierter Prozesse zur Influenza-Impfstoffproduktion reichen jedoch nicht aus, um im Fall einer Influenza-Pandemie den rapide steigenden Impfstoffbedarf zu decken (Lee & Hu, 2012). So konnten während der H1N1-Pandemie von 2009 weltweit nur ca. 500 Millionen Impfdosen produziert werden. Zudem war der pandemische Impfstoff erst verfügbar, als die H1N1-Pandemie ihren Höhepunkt bereits überschritten hatte. Um Influenza-Pandemien zukünftig effektiver begegnen zu können, ist eine Steigerung der Produktionskapazitäten für Influenza-Impfstoffe von entscheidender Bedeutung (Rappuoli & Dormitzer, 2012). Höhere Produktausbeuten bei der zellkulturbasierten Impfstoffherstellung könnten dazu einen Beitrag leisten.

Bei MDCK-zellkulturbasierten Prozessen liegt Potential zur Verbesserung der Virusausbeuten in der Optimierung der Kultivierungsbedingungen (Bock *et al.*, 2011). Daneben berechneten Sidorenko & Reichl (2004) aber auch, dass nur ein Bruchteil der in der Zelle zur Verfügung stehenden Ressourcen für die Virusproduktion genutzt wird. Daher ist davon auszugehen, dass auch Schritte bei der Virusreplikation in der Zelle die Virusproduktion limitieren. Um diese Schritte zu identifizieren, führten Vester *et al.* (2009; 2010b) Proteomstudien für Influenza-virusinfizierten MDCK-Zellen durch. Dabei fiel auf, dass bei der Infektion von den Zellen verstärkt Mx1 (Myxovirus resistance protein 1) exprimiert wird. Mx-Proteine haben in vielen Spezies starke antivirale Aktivität gegen Influenza-Viren und sind weithin als Marker für Interferon-Aktivität bekannt (Haller & Kochs, 2011; Haller *et al.*, 2007). Die Induktion und Sekretion von Interferonen (IFN) ist ein Teil der angeborenen, antiviralen Immunantwort (Randall & Goodbourn, 2008). Sie wird durch Influenza-Viren infolge der Akkumulation viraler RNA in der Wirtszelle induziert. Virale RNA aktiviert RIG-I (retinoic acid inducible gene I), wodurch eine Signalkaskade initiiert wird, die zur Aktivierung des IFN- β Promoters führt. IFN- β wird sekretiert und bindet auto- und parakrin an IFN-Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Dies

induziert den JAK/STAT-Signalweg (JAK: Januskinase, STAT: signal transducers and activators of transcription), der die Expression mehrerer hundert IFN-stimulierter Gene (ISGs) aktiviert. Ein Teil dieser ISGs (z.B. Mx-Proteine) verfügt über potente antivirale Funktionen (García-Sastre, 2011; Hale *et al.*, 2010a).

Isaacs & Lindenmann (1957) entdeckten IFN bei Experimenten mit thermisch inaktivierten Influenza-Viren. Seitdem ist bekannt, dass IFN-Aktivität einen inhibitorischen Einfluss auf die Replikation von Influenza-Viren hat. In der virologischen Grundlagenforschung wurden die Wechselwirkungen zwischen der Influenza-Virusreplikation und der antiviralen IFN-Antwort umfassend analysiert. In dieser Arbeit sollte nun ermittelt werden, ob die antivirale IFN-Antwort einen limitierenden Faktor für die MDCK-zellkulturbasierte Influenza-Impfstoffproduktion darstellt.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Das Influenza-Virus

2.1.1 Aufbau von Influenza A-Viren

Influenza-Viren gehören zur Familie der *Orthomyxoviridae*. Sie kennzeichnet ein segmentiertes RNA-Genom negativer Polarität. Bislang sind die drei Gattungen Influenza A, B und C bekannt. Die Unterscheidung erfolgt anhand der antigenen Eigenschaften ihrer Nukleo- und Matrixproteine. Influenza B Infektionen wurden bislang nur in Menschen und Robben nachgewiesen. Influenza C kommt in Menschen und Schweinen vor. Pandemien wurden bislang jedoch ausschließlich von Influenza A-Viren ausgelöst. Die natürlichen Wirte von Influenza A-Viren sind wahrscheinlich Wasservögel, aber auch ein weites Spektrum anderer Wirte (z.B. Menschen, Schweine, Pferde und Hunde) wird von diesen Viren infiziert (Cheung & Poon, 2007).

Der Aufbau von Influenza A-Viren ist in der Literatur ausführlich beschrieben (Bouvier & Palese, 2008; Cheung & Poon, 2007; Nayak *et al.*, 2009) und schematisch in Abbildung 2-1 dargestellt. Es handelt sich um pleomorphe Partikel mit einer Größe von 80 – 120 nm. Im Kern des Virus befindet sich das virale Genom in Form von acht RNA-Segmenten. Zusammen kodieren diese Segmente für bis zu zwölf virale Proteine (zusammengefasst in Tabelle 2-1), von denen neun am Aufbau der Viruspartikel beteiligt sind. Das NS1

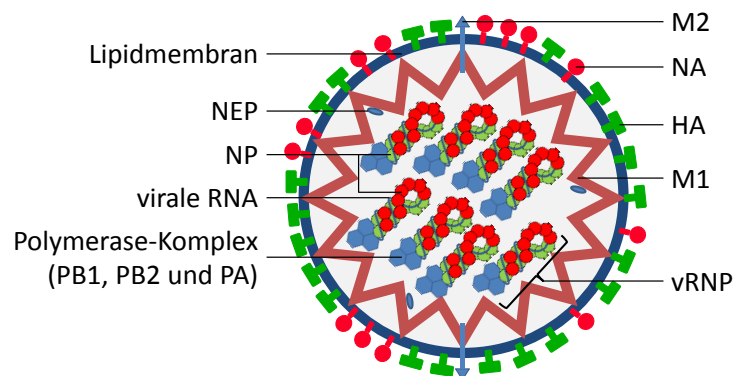


Abbildung 2-1: Aufbau von Influenza A Viren

(Nonstructural Protein 1), PB1-F2 (Polymerase basic protein 1 Frame 2) und N40 treten nur während der Replikation in der Zelle auf. Nicht jeder Influenza A-Stamm bildet PB1-F2 und N40. Die viralen RNA-Segmente liegen im Viruspartikel als vRNPs (virale Ribonukleoprotein-Komplexe) vor. Diese bestehen aus der viralen RNA, den Nukleoproteinen (NP) und dem viralen Polymerase-Komplex (bestehend aus den drei Polymerase-Untereinheiten PB1, PB2 und PA). Weiterhin finden sich im Viruskern geringe Mengen des NEP (Nuclear Export Protein). Der Viruskern wird von einer Proteinhülle aus Matrixproteinen (M1) umschlossen. Auf diese Hülle folgt eine Lipidhülle. Diese stammt von der Wirtszelle, da neu produzierte Influenza-Viren durch Ausschnürung der Zellmembran freigesetzt werden. In diese Lipidhülle sind die drei Membranproteine Hämagglutinin (HA), Neuraminidase (NA) und der Ionenkanal M2 eingebettet. HA und NA sind Glykoproteine und stellen die wesentlichen Antigene von Influenza-Viren dar. Anhand der antigenen Eigenschaften von HA und

NA werden Influenza A-Viren in Subtypen unterteilt. Aktuell sind 16 HA- und 9 NA-Subtypen bekannt. Humanpathogen sind bislang ausschließlich die Subtypen H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7 und H9N2.

Tabelle 2-1: Virale Proteine von Influenza A-Viren und deren Funktionen (Cheung & Poon, 2007; Ludwig *et al.*, 1999)

Segment	Protein	Länge (AA) ¹	Name	Funktion
1	PB2	759	Polymerase basic protein 2	Polymeraseuntereinheit, cap-binding Aktivität
2	PB1	757	Polymerase basic protein 1	Polymeraseuntereinheit, RNA-Polymerase Aktivität
	PB1-F2	87	PB1 Frame 2	pro-apoptotisch, pro- inflammatorisch, steigert virale Polymerase-Aktivität ²
	N40	718	---	Funktion bislang nicht bekannt ³
3	PA	716	Polymerase acidic protein	Polymeraseuntereinheit, Endonuklease-Aktivität, spaltet Cap-Strukturen von zellulären RNAs ab ⁴
4	HA	560	Hämagglutinin	Membranprotein, Hauptantigen von Influenza-Viren, verantwortlich für Rezeptorbindung, Fusion von viraler und endosomaler Membran
5	NP	498	Nukleoprotein	bindet und stabilisiert virale RNA in vRNPs, vermittelt Transport der vRNPs in den Zellkern
6	NA	454	Neuraminidase	Membranprotein, Sialinsäure-degradierende Aktivität, vermittelt die Freisetzung der Viren
7	M1	252	Maxtrixprotein	Strukturprotein, regulierende Funktion bei der Transkription, Funktionen bei Virus-Assembly und -freisetzung
	M2	97	Membranprotein	Ionenkanal, pH-Regulation im Viruspartikel
8	NS1	230	Nonstructural Protein 1	Multifunktional, vgl. 2.3.4.1., Interferonantagonist
	NEP	121	Nuclear export Protein	Kernexportfaktor, essentiell für vRNP-Export

¹ AA – Aminosäuren, Längen angegeben für A/PR/8/34; ²Krumbholz *et al.* (2011); ³Wise *et al.* (2009); ⁴Dias *et al.* (2009)

2.1.2 Virusreplikation

Der Replikationszyklus von Influenza A-Viren ist in der Literatur ausführlich beschrieben (Basler, 2007; Bouvier & Palese, 2008; Cheung & Poon, 2007; Sidorenko & Reichl, 2004). Die wesentlichen Schritte sind im Folgenden zusammengefasst und in Abbildung 2-2 schematisch dargestellt.

Bei der Infektion binden Influenza A-Viren über die HA1-Untereinheit ihrer HA-Proteine an Sialinsäure-Bestandteile zellulärer Rezeptoren. Anschließend werden sie von der Zelle überwiegend durch Clathrin-abhängige, rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen (Sieczkarski & Whittaker, 2002). Im späten Endosom kommt es zur Auflösung der Viruspartikel. Bei saurem pH-Wert im Endosom wird der virale Ionenkanal M2 aktiviert, so dass der pH-Wert im Virusinneren fällt. Dies

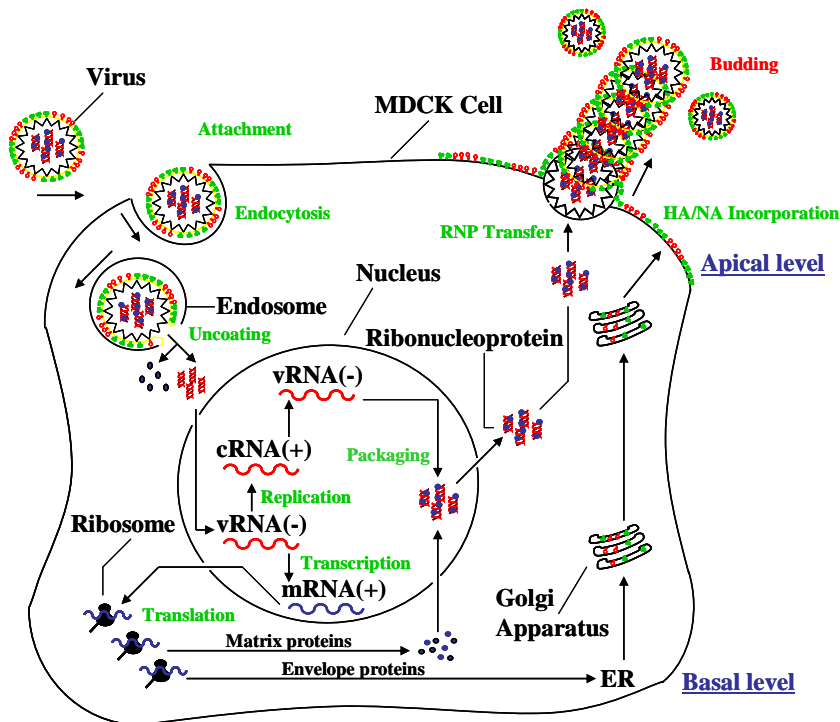


Abbildung 2-2: Schematische Darstellung der Influenza A-Virusreplikation (Sidorenko & Reichl, 2004; modifiziert). Die dargestellten Vorgänge sind im Text erläutert.

bewirkt eine Konformationsänderung beim HA. Daraufhin vermittelt die Untereinheit HA2 des HAS die Fusion von viraler und endosomaler Membran. Voraussetzung für die Membranfusion ist, dass HA (in nicht-gespaltener Form als HA0 bezeichnet) zuvor durch Wirtspoteasen in HA1 und HA2 gespalten wurde (vgl. 2.5). Bei der Fusion von endosomaler und viraler Membran werden die viralen vRNPs aus dem Viruskern in das Zytoplasma der Wirtszelle freigesetzt. NP und der virale Polymerasekomplex enthalten Kernlokalisierungssignale, so dass die vRNPs durch die Wirtszelle in den Zellkern transportiert werden (Cros & Palese, 2003).

Im Kern findet zunächst die Transkription der viralen RNA statt. Die Replikation der viralen RNA erfolgt erst nach Neusynthese viraler Proteine. Der Mechanismus der Regulation von viraler RNA-Transkription und –Replikation ist Gegenstand aktueller Forschung und bislang nicht eindeutig geklärt (Perez *et al.*, 2010; Resa-Infante *et al.*, 2011). Die Transkription wird durch die „cap-snatching“-Aktivität des viralen Polymerasekomplexes initiiert. Dabei bindet PB2 zelluläre mRNAs, woraufhin PA deren 5'-Cap-Struktur abtrennt (Dias *et al.*, 2009). Die Abspaltung erfolgt etwa 9 bis 17 Nukleotide vom 5'-Ende der mRNA entfernt. Das 5'-Cap Fragment dient anschließend als Primer für die virale mRNA-Synthese. Virale mRNAs (vmRNA) werden durch das sogenannte Stottern („stuttering“) der viralen RNA-Polymerase an einem Uridin-Abschnitt 15 – 22 Nukleotide vor dem 5'-Ende der vRNA polyadenyliert. Durch mehrfaches Ablesen dieses Abschnitts erhalten die vmRNAs einen Poly(A)-Schwanz. Die weitere Prozessierung der vmRNAs, z.B. das Splicing der von Segment 7

und Segment 8 transkribierten vmRNAs, erfolgt durch die zelluläre Transkriptions- und Translationsmaschinerie (Neumann *et al.*, 2004).

Nach Export in das Zytoplasma werden die vmRNAs an den zellulären Ribosomen translatiert. Die viralen Membranproteine HA, NA und M2 gelangen nach der Translation in das endoplasmatische Retikulum (ER), wo HA und NA glykosyliert werden. Anschließend werden sie über den Golgi-Apparat zur Zellmembran der Wirtszelle transportiert und in diese integriert. Die viralen Membranproteine enthalten apikale Lokalisationssignale, so dass sie sich auf der apikalen Seite der Zelle anreichern (Nayak *et al.*, 2009). Die neu entstandenen Virusproteine PB1, PB2, PA, NEP, NP und M1 werden dagegen in den Kern transportiert. Dort findet nun die Replikation der viralen RNA statt. Hierzu wird durch die vRNPs zunächst Primer-unabhängig eine komplementäre cRNA positiver Polarität gebildet. Diese cRNA dient im nächsten Schritt als Template für die Synthese neuer genomischer viraler RNA (vRNA). Neusynthetisierte vRNAs bilden zusammen mit PB1, PB2, PA und NP neue vRNPs. Diese können entweder zur viralen Transkription beitragen oder werden aus dem Kern zur apikalen Zellmembran exportiert (Resa-Infante *et al.*, 2011). Der Kernexport von vRNPs wird durch M1 vermittelt, indem es vRNPs mit dem viralen Kernexportfaktor NEP und dem zellulären Exportrezeptor CRM1 verbindet (Whittaker & Digard, 2006). An der Zellmembran löst die Interaktion der vRNPs mit den zytoplasmatischen Enden der membrangebundenen viralen Proteine HA, NA und M2 eine Ausknospung der Zellmembran aus („budding“). Die Abschnürung dieser Knospe setzt ein neues Viruspartikel frei. Dabei verhindert die Neuraminidase ein erneutes Binden des Viruspartikels an die Oberfläche der Wirtszelle, sowie das Aggregieren neuer Viruspartikel untereinander (Nayak *et al.*, 2009).

2.1.3 Epidemiologie

Influenza-Viren stellen eine anhaltende Gefahr für die menschliche Gesundheit dar. Die Ursache dafür liegt in der kontinuierlichen Veränderung der antigenen Eigenschaften dieser Viren durch Antigen Shift und Antigen Drift.

Die jährlich wiederkehrenden, saisonalen Influenza-Epidemien entstehen überwiegend durch Antigen Drift. Durch Fehler der viralen RNA-Polymerase kommt es bei der Virusreplikation zu Punktmutationen im viralen Genom (ca. 1 Fehler pro repliziertes Virusgenom; Drake, 1993; Boivin *et al.*, 2010). Dabei werden durch den Selektionsdruck des Immunsystems solche Mutationen begünstigt, die zu einer Veränderung der viralen Oberflächenproteine führen und so eine Erkennung des Virus durch das Immunsystem verhindern (Medina & García-Sastre, 2011). Ein Aufbau eines anhaltenden Schutzes vor Influenza-Viren durch die adaptive Immunabwehr des Wirtes ist entsprechend nicht möglich. Infolgedessen erkranken an der saisonalen Grippe in Deutschland jedes Jahr etwa 5-20 % der Bevölkerung (RKI, 2011). Nach Schätzungen werden weltweit jährlich drei bis

fünf Millionen schwere Fälle der Influenza-Grippe registriert und zwischen 250.000 und 500.000 Menschen sterben an den Folgen (WHO, 2009). Ältere Menschen und Kinder sind besonders gefährdet (Kuiken & Taubenberger, 2008). Der wirtschaftliche Schaden durch grippebedingte Arbeitsausfälle ist immens (Keech & Beardsworth, 2008).

Influenza-Pandemien werden in der Regel durch Antigen Shift ausgelöst (Fislova & Kostolansky, 2005). Dabei findet zwischen zwei oder mehreren Virusstämmen bei Ko-Infektion eines Wirtes ein Austausch viraler Genomsegmente statt (Wilschut & McElhaney, 2005). Dieser Vorgang wird als Reassortierung bezeichnet und kann auch zwischen Stämmen mit unterschiedlichem Wirtsspektrum erfolgen. So ist zum Beispiel das pandemische H1N1-Virus von 2009 in Schweinen durch mehrschrittige Reassortierung von Influenza-Viren aviären, humanen und porcinen Ursprungs entstanden (Garten *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2009). Dieses neue Virus war humanpathogen, enthielt aber Oberflächenantigene von Influenza-Viren, die zuvor in Schweinen zirkulierten. Entsprechend bestand in Menschen gegen dieses Virus kein Immunschutz, so dass es sich innerhalb eines Jahres ausgehend von Mexiko weltweit ausbreiten und nach Schätzungen 15-40 % der Weltbevölkerung infizieren konnte (Girard *et al.*, 2010). Die Entstehung solcher pandemischer Influenza-Viren kann sich jederzeit wiederholen. So starben 1918 weltweit 50-100 Millionen Menschen an der spanischen Grippe (Johnson & Mueller, 2002). Aktuell geht von den bislang nur in aviären Systemen zirkulierenden H5N1-Stämmen eine potentielle Pandemiegefahr aus (Eichelberger *et al.*, 2008). Vereinzelt wurden bereits Übertritte dieser Viren von Vögeln auf Menschen beobachtet, die zu mehr als der Hälfte tödlich verliefen (Friede *et al.*, 2011). Eine Weitergabe von Mensch zu Mensch hat allerdings noch nicht stattgefunden.

2.1.4 Antivirale Medikamente

Um Influenza-Erkrankungen zu begegnen sind zur Zeit die Neuraminidase-Hemmer Zanamivir und Oseltamivir, sowie der M2-Blocker Amantadin als antivirale Medikamente zugelassen (Leyssen *et al.*, 2008; RKI, 2011). Diese Medikamente schränken die Ausbreitung der Virusinfektion im Körper ein. Bei Inhibition der viralen Neuraminidase durch Zanamivir und Oseltamivir können neu gebildete Viren sich nicht von der Zelloberfläche lösen. Amantadin verhindert durch Blockade des M2-Ionenkanals die Freisetzung der viralen RNA in der Zelle. Aktuelle saisonale H3N2-Stämme sind jedoch in der Regel Amantadin-resistent und auch gegen das pandemische H1N1-Virus von 2009 war dieses Medikament unwirksam. Weiterhin wirkt Amantadin nicht gegen Influenza B. Amantadin wird heute entsprechend nur noch selten eingesetzt. Stattdessen wird überwiegend auf Neuraminidase-Hemmer zurückgegriffen. Diese Medikamente wirken gegen Influenza A und B. Resistenzbildungen wurden bislang nur selten beobachtet. Zwar traten ab 2007/2008 Oseltamivir-resistente H1N1-Stämme auf, allerdings konnten diese mit Zanamivir erfolgreich behandelt werden. Auch das

pandemische H1N1-Virus von 2009 war gegen Zanamivir und Oseltamivir anfällig. Neuraminidase-Hemmer können den Krankheitsverlauf um 0,5 bis 2,5 Tage verkürzen, wenn mit der Behandlung innerhalb von 48 h nach Feststellung erster Krankheitssymptome begonnen wird (Shun-Shin *et al.*, 2009). Zanamivir und Oseltamivir eignen sich auch zur Influenzaphylaxe (Jefferson *et al.*, 2009). Klinischen Krankheitssymptomen können so verhindert werden (Fiore *et al.*, 2011). Vor der Virusinfektion schützt die präventive Einnahme von Neuraminidase-Inhibitoren jedoch nicht, da diese Medikamente das Virus nicht neutralisieren. Auch eine Weitergabe des Virus wird nicht verhindert (Khazeni *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010). Zur Eindämmung von Pandemien eignen sich Neuraminidase-Inhibitoren daher nur in Kombination mit z.B. Hygiene-, Desinfektions- und Isolationsmaßnahmen, die die Transmission der Grippeviren in der Bevölkerung verhindern (Jefferson *et al.*, 2011).

2.1.5 Influenza-Impfstoffe

Impfstoffe stellen den effektivsten Weg dar, saisonalen und pandemischen Influenza-Viren zu begegnen. Präventive Immunisierung durch Impfstoffe schützt individuell vor den gesundheitlichen Folgen der Grippe und beugt gleichzeitig der Ausbreitung von Influenza-Viren in der Bevölkerung vor. Saisonale Grippeimpfstoffe sind üblicherweise trivalent, d.h. sie enthalten die Oberflächen-Antigene je eines H1N1- und eines H3N2-Influenza A-Stamms sowie eines Influenza B-Stamms (Genzel & Reichl, 2009). Um in Anbetracht des Antigen Drifts anhaltenden Schutz zu gewährleisten, wird die Zusammensetzung des Impfstoffes jedes Jahr an die aktuell zirkulierenden Influenza-Virusstämme angepasst. Für anhaltenden Immunschutz muss die Impfung entsprechend jährlich wiederholt werden. Die Festlegung der Impfstämme erfolgt für nördliche und südliche Hemisphäre getrennt durch die WHO.

Pandemische Influenza-Impfstoffe können bei der Bekämpfung von Influenza-Pandemien eine Schlüsselrolle spielen (Leroux-Roels & Leroux-Roels, 2009). Durch frühzeitige, flächendeckende Impfung der Bevölkerung könnte die Ausbreitung einer Pandemie effektiv eingedämmt werden. Die rechtzeitige Produktion ausreichender Impfstoffmengen ist jedoch kritisch. So waren Impfstoffe gegen das pandemische H1N1 von 2009 erst nach dem Höhepunkt der weltweiten Pandemie in genügender Menge verfügbar (Cox, 2011). Um solche Probleme zu vermeiden, werden sogenannte präpandemische Impfstoffe produziert. Diese Impfstoffe enthalten Antigene von Virustämmen mit pandemischem Potential und werden von einigen Staaten prophylaktisch bevorratet. Es wird davon ausgegangen, dass die Impfung mit präpandemischen Impfstoffen zumindest Kreuzimmunität und somit Schutz vor zirkulierenden pandemischen Viren vermittelt (Rockman & Brown, 2010). So berechneten Ferguson *et al.* (2006), dass die Impfung von 20 % der US-Bevölkerung mit präpandemischem Impfstoff bei einem H5N1-Ausbruch den Verlauf der Pandemie erheblich verlangsamen und die Ansteckungsrate deutlich verringern würde.

Saisonale und pandemische Influenza-Viren werden üblicherweise vor ihrer Verwendung als Impfstoff reassortiert. Ziel dieser Reassortierung ist ein Virus mit guten Wachstumseigenschaften („High Growth Reassortant“) für die Impfstoffproduktion, das gleichzeitig die HA- und NA-Sequenzen der Impfstämme enthält. Klassisch erfolgt dies durch Ko-Kultivierung der Impfstämme mit bekannten, gut wachsenden Influenza A-Stämmen (Backbone). Als Backbone wird dabei für inaktivierte Impfstoffe meist Influenza A/Puerto Rico/8/34 (PR8) verwendet (Fulvini *et al.*, 2011). Anschließend werden geeignete Kandidaten für die Impfstoffproduktion nach Wachstumseigenschaften und Antigenkonfiguration selektioniert (Bardiya & Bae, 2005). Alternativ ist mittlerweile auch die Reassortierung durch reverse Genetik möglich (Nicolson *et al.*, 2005).

Aktuell werden sowohl lebend-attenuierte als auch inaktivierte Influenza-Impfstoffe eingesetzt. Beide Methoden führen zu guten Impfergebnissen (Ambrose *et al.*, 2011). Lebend-attenuierte Impfstoffe enthalten infektiöse Viren, die jedoch in vivo in ihrer Replikation stark eingeschränkt sind. So werden vor allem in Russland und den USA kälte-adaptierte („cold adapted“) Influenza-Stämme für Impfstoffe verwendet (Fiore *et al.*, 2009). Diese Stämme wurden an ein Wachstum bei 25 °C adaptiert und zeigen unter physiologischen Bedingungen (37 °C) nur noch eine schwache Replikation. Für die Impfstoffherstellung werden diese Kälte-adaptierten Viren mit aktuellen Impfstämmen reassortiert. Ein weiterer, vielversprechender Ansatz ist die Verwendung von NS1-attenuierten Virusstämmen als Backbone für die Impfstoffe. Diesen Stämmen fehlt das Gen für den viralen IFN-Antagonisten NS1. So können sie in vivo zwar noch replizieren und virale Antigene produzieren, lösen jedoch dabei eine starke IFN-Antwort aus. Diese IFN-Antwort verhindert einerseits die Ausbreitung der Virusinfektion im Wirt und wirkt andererseits immunstimulierend. Dieses Impfkonzep ist noch nicht zugelassen, hat jedoch in ersten Studien bereits bemerkenswerte Ergebnisse erzielt (Romanova *et al.*, 2009; Wacheck *et al.*, 2010).

Den Großteil der hergestellten Influenza-Impfstoffe stellen jedoch inaktivierte Impfstoffe dar (Couch, 2008). Daher bezieht sich auch diese Arbeit ausschließlich auf die Herstellung dieser Form der Influenza-Impfstoffe. Die Inaktivierung erfolgt mit β -Propiolacton oder Formalin. Inaktivierte Influenza-Impfstoffe werden in Form von Ganzvirus-, Spalt- und Subunit-Impfstoffen hergestellt. Ganzvirusimpfstoffe enthalten vollständige Influenza-Viruspartikel. Für Spalt- und Subunit-Impfstoffe wird das Viruspartikel unter Verwendung von Detergenzien oder Lösungsmitteln aufgespalten. Bei Subunit-Impfstoffen werden ausschließlich HA und NA für den Impfstoff verwendet. Spaltimpfstoffe können dagegen noch weitere Virusbestandteile enthalten. Spalt- und Subunit-Impfstoffe gelten verglichen mit Ganzvirusimpfstoffen als weniger reaktogen (Fiore *et al.*, 2009) und machen mehr als 90 % der weltweiten Influenza-Impfstoffproduktion aus (Stöhr *et al.*, 2006).

2.2 Influenza-Impfstoffproduktion

Das klassische Produktionsverfahren für Influenza-Impfstoffe ist die Herstellung in embryonierten Hühnereiern. Dabei wird infektiöses Influenza-Virus in die Allantois elf Tage alter, befruchteter Eier injiziert. Das Virus repliziert dort zu hohen Titern und kann anschließend aus der Allantoisflüssigkeit aufgereinigt werden. Zur Produktion einer trivalenten Impfstoffdosis (drei Impfstämme, pro Stamm 15 µg HA) sind 0,7 bis 3 Eier erforderlich (Bardiya & Bae, 2005; Hickling & D'Hondt, 2006). Das Verfahren wurde bereits 1945 in den USA zugelassen und der Großteil der Influenza-Impfstoffe wird bis heute in Eiern produziert. Die eibasierte Impfstoffproduktion ist aufgrund ihrer jahrzehntelangen Anwendung und Optimierung robust und kostengünstig (Lee & Hu, 2012). Im Pandemiefall ist eine Steigerung der Produktionskapazität für eibasierte Impfstoffe jedoch nur mit Vorlaufzeit zur Produktion der benötigten Mengen Hühnereier möglich (Barrett *et al.*, 2010). Bei einer H5N1-Pandemie wäre die Eiproduktion zudem durch die Letalität dieses Stammes für Hühner stark gefährdet. In diesem Fall könnte außerdem die hohe Pathogenität von H5N1-Stämmen für das Embryo die Impfstoffausbeute reduzieren (Pandey *et al.*, 2010).

Aufgrund dieser Probleme steigt das Interesse an zellkulturbasierten Prozessen zur Influenza-Impfstoffherstellung. Bei diesen Prozessen werden kontinuierliche Zelllinien zunächst ausgehend von Kryokulturen schrittweise expandiert. In Bioreaktoren (Kubikmetermaßstab) werden diese Zellen dann mit Influenza-Viren infiziert (Barrett *et al.*, 2009; Genzel & Reichl, 2009). Nach ein bis zwei Tagen Virusvermehrung kann das Virusmaterial für den Impfstoff aus dem Zellkulturüberstand isoliert werden. Verglichen mit eibasierter Impfstoffproduktion liefern zellkulturbasierte Prozesse vergleichbare oder sogar bessere Virusausbeuten (Audsley & Tannock, 2008). Bei immunologischer Verträglichkeit und Impfeffizienz sind ei- und zellkulturbasierte Impfstoffe vergleichbar (Govorkova *et al.*, 1999; Halperin *et al.*, 2002; Palache *et al.*, 1997). Die Produktionskapazitäten zellkulturbasierter Verfahren können im Fall einer Pandemie schnell erweitert werden. Im Gegensatz zu befruchteten Hühnereiern stellt die Verfügbarkeit des Produktionssubstrats bei zellkulturbasierten Prozessen keinen limitierenden Faktor dar. Zudem besteht im Fall einer Pandemie die Möglichkeit, gegebenenfalls bestehende Anlagen anderer zellkulturbasierter Prozesse für die Impfstoffproduktion zu nutzen (Lee & Hu, 2012). Von der WHO wurden die drei Zelllinien MDCK (Nierenepithelzellen vom Cocker Spaniel), Vero (Nierenepithelzellen der grünen Meerkatze) und PER.C6 (humane Retina-Zellen) als Substrate für die Influenza-Impfstoffproduktion vorgeschlagen (Patriarca, 2007). Weitere Zelllinien werden aktuell als Produzenten für Influenza-Impfstoffe untersucht (Genzel & Reichl, 2009). Bislang verwenden allerdings alle zellkulturbasierten industriellen Prozesse zur Produktion zugelassener Influenza-Impfstoffe MDCK- und Vero-Zellen (Lee & Hu, 2012).

Vero-Zellen können infolge eines genetischen Defekts kein Interferon produzieren (Diaz *et al.*, 1988). Sie werden seit langem für die Produktion humaner Impfstoffe gegen Tollwut- und Polio-Viren

genutzt (Montagnon, 1989). Vero-basierte Impfstoffe gelten daher als sicher in der Anwendung. Auch Influenza-Viren wachsen in Vero-Zellen (Barrett *et al.*, 2010). Bei Humanisolaten ist teilweise jedoch eine Adaptation erforderlich (Genzel *et al.*, 2010). Saisonale und pandemische, Vero-basierte Impfstoffe werden von Baxter entwickelt und produziert. Saisonale Vero-basierte Influenza-Impfstoffe sind in den Niederlanden und Österreich zugelassen (Lee & Hu, 2012).

MDCK-Zellen stellen das am weitesten verbreitete Substrat für die zellkulturbasierte Produktion von Influenza-Impfstoffen dar. Mindestens vier große Pharmakonzerne (Novartis, Medimmune, GSK und ehemals Solvay) haben MDCK-basierte Prozesse für die Impfstoff-Herstellung entwickelt (Patriarca, 2007). Diese Zellen sind bereits mehr als 40 Jahre für ihre herausragenden Eigenschaften bei der Isolierung und Vermehrung von Influenza-Viren bekannt. Sie sind permissiv für viele Influenza-Virusstämme (Gauth & Smith, 1968) und ermöglichen hohe Virustiter (Li *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009; Moresco *et al.*, 2010). Auch in Eiern generierte High Growth Reassortanten wachsen ohne Adaptation in MDCK-Zellen zu hohen Titern (Lee & Hu, 2012). Die Anwendung MDCK-basierter Impfstoffe gilt als sicher (Onions *et al.*, 2010) und mit Optaflu von Novartis wurde bereits der erste saisonale, MDCK-basierte Influenza-Impfstoff durch die EMA (European Medicines Agency) zugelassen (Doroshenko & Halperin, 2009). Mehrere Studien zeigen, dass in MDCK-Zellen bessere Virusausbeuten als in Vero-Zellen erzielt werden können, obwohl MDCK-Zellen IFN-kompetent sind (Audsley & Tannock, 2005; Genzel *et al.*, 2010; Youil *et al.*, 2004).

Neben den etablierten ei- und zellkulturbasierten Verfahren wird auch die rekombinante Produktion von Virusbestandteilen in unterschiedlichen Systemen für Herstellung von Influenza-Impfstoffen untersucht. Auch an DNA- und RNA-Vakzinen gegen Influenza-Viren wird geforscht. Diese neuen Konzepte befinden sich zurzeit allerdings noch in der klinischen Erprobung (vgl. Review von Pandey *et al.*, 2010).

2.3 Interferon

2.3.1 Typ I-Interferone

Die Interferone wurden 1957 von Isaacs und Lindenmann entdeckt (Isaacs & Lindenmann, 1957). Anhand ihrer Aminosäuresequenz und ihren zellulären Rezeptoren werden sie in Typ I, II und III Interferone unterteilt. Typ II IFN (IFN- γ) wird von Immunzellen gebildet und war daher für diese Arbeit nicht von Bedeutung. Dagegen können die meisten Zelltypen Typ I Interferone bilden. Typ I Interferone sind Zytokine, die als Teil der angeborenen Immunantwort von virusinfizierten Zellen sekretiert werden und antiviral wirken. Sie werden in die Untergruppen der α -, β -, δ -, ϵ -, κ - und τ -IFNs unterteilt (Randall & Goodbourn, 2008; Takaoka & Yanai, 2006). Hier sind vor allem IFN- α und IFN- β von Interesse, da diese direkt durch Virusinfektionen induziert werden. Säugetiere haben mehrere unterschiedliche IFN- α -Gene und ein IFN- β Gen. Allen Genen ist gemein, dass ihre

Sequenzen keine Introns enthalten (Díaz *et al.*, 1994; Trent *et al.*, 1982). IFN- α und IFN- β binden beide an den zellulären Typ I IFN-Rezeptor (IFNAR). Daraufhin beginnen die Zellen mit der Expression einer Fülle IFN-stimulierter Gene (ISG), die zum Teil antivirale Aktivität haben und die Zelle in den sogenannten antiviralen Status versetzen (vgl. 2.3.2). Typ III-Interferone sind funktional mit Typ I-Interferonen verwandt (Onoguchi *et al.*, 2007). Sie werden durch dieselben Mechanismen bei Virusinfektionen in vielen unterschiedlichen Zellen aktiviert und lösen eine vergleichbare antivirale Antwort aus. Typ III-Interferone binden jedoch an den IL-28 Rezeptor, der im Gegensatz zum IFNAR nicht in allen Geweben verbreitet ist.

In vivo hat die Typ I IFN-Antwort vor allem die Funktion, Virusinfektionen im frühen Stadium zu verlangsamen, so dass der Wirt Zeit für die Aktivierung der adaptiven Immunantwort gewinnt (Trinchieri, 2010). Bei der adaptiven Immunantwort spielen IFN- α und IFN- β aber auch eine Rolle. Unter anderem steigern diese Zytokine die MHC-Genexpression und dadurch die Präsentation von Antigenen, rekrutieren Makrophagen und Th1-Zellen zum Ort der Infektion und sind außerdem ein wichtiger Kofaktor bei der T-Zellantwort (Julkunen *et al.*, 2000). Die Bedeutung von Typ I IFN bei der Abwehr von Virusinfektionen ist immens. Müller *et al.* (1994) beobachteten, dass Mäuse ohne funktionalen Rezeptor für Typ I-Interferone trotz intaktem adaptiven Immunsystem sehr schnell an Infektionen mit verschiedenen Viren starben. Wildtyp-Mäuse (WT) überlebten diese Infektionen. Menschen mit genetischen Defekten im IFN-System fallen bereits im Kindesalter Virusinfektionen zum Opfer (Dupuis *et al.*, 2003). Daneben wird das große antivirale Potential von Typ I Interferonen auch daran deutlich, dass diese Zytokine als Behandlungsoption für pandemische Influenza-Viren diskutiert werden (Haasbach *et al.*, 2011).

2.3.2 Interferoninduktion

Die an der Interferoninduktion und –signaltransduktion beteiligten Signalwege sind in Abbildung 2-3 schematisch aufgeführt. Die IFN-Induktion beginnt mit der Erkennung der Virusinfektion durch die Wirtszelle. In Influenza-virusinfizierten Epithelzellen erfolgt dies durch RIG-I (retinoic inducible gene I). RIG-I wird in vielen Gewebearten konstitutiv exprimiert und liegt im Zytoplasma vor. Diese RNA-Helikase wird durch 5'-triphosphorylierte RNA aktiviert. Freie 5'-Triphosphat-Enden treten bei zelleigenen RNAs im Zytoplasma nicht auf. So werden mRNAs vor dem Kernexport mit der 5'-Cap-Struktur modifiziert und tRNAs an ihren 3'- und 5'-Enden getrimmt. Ribosomale RNA wird von den ribosomalen Proteinen maskiert (Fujita, 2006). Genomische RNA von negativsträngigen RNA-Viren ist dagegen häufig 5'-triphosphoryliert und dient der Zelle daher als Indikator für Virusinfektionen. Bei Influenza Virusinfektionen wird RIG-I bevorzugt von den kürzeren genomischen RNAs der Viren und defekten, interferierenden viralen RNAs (diRNA, vgl. 2.4.) aktiviert (Baum *et al.*, 2010; Rehwinkel *et al.*, 2010). RIG-I bindet dabei die virale RNA. Dabei ändert es seine Konformation und wird infolgedessen durch Ubiquitin-Ligasen wie TRIM25 (Tripartite motif-containing protein 25)

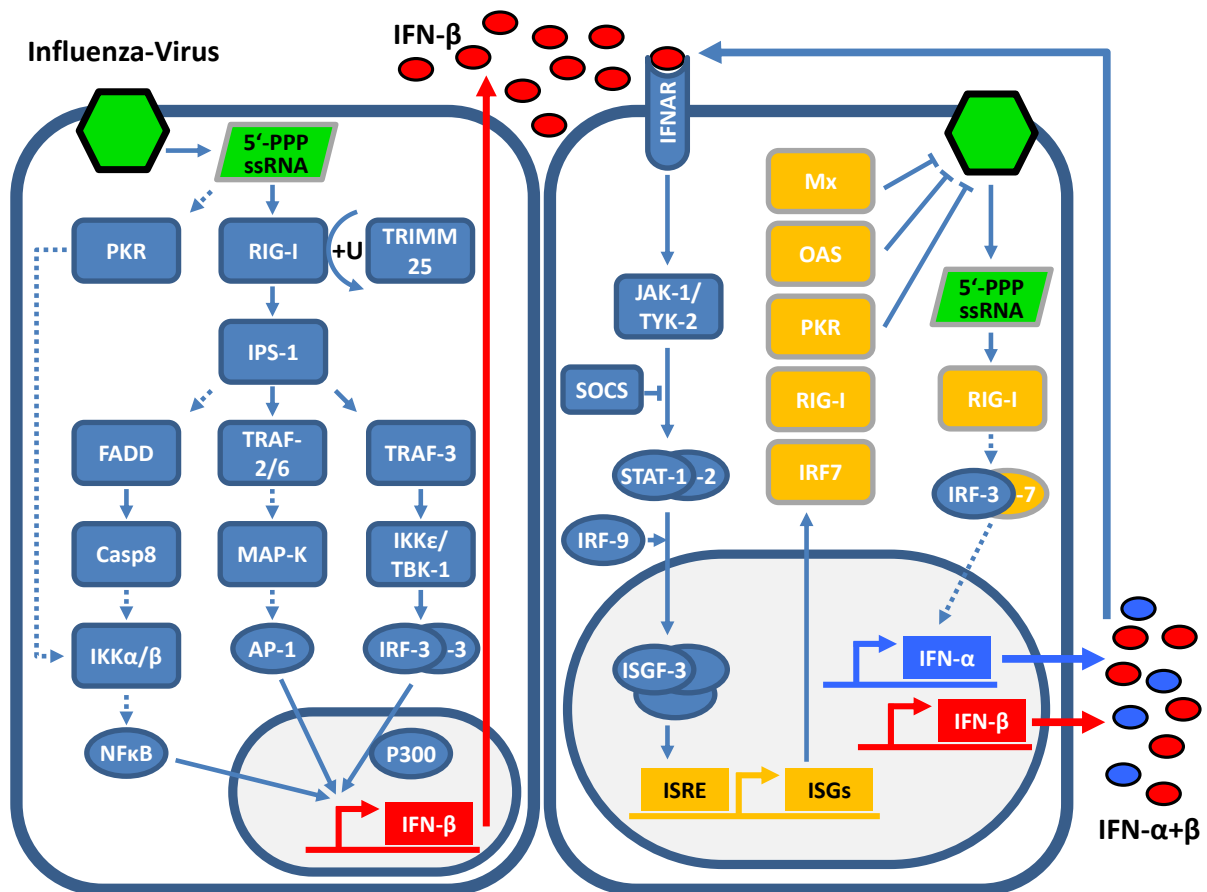


Abbildung 2-3: Induktion der Typ I IFN-Antwort und des IFN-induzierten, antiviralen Status bei der Influenza-Virusinfektion. Der Ablauf der dargestellten Signalprozesse ist im Text erläutert. Ebenso werden dort die in der Abbildung verwendeten Abkürzungen eingeführt. Gestrichelte Pfeile deuten eine Signalweitergabe über nicht dargestellte Zwischenschritte an. Die Abbildung basiert auf Haller *et al.* (2006), Kato *et al.* (2011) sowie Tenoever und Maniatis (2006).

ubiquityniert. Dies führt zur Aktivierung von IPS-1 (IFN- β Promoter Stimulator 1, synonym häufig auch MAVS, Mitochondrial antiviral-signaling Protein) durch RIG-I (García-Sastre, 2011). IPS-1 gibt dieses Signal über TRAF3 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 3) an TBK-1 (TANK-binding kinase-1) und IKK ϵ (I κ B Kinase ϵ) weiter. Diese Kinasen phosphorylieren IRF3 (interferon regulatory factor 3). Phosphoryliertes IRF3 homodimerisiert und transloziert in den Zellkern. Dort assoziiert es mit den transkriptionalen Koaktivatoren p300 oder CBP (CREP-binding Protein) und bindet an den IFN- β Promoter (Haller *et al.*, 2006). Für eine starke Induktion dieses Promoters sind zusätzlich aktiviertes NF κ B (nuclear factor κ B) und AP1 (Aktivatorprotein 1) erforderlich. NF κ B und AP1 werden ebenfalls ausgehend von IPS-1 aktiviert. Die Aktivierung von AP1 erfolgt von IPS-1 über TRAFs und den MAP-Kinase-Weg (MAP: Mitogen-activated protein kinase) (Tenoever & Maniatis, 2006). NF κ B wird induziert, indem IPS-1 über FADD (Fas-Associated protein with Death Domain) und Caspase 8 die I κ B-Kinasen IKK α und IKK β aktiviert (Kato *et al.*, 2011). Zudem führt auch die Aktivierung von PKR (Proteinkinase R) durch virale RNA (Nallagatla *et al.*, 2007) zur Induktion von NF κ B (Garcia *et al.*, 2006). Aktiviertes AP1 und NF κ B bilden zusammen mit IRF3, p300 oder CBP das IFN- β Enhanceosome (Honda *et al.*, 2005).

IFN- β wird von der infizierten Zelle sekretiert und bindet auto- und parakrin an den Typ I IFN-Rezeptor (IFNAR) auf der Zelloberfläche. Dies aktiviert den JAK/STAT-Signalweg. Nach Bindung von IFN- β an IFNAR aktiviert dieser Rezeptor die Januskinasen JAK1 und TYK2. Diese phosphorylieren wiederum STAT1 und STAT2 (STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription). Phosphoryliertes STAT1 und STAT2 bilden mit IRF9 den ISGF-3-Komplex (IFN-stimulated gene factor 3). Dieser transloziert in den Zellkern und aktiviert die Transkription einer großen Gruppe IFN-stimulierter Gene (ISG) durch Bindung an ISRE-Elemente (ISRE: IFN stimulated response element) in deren Promotern (Haller *et al.*, 2006).

Typ I IFN induziert mehr als 300 Gene (Der *et al.*, 1998). Ein Teil der ISGs hat antiviralen Charakter und ist für den inhibierenden Einfluss der IFN-Signaltransduktion auf die Virusreplikation verantwortlich (vgl. 2.3.3). Andere ISGs tragen zu einer positiven Feedback-Schleife bei, durch die sich die Aktivierung des IFN-Systems weiter verstärkt. So stimuliert IFN die Expression seines eigenen Transkriptionsaktivators, IRF7 (interferon regulatory factor 7). Von den meisten Zellen wird IRF7 nur in geringen Mengen konstitutiv exprimiert. Als Antwort auf IFN- β wird die IRF7-Expression aber deutlich gesteigert. IRF7 wird identisch zu IRF3 durch den RIG-I-Signalweg aktiviert. Nach Aktivierung bildet IRF7 Homodimere oder Heterodimere mit IRF3 und transloziert in den Kern. Dort trägt es zunächst zur Aktivierung des IFN- β Promoters bei. Zusätzlich induziert IRF7 im Gegensatz zu IRF3, das nur IFN- β aktivieren kann, aber auch die Transkription der α -Interferone. Neben IRF7 wird auch die Expression von RIG-I durch IFN gesteigert und trägt zur dieser positiven Feedback-Amplifikation der IFN-Aktivierung bei (Honda & Taniguchi, 2006).

2.3.3 IFN-induzierte antivirale Mechanismen

Als Reaktion auf die Bindung von IFN an den zellulären IFN-Rezeptor etablieren Zellen einen antiviralen Status. Das inhibitorische Potential dieses antiviralen Status für die Virusreplikation wird durch verschiedene Vertreter aus der Gruppe der ISGs vermittelt. Diese Proteine greifen an nahezu allen Stationen des viralen Replikationszyklus in die Virusreplikation ein (vgl. Reviews von Ehrhardt *et al.*, 2010; García-Sastre, 2011; Haller & Kochs, 2011; Sadler & Williams, 2008)

2.3.3.1 IFITM-Proteine

Der Eintritt von Influenza-Viren in die Zelle wird durch die IFITM-Proteine (Interferon-induzierbare transmembran Proteine) inhibiert. Diese Proteine werden von vielen Geweben und Zelllinien in geringem Maße konstitutiv exprimiert und stellen wahrscheinlich einen basalen Schutz vor Virusinfektionen dar. IFN-Stimulation bewirkt eine Steigerung der IFITM-Proteinlevel. Ein Knockout der IFITM-Gene führte bei Zellen zu einer stärkeren Anfälligkeit für Influenza-Viren (Brass *et al.*, 2009). Der antivirale Mechanismus ist bislang noch nicht bekannt. Jedoch scheinen IFITM-Proteine in

der endosomalen Phase des Viruseintritts aktiv zu sein und dort möglicherweise mit dem viralen HA zu interferieren (Huang *et al.*, 2011).

2.3.3.2 Mx-Proteine

Eine Reihe von ISGs inhibiert direkt oder indirekt die virale RNA-Replikation und Transkription, sowie die Synthese der viralen Proteine. Prominenteste Vertreter dieser Gruppe sind bei Influenza-Viren die Mx-Proteine (myxovirus resistance proteins). Die Expression von Mx-Proteinen ist strikt IFN-abhängig, weswegen diese Proteine bereits häufig als Indikator für IFN-Aktivität eingesetzt wurden (Fray *et al.*, 2001; MacQuillan *et al.*, 2010; Millonig *et al.*, 2008; Roers *et al.*, 1994; Wenzel *et al.*, 2005). Mx-Proteine stellen bei vielen Spezies das Kernstück der IFN-induzierten, antiviralen Abwehr gegen Influenza-Viren dar. So vermitteln Mx-Proteine in Mäusen eine angeborene Resistenz gegen Influenza-Viren. Aber auch Menschen, Ratten und Schweine verfügen über Mx-Proteine mit anti-Influenza-Aktivität (Haller *et al.*, 2009; Morozumi *et al.*, 2009). Der antivirale Mechanismus scheint dabei speziesabhängig zu sein und ist allgemein noch nicht vollständig verstanden. Es konnte aber bereits gezeigt werden, dass virales NP vermutlich das Ziel von murinem Mx1 und humanem MxA ist (Dittmann *et al.*, 2008). Für humanes MxA wurde weiterhin anhand der Molekülstruktur ein Modell für die antivirale Aktivität postuliert. MxA bildet demnach Oligomere, die vRNPs in Form von Ringen umschließen und so die virale RNA-Replikation und -Transkription inhibieren (Gao *et al.*, 2010; von der Malsburg *et al.*, 2011). Über die Mx-Proteine von Hunden bzw. MDCK-Zellen war dagegen zu Beginn dieser Arbeit wenig bekannt. Lediglich von einer antiviralen Aktivität des caninen Mx2 gegen VSV (Vesicular stomatitis virus) wurde bereits berichtet (Nakamura *et al.*, 2005).

2.3.3.3 Das OAS/RNaseL-System

Ein weiterer IFN-induzierter Mechanismus, der die virale RNA-Replikation und Transkription inhibieren kann, ist das OAS (Oligoadenylat Synthetase) / RNaseL-System. OAS wird durch doppelsträngige virale RNA aktiviert und produziert 2'-5' Oligoadenylate. Unter Verwendung dieser 2'-5' Oligoadenylate als Kofaktor degradiert die zytoplasmatische RNaseL in unspezifischer Weise zelluläre und virale RNAs (Samuel, 2001). Dadurch wird die Virusreplikation einerseits direkt inhibiert. Andererseits wurde beobachtet, dass die gespaltenen RNAs RIG-I aktivieren und so die IFN-Antwort verstärken (Malathi *et al.*, 2007). Walkiewicz *et al.* (2011) untersuchten einen chemischen NS1-Inhibitor als potentiellen antiviralen Wirkstoff. In MEFs (murine embryonale Fibroblasten) fiel dabei auf, dass eine derartige Inhibition von NS1 nur dann die Virusreplikation hemmte, wenn die Zellen über funktionale RNaseL verfügten. Gleichzeitig beobachteten diese Autoren bei RNaseL-positiven MEFs eine stärkere IFN- β Produktion als bei MEFs, denen dieses Enzym fehlte. Das OAS/RNaseL-System scheint demnach ein potenter Bestandteil der antiviralen IFN-Antwort gegen Influenza-Viren zu sein.

2.3.3.4 PKR

Die virale Proteinsynthese wird in IFN-stimulierten Zellen unspezifisch durch PKR (Protein Kinase R) gehemmt. Im Gegensatz zu WT-Mäusen lösen in PKR-negativen Mäusen selbst NS1-attenuierte Influenza-Viren Krankheitssymptome aus (Bergmann *et al.*, 2000). Das verdeutlicht den limitierenden Charakter einer PKR-Aktivierung für die Influenza-Virusreplikation. PKR wird zwar basal exprimiert, IFN steigert die Expression jedoch weiter. Diese Kinase wird durch virale RNA aktiviert und phosphoryliert daraufhin eIF2 α (eukaryotic initiation factor 2 α). Dies führt zu einer generellen Hemmung der Translation zellulärer und viraler Proteine, wodurch die Virusreplikation beeinträchtigt wird. Zudem induziert aktiviertes PKR auch NF κ B (vgl. Abbildung 2-3) und trägt damit zur IFN-Induktion bei (García *et al.*, 2007). Influenza-Viren inhibieren die Aktivierung von PKR über ihr NS1 (vgl. 2.3.4.1).

2.3.3.5 Viperin

IFN löst auch Mechanismen aus, die das Budding neuer Viren beeinträchtigen. Das IFN-induzierte Protein Viperin interagiert mit der Farnesyldiphosphat-Synthase und behindert dadurch die Bildung von Lipid Raft-Regionen in der Zellmembran (Wang *et al.*, 2007). HA und NA assoziieren in der Zellmembran mit Lipid Rafts. Barman & Nayak (2007) zeigten, dass Beeinträchtigungen dieser Lipid Raft-Strukturen die Infektiosität neu gebildeter Viren verringern.

2.3.3.6 ISG15

Ein weiterer wichtiger IFN-induzierter Effektor ist ISG15. ISG15 gehört zur Gruppe der Ubiquitin-like-Proteine und wird wie Ubiquitin an Proteine konjugiert. Der Knockout von ISG15 verstärkt bei Mäusen die Anfälligkeit gegenüber Influenza A- und B-Virusinfektionen (Lai *et al.*, 2009; Lenschow *et al.*, 2007). Auch in humanen Systemen konnte eine antivirale Aktivität von ISG15 gegen Influenza Viren nachgewiesen werden (Hsiang *et al.*, 2009). Der inhibitorische Mechanismus von ISG15 bei Influenza-Virusinfektionen ist bislang nicht bekannt. Es konnte aber bereits gezeigt werden, dass die Konjugation von ISG15 an NS1 die Funktion dieses viralen Proteins beeinträchtigt (García-Sastre, 2011).

2.3.3.7 IFN und Apoptose

Neben den zuvor genannten, direkt antiviral wirkenden IFN-induzierten Effektoren besitzt IFN auch die Funktion, Zellen in einen pro-apoptotischen Zustand zu versetzen (Maher *et al.*, 2007; Randall & Goodbourn, 2008). Influenza-Viren profitieren von einigen Teilprozessen bei der Apoptose (Ludwig *et al.*, 1999). So wirkt sich beispielsweise Caspase 3-Aktivität positiv auf den Kernexport von vRNPs aus (Wurzer *et al.*, 2003). Eine zu schnelle Induktion der Apoptose verringert jedoch das Zeitfenster für die produktive Virusinfektion in einer Zelle (Schulze-Horsel *et al.*, 2009) und verlangsamt damit die Ausbreitung der Virusinfektion im Wirt. Die molekulare Basis für die Wechselwirkungen zwischen

IFN-Signaltransduktion und Apoptose sind für Influenza-Virusinfektionen bislang nicht vollständig verstanden. In vitro wurde jedoch bereits eine Korrelation zwischen hohem Apoptose-Niveau und starker Induktion der IFN-Antwort beobachtet (Balachandran *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2010). Potentiell können die ISGs RNaseL (Castelli *et al.*, 1998) sowie PKR (Zhang & Samuel, 2007) und dessen Substrat eIF2 α (Scheuner *et al.*, 2006) an der Apoptose-Induktion beteiligt sein. Zudem ist der Apoptose-Aktivator p53 durch IFN induzierbar (Takaoka *et al.*, 2003).

2.3.4 Virale Gegenmaßnahmen

2.3.4.1 Das NS1-Protein

Das NS1-Protein ist kein Bestandteil der Viruspartikel, wird aber in virusinfizierten Zellen in großen Mengen gebildet. Es liegt in infizierten Zellen sowohl im Kern als auch im Zytoplasma vor (Greenspan *et al.*, 1988). Für die Virusinfektion ist NS1 nicht essentiell, so dass Influenza-Viren auch in Abwesenheit von NS1 produktiv replizieren können. NS1 hat für die Virusreplikation jedoch viele fördernde Funktionen (Hale *et al.*, 2010a; Hale *et al.*, 2008; Schmolke & García-Sastre, 2010; Wolff & Ludwig, 2009). Vor allem schützt es Influenza-Viren als Typ I IFN-Antagonist effektiv vor der antiviralen Antwort des Wirts. So beobachteten Moltedo *et al.* (2009) bei WT-Influenza infizierten Mäusen erst zwei Tage nach der Infektion eine messbare Aktivierung der angeborenen Immunantwort, obwohl zu diesem Zeitpunkt bereits hohe Virustiter in der Lunge vorlagen. Bei Infektion mit einem NS1-attenuierten Influenza Virus (delNS1) waren dagegen bereits kurz nach der Infektion Entzündungssymptome feststellbar. Darüber hinaus zeigen andere Studien, dass delNS1-Stämme im Vergleich mit korrespondierenden WT-Stämmen eine stärkere Aktivierung der Typ I IFN-Antwort auslösen und entsprechend in vivo weniger pathogen sind (Donelan *et al.*, 2003; Falcón *et al.*, 2005; Solórzano *et al.*, 2005).

NS1 verfügt über verschiedene Mechanismen, um die Virusreplikation vor der Typ I IFN-Antwort zu schützen. Die relativen Beiträge der im folgenden vorgestellten Mechanismen zu diesem Schutz sind bislang noch nicht eindeutig geklärt und variieren vermutlich stammabhängig (Hale *et al.*, 2010a). Zunächst inhibiert NS1 sehr effektiv die Induktion der IFN-Expression und hält dadurch die antivirale Wirtszellantwort auf einem geringen Level. Dazu interagiert NS1 mit TRIM25 und verhindert so die Ubiquitinierung von RIG-I (Gack *et al.*, 2009). Die Ubiquitinierung von RIG-I ist Voraussetzung für die Aktivierung des RIG-I-Signalwegs durch 5'-triphosphorylierte virale RNA (vgl. 2.3.2). Durch diese Inhibierung von RIG-I bewirkt NS1 eine verringerte Aktivierung von IRF-3, NF κ B und AP1 (Ludwig *et al.*, 2002; Talon *et al.*, 2000a; Wang *et al.*, 2000) und damit auch des IFN- β Promoters (vgl. 2.3.2).

Neben der direkten Hemmung der IFN-Induktion durch Blockierung des RIG-I-Signalwegs verringert NS1 die IFN-Produktion auch durch seine Wechselwirkung mit der zellulären Genexpression. So wurde berichtet, dass NS1 im Zellkern zelluläres CPSF30 (cleavage and polyadenylation specificity

factor 30) bindet (Nemeroff *et al.*, 1998; Noah *et al.*, 2003). CPSF30-Bindung durch NS1 inhibiert die Polyadenylierung von Wirtszell-mRNAs und damit allgemein die zelluläre Genexpression und Translation (Fortes *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2001). Damit geht auch eine verringerte Expression von IFN und ISGs einher. Die virale Genexpression ist auf CPSF30 nicht angewiesen, da virale mRNAs wirtszellunabhängig durch den viralen Polymerasekomplex polyadenyliert werden (vgl. 2.1.2). Der Laborstamm A/PR/8/34, der für die Impfstoffproduktion als Backbone für Reassortanten von großer Bedeutung ist und auch in dieser Arbeit verwendet wurde, trägt einen Defekt in der Proteindomäne von NS1, die für die CPSF30-Bindung verantwortlich ist (Kochs *et al.*, 2007a). Auch das NS1 des pandemischen A/California/04/09 kann CPSF30 nicht binden (Hale *et al.*, 2010b).

Zusätzlich inhibiert NS1 auch spezifisch die IFN-induzierten antiviralen Effektoren PKR und OAS/RNase L. So verfügt NS1 über eine Domäne, die doppelsträngige RNA bindet und einer Aktivierung von OAS vorbeugt (Min & Krug, 2006). PKR-Aktivität wird durch direkte Bindung von NS1 an PKR gehemmt (Li *et al.*, 2006).

Neben seiner Eigenschaft als IFN-Antagonist hat NS1 weitere wichtige Funktionen bei der Virusreplikation. So inhibiert NS1 die Apoptose-Induktion. Dies scheint zum einen indirekt auf die NS1-vermittelte Unterdrückung der IFN-Induktion zurückzuführen zu sein (vgl. 2.3.3.7; Zhirnov *et al.*, 2002). Zum anderen wirkt NS1 direkt anti-apoptotisch, indem es den PI3K/Akt-Signalweg aktiviert (Ehrhardt *et al.*, 2007). Daneben wurde für NS1 eine regulatorische Funktion beim Spleißen der viralen Transkripte von Segment 7 (Robb & Fodor, 2012) und 8 (Garaigorta & Ortín, 2007) beobachtet. Außerdem wurde berichtet, dass Influenza-Virus-mRNAs, verglichen mit zellulären mRNAs, bevorzugt translatiert werden. NS1 ist wahrscheinlich für diesen Effekt verantwortlich, indem es eine bevorzugte Bindung des Translationsinitiationsfaktors eIF4GI und PABPI (Poly(A)-binding protein I) an virale mRNAs vermittelt. Dies reduziert entsprechend die Verfügbarkeit von eIF4GI und PABPI für Wirtszell-mRNAs und trägt damit zu der bereits genannten, allgemeinen Inhibierung der zellulären Genexpression in Influenza-virusinfizierten Zellen bei. Zusätzlich fördert möglicherweise eine Interaktion zwischen NS1 und dem zellulären Protein hStaufen in bislang noch nicht vollständig geklärter Weise die bevorzugte Translation von vmRNAs (Hale *et al.*, 2008).

2.3.4.2 NS1-unabhängige Mechanismen

Unabhängig von NS1 haben Influenza-Viren noch weitere Strategien entwickelt, um sich vor der angeborenen Immunantwort zu schützen. So konnte gezeigt werden, dass SOCs-Proteine (suppressor of cytokine signalling) durch die Influenza-Virusinfektion aktiviert werden. SOCs sind zelleigene Negativregulatoren des JAK-STAT Signalwegs (Pauli *et al.*, 2008). Darüber hinaus wurden vor kurzem für zwei weitere virale Proteine, PB1-F2 (Dudek *et al.*, 2011; Varga *et al.*, 2011) und die Polymerase-Untereinheit PB2 (Graef *et al.*, 2010; Iwai *et al.*, 2010), IFN-inhibierende Funktionen identifiziert. Beide Proteine verfügen über mitochondriale Lokalisationssignale und scheinen im Mitochondrium

die Aktivierung von IPS-1 zu inhibieren. IPS-1 gehört zum RIG-I-Signalweg und ist in der mitochondrialen Membran lokalisiert (Seth *et al.*, 2005). Verglichen mit NS1 wird PB1-F2 und PB2 als IFN-Antagonisten allerdings geringere Bedeutung beigemessen (García-Sastre, 2011). Daneben ist davon auszugehen, dass die Cap-Snatching Aktivität des viralen Polymerasekomplexes (vgl. 2.1.2) allgemein die zelluläre Genexpression inhibiert. Auch dieser Mechanismus reduziert unspezifisch die zelluläre Genexpression und Translation, wovon die Expression von IFN und ISGs ebenfalls betroffen ist (Schmolke & García-Sastre, 2010). Als letztes erschwert die Verpackung der 5'-triphosphorylierten vRNA in vRNPs wahrscheinlich deren Erkennung durch RIG-I und damit die Induktion der IFN-Antwort (Hale *et al.*, 2010a).

Neben diesen Maßnahmen zur Hemmung der IFN-Antwort steht Influenza-Viren noch ein vergleichsweise einfacher, aber effektiver Weg zur Verfügung, um sich der antiviralen Antwort des Wirts zu entziehen. Grimm *et al.* (2007) beobachteten beim Vergleich von zwei unterschiedlich schnell replizierenden Virusstämmen, dass schnelle Virusreplikation mit stark erhöhter Virulenz in Mx-kompetenten Mäusen einhergeht. Wahrscheinlich nutzen die Viren dabei aus, dass das IFN-System in gesunden Wirten inaktiv ist, und erst als Antwort auf die Virusinfektion induziert wird (vgl. 2.3.2). In dem Zeitraum zwischen IFN-Induktion und der Aktivierung des antiviralen Status bzw. der adaptiven Immunantwort können Viren ungehemmt replizieren. Durch schnelle Virusreplikation wird eine optimale Nutzung dieses Zeitraums ermöglicht.

2.3.4.3 ***Ebola-Virus VP35 und Tollwut-Virus P***

In dieser Arbeit wurden Ebola-Virus VP35 (viral protein 35) und Tollwut-Virus (Rabies) P (Phosphoprotein) zur Unterdrückung der IFN-Antwort während der Influenza-Virusinfektion in MDCK-Zellen verwendet und sollen daher hier kurz beschrieben werden. Ebola- und Tollwut-Viren sind ebenfalls negativsträngige RNA-Viren und aktivieren die IFN-Antwort über den RIG-I-Signalweg. Das Ebola-Virus VP35 unterdrückt, ähnlich wie das Influenza A-Virus NS1, die Aktivierung der IFN-Transkription. Dazu interagiert es mit IKKε und TBK-I und verhindert so die Phosphorylierung von IRF3 bzw. IRF7 (vgl. Review von Basler & Amarasinghe, 2009). Weiterhin inhibiert VP35 die Aktivität von PKR. Tollwut-Virus P inhibiert die Aktivierung der IFN-Antwort und außerdem auch die IFN-abhängige Induktion des antiviralen Status. Dazu verhindert es einerseits die Aktivierung von IRF3 und IRF7 durch den RIG-I-Signalweg. Andererseits inhibiert P den JAK/STAT Signalweg, indem es phosphoryliertes STAT1 und STAT2 bindet. So wird der Kernimport der STATs verhindert und die Induktion der antiviralen ISGs unterbunden (vgl. Review von Rieder & Conzelmann, 2009).

2.4 Der Einfluss nicht-infektiöser Viruspartikel auf Virusreplikation und IFN-Induktion

Bereits Donald und Isaacs (1954) berichteten, dass bei Influenza-Virusinfektionen deutlich mehr nicht-infektiöse Viruspartikel (gemessen anhand der HA-Aktivität) gebildet werden als infektiöse Viren. Derselbe Sachverhalt wurde auch in unserer Arbeitsgruppe bei Virusinfektionen in MDCK-Zellen beobachtet (Schulze-Horsel *et al.*, 2009). Potentiell könnten diese nicht-infektiösen Viruspartikel zur Aktivierung der IFN-Antwort beitragen. IFN-Induktion durch Hitze- oder UV-inaktivierte Influenza-Viren wurde bereits in zahlreichen Arbeiten beschrieben (Burke & Isaacs, 1958; Henle *et al.*, 1959; Isaacs & Lindenmann, 1957). Darüber hinaus zeigten Marcus *et al.*, dass auch natürliche, bei der Virusinfektion gebildete nicht-infektiöse Partikel IFN aktivieren können (Marcus *et al.*, 2010; Marcus *et al.*, 2005). Ein potentieller Mechanismus für diese Aktivierung findet sich bei Rehwinkel *et al.* (2010). Diese Autoren spekulieren, dass die genomische virale RNA (vRNA) der nicht-infektiösen Partikel der Auslöser ist. Da nicht-infektiöse Partikel über HA-Aktivität verfügen ist anzunehmen, dass sie in Zellen eindringen und entsprechend dort auch potentiell vRNA freisetzen können. Bei größeren Mengen nicht-infektiöser Partikel akkumuliert auf diese Weise auch unabhängig von produktiver Virusinfektion wahrscheinlich genug vRNA im Zytoplasma, um RIG-I und damit die IFN-Antwort zu aktivieren.

Ein weiterer Mechanismus, über den nicht-infektiöse Viren die Aktivierung des IFN-Systems bei der Virusinfektion beeinflussen können, wurde vor kurzem von Baum *et al.* (2010) identifiziert. In dieser Studie wird berichtet, dass RIG-I in Influenza-virusinfizierten Zellen präferenziell die kürzeren genomischen RNA-Segmente und „defective interfering“ (DI)-RNA bindet. DI-RNAs werden durch nicht-infektiöse DI-Partikel in die Zelle eingebracht oder entstehen infolge von Fehlern bei der Replikation der viralen RNA (Marriott & Dimmock, 2010). Dabei springt die virale Polymerase innerhalb des Templates zu einem späteren Abschnitt (Jennings *et al.*, 1983). Die langen Genomsegmente, die die Gene für die viralen Polymerasen beinhalten, sind dafür scheinbar besonders anfällig (Baum *et al.*, 2010). Als Produkt entstehen Kopien der Influenza-Genomsegmente, die interne, teilweise mehrere hundert Basenpaare große Deletionen tragen. Bleiben die 5'- und 3'-Enden der Segmente dabei erhalten, werden DI-RNAs von den viralen Polymerasen ebenfalls repliziert (Fodor *et al.*, 2003). Im Vergleich zu intakter viraler RNA erfolgt die Vervielfältigung von DI-RNAs aufgrund ihrer geringeren Länge wahrscheinlich schneller. Intakte virale RNAs werden dadurch bei der Replikation von DI-RNAs verdrängt, so dass es zu einer starken Akkumulation von DI-RNAs in der Zelle kommt (Marriott & Dimmock, 2010). Infolge der bevorzugten Bindung von DI-RNAs durch RIG-I wäre dadurch eine starke Aktivierung des IFN-Systems zu erwarten. Weiterhin werden DI-RNA enthaltende RNPs bevorzugt in neugebildete Viruspartikel verpackt werden (Odagiri & Tashiro,

1997). Duhaut *et al.* (1996) konnten zeigen, dass Viruspartikeln, die eine DI-RNA eines Segments tragen, das entsprechende intakte Segment in der Regel fehlt. Daher sind DI-Partikel für ihre Replikation auf Koinfektion der Wirtszelle mit einem infektiösen Viruspartikel angewiesen. Gleichzeitig reduziert die bevorzugte Verpackung von DI-RNA die Bildung infektiöser Partikel. Durch diese bevorzugte Replikation und Verpackung der DI-RNA können DI-Partikel über mehrere Replikationszyklen die Bildung infektiöser Viruspartikel immer weiter verdrängen („interfering“) (Marriott & Dimmock, 2010). Durch diesen Mechanismus inhibieren DI-Partikel *in vivo* die Ausbreitung der Virusinfektion im Wirt derart effizient, dass sie bereits als antivirales Therapeutikum vorgeschlagen wurden (Dimmock *et al.*, 2008). Derselbe Mechanismus kann auch die Partikelzusammensetzung von Saatviren für Forschung oder Impfstoffproduktion wesentlich beeinflussen. Bei der Saatvirus-Herstellung kann mehrfaches Passagieren der Influenza-Viren bei hoher MOI (multiplicity of infection) den Anteil von DI-Partikeln stark steigern (Marcus *et al.*, 2009; von Magnus, 1951).

2.5 HA-Spaltung durch Trypsin

Das HA-Protein besteht aus den zwei Untereinheiten HA1 und HA2. HA1 vermittelt die Bindung des Virus an zelluläre Oberflächenrezeptoren, wogegen HA2 essentiell für den Eintritt des Virus in die Zelle ist. Infizierte Zellen produzieren HA zunächst als HA0, in dem die Untereinheiten HA1 und HA2 noch über eine Linker-Sequenz verbunden sind. Die Fusion von zellulärer und viraler Membran wird von einer Proteindomäne des HA2 initiiert, die in unmittelbarer Nachbarschaft zu der Linker-Sequenz liegt. Diese Domäne wird als Fusionspeptid bezeichnet. Für die Membranfusion muss die Linker-Sequenz zunächst durch Wirtsproteasen gespalten werden. HA1 und HA2 bleiben zwar auch nach der Spaltung über Disulfidbrücken verbunden. Das Fusionspeptid ist dann jedoch nicht länger an HA1 gebunden und kann in dieser freien Form durch Eindringen in die endosomale Membran die Membranfusion auslösen. Die proteolytische Aktivierung des HAs durch Wirtszellproteasen ist damit notwendige Voraussetzung für die Infektion einer Zelle (vgl. Reviews von Bertram *et al.*, 2010; Harrison, 2008).

In vivo können unterschiedliche Proteasen für die HA-Spaltung verantwortlich sein. Bei hochpathogenen, aviären Influenza-Viren erfolgt die HA-Spaltung durch Furin, eine ubiquitär exprimierte Endoprotease (Stieneke-Gröber *et al.*, 1992). Diese Stämme tragen eine spezifische, durch mehrere basische Aminosäuren gekennzeichnete Sequenz in der Linker-Region des HAs, die die Spaltung durch Furin ermöglicht. Niedrigpathogene aviäre und auch humane Influenza-Viren haben nur eine basische Aminosäure (Arginin oder Lysin) in der Linker-Region. Bei diesen Viren wird das HA von Proteasen wie Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin oder ectopisches anionisches Trypsin aktiviert, die von Epithelzellen in der Lunge sekretiert werden (vgl. Review von Kido *et al.*, 2007).

Alternativ kann die Spaltung zellassoziiert durch die Typ II Transmembran-Serinproteasen TMPRSS2 (transmembrane protease, serine 2) und HAT (human airway trypsin-like protease) erfolgen (Böttcher *et al.*, 2006; Böttcher-Friebertshauer *et al.*, 2010). Diese Proteasen spalten neu synthetisiertes HA wahrscheinlich bei seinem Transport zur Zelloberfläche (TMPRSS2) oder nach seiner Integration in die Wirtszellmembran (HAT). Unabhängig davon scheint in Einzelfällen auch die virale Neuraminidase eine Rolle bei der HA-Spaltung zu spielen. Am besten erforscht ist dieser Mechanismus für den neurovirulenten Laborstamm A/WSN/33 (WSN33). WSN33 wurde aus dem humanen Isolat WS/33 durch mehrfaches Passagieren in unterschiedlichen Wirten generiert (Stuart-Harris, 1939). Durch einen Aminosäureaustausch kam es im NA zum Wegfall eines Glykosylierungssignals. WSN33-NA kann infolge dessen Serum-Plasminogen binden, das nach Umwandlung zu Plasmin das WSN33 HA aktiviert (Goto & Kawaoka, 1998; Goto *et al.*, 2001). Durch diesen Mechanismus verlaufen WSN33-Infektionen systemisch und sind nicht auf Atemwege und Lunge beschränkt (Castrucci & Kawaoka, 1993).

Bei der zellkulturbasierten Impfstoffproduktion wird ausnahmslos Trypsin verwendet, um die Spaltung des HAs zu gewährleisten. Bereits in den 1970er Jahren wurde entdeckt, dass Trypsin in geringen Konzentrationen im Zellkultur-Medium effiziente HA-Spaltung vermittelt und so bei geringer MOI die Ausbreitung der Infektion in mehreren Infektionswellen auf alle verfügbaren Zellen („multi-cycle replication“) ermöglicht (Klenk *et al.*, 1975; Lazarowitz & Choppin, 1975). Die effiziente Spaltung des HAs durch Trypsin ist somit entscheidend für hohe Virusausbeuten (Tree *et al.*, 2001). So ist ein Grund für die Verwendung von serumfreiem Medium bei der Impfstoffproduktion, dass Trypsin durch FCS (Fötale Kälberserum) inhibiert wird. Bei Verwendung von Vero-Zellen wird Trypsin sogar zum Teil während der Virusinfektionsphase nachdosiert, da diese Zellen Protease-Inhibitoren sekretieren (Kaverin & Webster, 1995). Zu hohe Trypsinkonzentrationen können allerdings auch die Prozessausbeute verringern, da sie sich negativ auf die Vitalität der Wirtszellen auswirken (Genzel & Reichl, 2009; Le Ru *et al.*, 2010; Paillet *et al.*, 2011; Pau *et al.*, 2001). Die Verwendung von MDCK-Zellen bietet in diesem Kontext Vorteile, da diese Zellen, verglichen mit z.B. Vero-Zellen (Genzel & Reichl, 2009), hohe Trypsinkonzentrationen tolerieren. In der Literatur sind die bei Influenza-Virusinfektionen verwendeten Trypsinkonzentrationen nicht einheitlich, da die optimale Trypsinkonzentration vermutlich von der Kombination aus verwendeter Zelle, Virusstamm, Medium und Kultivierungsbedingungen abhängt. In fast allen hier zitierten Arbeiten liegt die Trypsinkonzentration jedoch in einem Bereich zwischen 0,1 und 5 µg/mL. Die Vergleichbarkeit dieser Konzentrationen wird allerdings dadurch erschwert, dass die spezifische Aktivität des verwendeten Trypsins häufig nicht angegeben wird.

3 Material und Methoden

In diesem Kapitel sind die verwendeten experimentellen Methoden beschrieben. Bei Standardmethoden unserer Arbeitsgruppe wird auf die zugehörigen, im Anhang aufgeführten Arbeitsanweisungen verwiesen (vgl. 9.3). In dieser Arbeit neu etablierte Techniken sind detailliert aufgeführt. Eine vollständige Auflistung aller verwendeten Geräte und Chemikalien findet sich ebenfalls im Anhang (Tabelle 9-1, Tabelle 9-2).

3.1 Puffer und Medien für die Zell- und Viruskultur

3.1.1 Zellkultur- und Virusinfektionsmedium

Die Herstellung des GMEM-Grundmediums ist in den Arbeitsanweisungen „M 02: Herstellung von Glasgow-MEM-Vollmedium aus gebrauchsfertigen Teillösungen“ und „M 03: Herstellung von Glasgow-MEM-Medium aus Pulvermedium“ beschrieben (vgl. 9.3.1 und 9.3.2). Aus diesem Grundmedium wurde entsprechend Tabelle 3-1 Zellkultur- (Z-Medium) und Infektionsmedium (V-Medium) hergestellt, anschließend sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

Tabelle 3-1: Zusammensetzung von Z- und V-Medium

Komponente	Zellkulturmedium (Z-Medium)	Infektionsmedium (V-Medium)
GMEM, sterilfiltriert	890 mL	990 mL
FCS	100 mL	---
Lab-M-Pepton (20 % in Milli-Q-Wasser, steril)	10 mL	10 mL

3.1.2 Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)

Für die Herstellung von PBS wurden die in Tabelle 3-2 angegebenen Komponenten in Milli-Q-Wasser gelöst und anschließend autoklaviert. PBS wurde danach bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 3-2: Zusammensetzung von PBS

Komponente	Konzentration
Natriumchlorid	8 g/L
Kaliumchlorid	0,2 g/L
Kaliumdihydrogenphosphat	0,2 g/L
Di-Natriumhydrogenphosphat	1,15 g/L

3.1.3 10-fach Trypsinlösung für das Passagieren von Zellen

Die Trypsinlösung wurde nach Tabelle 3-3 angesetzt, sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert. 1-fach konzentriertes Trypsin für das Passagieren von MDCK-Zellen wurde durch Verdünnung der 10-fach Trypsinlösung mit sterilem PBS hergestellt.

Tabelle 3-3: Zusammensetzung der 10-fach Trypsinlösung zum Passagieren von Zellen

Komponente	Menge
Trypsin (1:250 Pulver, 600 -800 BAEE U/mg)	1,25 g
EDTA	0,5 g
PBS	auf 250 mL

3.1.4 500 U/mL Trypsinlösung für die Infektion von MDCK-Zellen mit Influenza-Viren

Unter Verwendung von Trypsin 1:250 Pulver (Gibco) wurde in PBS eine Trypsinkonzentration von 500 BAEE U/mL eingestellt. Das Produkt wurde sterilfiltriert, in sterile 2 mL Kryogefäße aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

3.2 Primer für qPCR- und reverse Transkriptase-Reaktionen

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 3-4 angegeben. Alle Primer wurden von Invitrogen (Life Technologies) synthetisiert. Das Design eigener PCR-Primer erfolgte auf Basis von mRNA-Sequenzen aus der Datenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information). Dabei wurde auf die Software Perl Primer (<http://perlprimer.sourceforge.net/>) oder Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) zurückgegriffen. Für alle Primer wurde eine Annealing-Temperatur von 60 ± 3 °C angestrebt. Die Annealing-Temperaturen des Forward- und Reverseprimers eines Primerpaares sollten sich maximal um 3 °C unterscheiden. Soweit möglich wurde der in der quantitativen real time PCR (qPCR) amplifizierte Sequenzabschnitt der mRNA Intron-übergreifend gewählt, um die Mitamplifikation genomischer DNA auszuschließen. Die Spezifität selbstdesignter Primerpaare wurde durch Sequenzierung des PCR-Produkts sichergestellt.

Tabelle 3-4: Sequenzen der Primer für qPCR- und reverse Transkriptase-Reaktionen

Primer	Sequenz
IFN-β forward	5'-CCAGTTCAGAAAGGAGGACA-3'
IFN-β reverse	5'-TGCCCAGGTGAAGTTTTCC-3'
Mx1 forward	5'-GAATCCTGTACCCAATCATGTG-3'
Mx1 reverse	5'-TACCTTCTCCTCATATTGGCT-3'
M1 forward ¹	5'-CTTCTAACCGAGGTGCGAAACGTA-3'
M1 reverse ¹	5'-GGATTGGTCTTGTCTTTAGCCA-3'
NS1 forward	5'-ATTCACCATTGCCTTCTCTCC-3'
NS1 reverse	5'-AGCCGGTCAAAATTCACACTG-3'
18s forward ²	5'-CGGACAGGATTGACAGATTG-3'
18s reverse ²	5'-CAAATCGCTCCACCAACTAA-3'
IRF7 forward	5'-GATGTGACCATCATGTACAAGG -3'
IRF7 reverse	5'-TTCTCTGTGTAGTGAAGCTG-3'
β-Aktin forward	5'-AAGATCAAGATCATCGCACC-3'
β-Aktin reverse	5'-GTAACGCAACTAAAGTAACAGTCC-3'
GAPDH forward ³	5'-AACATCATCCCTGCTCCAC-3'
GAPDH reverse ³	5'-GACCACCTGGTCCTCAGTGT-3'
UNI12 Primer ⁴	5'-AGCAAAGCAGG-3'
Oligo(dT) Primer	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

¹Di Trani *et al.* (2006); ²<http://medgen.ugent.be/rtrprimerdb>, Primer ID 3879; ³Gropp *et al.* (2006); ⁴Hoffmann *et al.* (2001)

3.3 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 3-5 aufgeführt.

Tabelle 3-5: Übersicht über die verwendeten Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pCAGGS-VP35	Expressionsvektor für Ebola viral protein 35 (VP35)	Prof. Dr. E. Mühlberger, Boston University, School of Medicine
pCR3-P	Expressionsvektor für Rabies Phosphoprotein	M. Rieder, Max von Pettenkofer-Institut, LMU München
pCAGGS-NS1	Expressionsvektor für Influenza A/PR/8/34 NS1	Prof. Dr. G. Kochs, Abteilung Virologie, Universitätsklinikum Freiburg
pCAGGS-TMPRSS2	Expressionsvektor für TMPRSS2 (human)	Dr. E. Böttcher-Friebertshäuser, Institut für Virologie, Universität Marburg
pCAGGS-TMPRSS2(S441A)	Expressionsvektor für TMPRSS2 (human, inaktiv)	Dr. E. Böttcher-Friebertshäuser, Institut für Virologie, Universität Marburg
pmaxGFP	Expressionsvektor für GFP	Amaya / Lonza
pTAL-LUC	Firefly-Reporter mit der TATA-like Promoter Region der Herpes Simplex Virus Thymidinekinase	Clontech
pAP1-LUC	pTAL-Luc mit AP1-Bindemotiv	Clontech
pNFkB-LUC	pTAL-Luc mit NFkB-Bindemotiv	Clontech
pISRE-Luc	pTAL-Luc mit ISRE-Motiv	Clontech
p125-LUC	Firefly-Reporter mit murinem IFN- β Promoter	Prof. Dr. Takashi Fujita, Institute for Virus Research, Kyoto University, Japan
p55-LUC	Leervektor zu p.125-LUC	
pGL3-Mx1P	Firefly-Reporter mit murinem Mx1-Promoter	Prof. Dr. G. Kochs, Abteilung Virologie, Universitätsklinikum Freiburg
pGL3-Empty	Leervektor zu pGL3-Mx1P	selbst hergestellt durch Entfernen des Mx1-Promoters aus pGL3-Mx1P
pGL4.74	Renilla-Reporter mit Herpes Simplex Virus Thymidinekinase Promoter	Promega

3.4 Zell- und Viruskultivierung

3.4.1 Kultivierung von MDCK-Zellen

Für alle Versuche dieser Arbeit wurden MDCK-Zellen (ECACC Nr. 84121903) verwendet. Diese wurden ausgehend von Kryokulturen angezogen (Arbeitsanweisung „Z0.2: Auftauen von MDCK-Zellen“, vgl. 9.3.3) und maximal über 20 Passagen kultiviert. Als Wachstumsmedium kam Z-Medium (vgl. 3.1.1) zum Einsatz. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂.

3.4.2 Passagieren von MDCK-Zellen

Standardmäßig wurden MDCK-Zellen einmal pro Woche weiterpassagiert. Abweichend davon wurden die Zellen bei der Vorkultur für Transfektionsexperimente zwei- bis dreimal pro Woche umgesetzt, um dem Erreichen der stationären Wachstumsphase vorzubeugen. Das Passagieren der Zellen erfolgte gemäß Arbeitsanweisung Z0.4 (vgl. 9.3.4). Kurz zusammengefasst wurde zunächst das verbrauchte Medium verworfen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin bei 37 °C solange inkubiert, bis sich alle Zellen von der Oberfläche des Kulturgefäßes abgelöst hatten (10 – 20 min). Dann wurde die Trypsinaktivität durch Zugabe von Z-Medium abgestoppt. Anschließend wurde ein Teil der Zellen zur Weiterkultivierung in ein neues Kulturgefäß mit Z-Medium überführt. Die verwendeten Volumina von PBS, Trypsin und Zellkulturmedium richteten sich nach dem verwendeten Kulturgefäß und können Tabelle 3-6 entnommen werden.

Tabelle 3-6: Verwendete Mengen PBS, Trypsin und Z-Medium beim Umsetzen von MDCK-Zellen

Kulturgefäß	PBS	Trypsin/EDTA	Z-Medium zum Abstoppen	Z-Medium für Zellwachstum
24-Well Platte ¹	0,5 - 1 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 - 1 mL
6-Well Platte ²	2 - 4 mL	1 mL	1 mL	2 - 4 mL
25 cm ² Flasche	5 – 10 mL	1 mL	1 mL	10 - 20 mL
75 cm ² Flasche	10 – 15 mL	3 mL	3 mL	25 - 50 mL
175 cm ² Flasche	15 – 20 mL	5 mL	5 mL	50 - 100 mL
850 cm ² Rollerflasche	40 – 50 mL	10 mL	10 mL	250 mL

¹ 1,9 cm²/Well, ² 9,6 cm²/Well

3.4.3 Transfektion von MDCK-Zellen

3.4.3.1 Chemische Transfektionsmethoden

Im Folgenden wird die Transfektion unter Verwendung von Metafectene Pro (Biontex), Lipofectamine 2000 und Lipofectamine LTX (beide Invitrogen / Life Technologies) für 1×10^6 MDCK-Zellen und 4 µg Plasmid-DNA im 6-Well Format beschrieben. Dieses Verhältnis von Plasmid-DNA und transfizierter Zellzahl wurde in dieser Arbeit standardmäßig bei Transfektionen zur Überexpression von Proteinen verwendet. Für andere Kulturgefäße (z.B. 24-Well) wurden die verwendeten Zellzahlen, DNA-Mengen und Reagenzienvolumina bei der Transfektion entsprechend dem Verhältnis der Wachstumsoberfläche zum 6-Well Format angepasst. Zum Beispiel ist die Wachstumsfläche eines Wells beim 24-Well-Format um Faktor 5 kleiner als beim 6-Well Format. Dementsprechend wurden hier $0,2 \times 10^6$ Zellen und 0,8 µg Plasmid-DNA verwendet. Die hier angegebenen Verhältnisse von Transfektionsreagenz zu Plasmid-DNA hatten in Optimierungsexperimenten die besten Ergebnisse erzielt.

3.4.3.1.1 Metafectene Pro

24 h vor der Transfektion wurden 1×10^6 subkonfluent gewachsene MDCK-Zellen pro Well in 6-Well Platten ausgesät. Zum Zeitpunkt der Transfektion wurde das Wachstumsmedium nach zweimaligem Waschen mit PBS gegen serumfreies V-Medium ausgetauscht. Für die Transfektion eines Wells wurden in einem sterilem 2 mL Reaktionsgefäß 150 μ L V-Medium mit 28 μ L Metafectene Pro kombiniert und durchmischt. In einem weiteren sterilem 2 mL Reaktionsgefäß wurden 4 μ g Plasmid-DNA in 150 μ L V-Medium aufgenommen. Die Inhalte beider Reaktionsgefäße wurden ohne zu mischen vereint. Nach 20 min bei Raumtemperatur wurde das Produkt tröpfchenweise, verteilt über die gesamte Fläche des Wells, zu den Zellen gegeben. Anschließend wurden die transfizierten Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

3.4.3.1.2 Lipofectamine 2000

24 h vor der Transfektion wurden 1×10^6 subkonfluent gewachsene MDCK-Zellen pro Well in 6-Well Platten ausgesät. Zum Zeitpunkt der Transfektion wurde das Wachstumsmedium nach zweimaligem Waschen mit PBS gegen serumfreies V-Medium ausgetauscht. Für die Transfektion eines Wells wurden in einem sterilem 2 mL Reaktionsgefäß 250 μ L V-Medium mit 20 μ L Lipofectamine 2000 kombiniert und durchmischt. In einem weiteren sterilem 2 mL Reaktionsgefäß wurden 4 μ g Plasmid-DNA in 250 μ L V-Medium aufgenommen. Nach 5 min bei Raumtemperatur wurde der Inhalt des Reaktionsgefäßes mit der Plasmid-DNA mit dem des anderen Reaktionsgefäßes unter vorsichtigem Mischen vereint. Nach 30 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Produkt tröpfchenweise, verteilt über die gesamte Fläche des Wells, zu den Zellen gegeben. Anschließend wurden die transfizierten Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

3.4.3.1.3 Lipofectamine LTX

24 h vor der Transfektion wurden 1×10^6 subkonfluent gewachsene MDCK-Zellen pro Well in 6-Well Platten ausgesät. Zum Zeitpunkt der Transfektion wurde das Wachstumsmedium nach zweimaligem Waschen mit PBS gegen serumfreies V-Medium ausgetauscht. Für die Transfektion eines Wells wurden in einem sterilem 2 mL Reaktionsgefäß 500 μ L V-Medium, 4 μ g Plasmid-DNA und 2,5 μ L Plus-Reagenz (Bestandteil des Lipofectamine-LTX-Kits) vermischt. Nach 5 min bei Raumtemperatur wurden 20 μ L Lipofectamine LTX hinzugefügt und erneut durchmischt. Das Produkt wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde es tröpfchenweise, verteilt über die gesamte Fläche des Wells, zu den Zellen gegeben. Die transfizierten Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

3.4.3.2 Chemische Transfektion frisch ausgesäter MDCK-Zellen

Der Ablauf der Transfektion von frisch ausgesäten MDCK-Zellen mit Metafectene Pro, Lipofectamine 2000 und Lipofectamine LTX war zu 3.4.3.1 identisch. Die Zellen wurden jedoch nur 3 h vor der

Transfektion ausgesät. Weiterhin wurde auf einen Medienwechsel zu serumfreiem Medium vor der Transfektion verzichtet.

3.4.3.3 Nucleofector

Die Transfektion mit dem Nucleofector (Amaxa/Lonza) erfolgte unter Verwendung des Amaxa Cell Line Nucleofector Kit L gemäß dem Protokoll des Herstellers für MDCK-Zellen.

3.4.3.4 Elektroporation mit dem Microporator

Mit dem Microporator (Digital Bio / Life Technologies) ließen sich MDCK-Zellen sehr effizient transfizieren. Das Verfahren hat allerdings zwei Nachteile: (1) Erfahrungsgemäß übersteht etwa ein Drittel der Zellen die Elektroporation nicht. Zielzellzahlen für Infektionsexperimente waren pro Well 1 x 10⁶ Zellen bei 6-Well Platten und 0,2 x 10⁶ Zellen bei 24-Well Platten. Um diese zu erreichen wurden daher pro Well 1,5 x 10⁶ Zellen bei 6-Well Platten und 0,3 x 10⁶ Zellen bei 24-Well Platten transfiziert. (2) Die Materialkosten sind bei diesem proprietären Verfahren vergleichbar hoch. Bei Experimenten im 6- oder 24-Well Format wurden die Zellen daher nicht Well für Well transfiziert, sondern nach Möglichkeit die Zellen für mehrere Wells zusammen transfiziert und erst anschließend aufgeteilt. So können nach Herstellerangaben bei einer Elektroporation bis zu 5 x 10⁶ Zellen transfiziert werden. In dieser Arbeit wurden die besten Ergebnisse hinsichtlich Transfektionseffizienz und Zellvitalität jedoch bei Verwendung von nur 3 – 4 x 10⁶ Zellen pro Elektroporation erzielt.

Die Transfektion mit dem Microporator erfolgte unter Verwendung des Neon Transfection System 100 µL Kits. Ausgegangen wurde von subkonfluent gewachsenen MDCK-Zellen. Diese wurden zunächst gemäß 3.4.2 trypsinisiert. Nach Abstoppen der Trypsinaktivität mit Z-Medium wurde die Zellkonzentration der Suspension bestimmt (vgl. 3.5.1). Die für das jeweilige Experiment benötigte Zellmenge wurde in ein steriles 50 mL Zentrifugationsgefäß überführt und 7 min bei 300 g (Raumtemperatur) zentrifugiert. Der Überstand wurde möglichst vollständig unter Verwendung einer Vakuumsaugvorrichtung abgenommen und das Pellet in 40 mL PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde erneut 7 min bei 300 g (Raumtemperatur) zentrifugiert und der Überstand anschließend rückstandsfrei abgenommen. Nun wurde das Pellet in Puffer R (Bestandteil des Neon-Transfektionskits) resuspendiert. Pro Transfektion waren 100 µL Puffer R erforderlich. Die Anzahl der Transfektionen wurde jeweils so gewählt, dass pro Einzeltransfektion 3 – 4 x 10⁶ Zellen elektroporiert wurden. Anschließend wurde pro 1 x 10⁶ Zellen 4 µg des zu transfizierenden Plasmids hinzugegeben. Sollte eine geringere Menge des Expressionsvektors transfiziert werden, wurde die Differenz zu 4 µg DNA pro 1 x 10⁶ Zellen mit einem entsprechenden Leervektor aufgefüllt. Abweichungen von diesem Verhältnis von DNA und Zellzahl wirkten sich direkt auf Transfektionseffizienz und Vitalität der transfizierten Zellen aus. Weiterhin durften pro 100 µL Puffer R nur maximal 10 µL DNA zugegeben werden. Höhere Volumenanteile der DNA verschlechterten die Vitalität nach der Transfektion. Die

Konzentration der verwendeten DNA musste dementsprechend ausreichend hoch sein. Gleichzeitig wirkte das zugegebene DNA-Volumen aber auch als Toleranzvolumen bei der Befüllung der Elektroporationsspitze. Diese Befüllung musste blasenfrei erfolgen, da sich sonst die Vitalität der Zellen nach der Elektroporation drastisch verschlechterte. Waren weniger als 10 µL DNA erforderlich, wurde die Differenz zu 10 µL mit Puffer R ausgeglichen.

Nach Zugabe der DNA wurde die Zellsuspension mit der Elektroporationspipette durchmischt. Danach wurden 100 µL der Zellsuspension mit der Elektroporationspipette aufgenommen und mit einem Puls für 20 ms bei 1700 V elektroporiert. Diese Parameter hatten sich in Optimierungsexperimenten als am besten geeignet erwiesen. Anschließend wurden die Zellen in vorgewärmtes Z-Medium (37 °C) gegeben. Dabei war ein Kontakt der Spitze für die Elektroporationspipette mit dem Medium zu vermeiden, falls die Spitze nochmals (maximal zweimal) verwendet werden sollte. Spuren von Serum wirkten sich bei der Elektroporation negativ auf die Vitalität der transfizierten Zellen aus. Nach Abschluss aller Elektroporationen wurden die Zellen im Z-Medium falls notwendig nochmals vereinzelt und anschließend auf die jeweils erforderliche Menge Einzelkulturgefäße aufgeteilt.

3.4.4 Infektion mit Influenza-Viren

Die in dieser Arbeit verwendeten Influenza-Virusstämme sind in Tabelle 3-7 aufgeführt. Alle Virusstämme wurden zuvor an das Wachstum in MDCK-Zellen adaptiert.

Tabelle 3-7: Übersicht über die hier verwendeten Influenza-Virusstämme

Stamm	Subtyp	Bezugsquelle
A/PR/8/34	H1N1	National Institute for biological Standards and Control (NIBSC) ¹
A/PR/8/34	H1N1	Robert Koch-Institut (RKI)
A/PR/8/34-delNS1	H1N1	AVIR Greenhills Biotechnology
A/WSN/33	H1N1	G. Kochs, Abteilung Virologie, Universitätsklinikum Freiburg
B/Malaysia/2506/2004	-	NIBSC ²

¹NIBSC Produktnummer: 06/114; ²NIBSC Produktnummer: 07/132

Alle Infektionsexperimente dieser Arbeit wurden in 6- oder 24-Well Platten durchgeführt. Die dabei verwendeten Zellzahlen, Medien- und Reagenzienvolumina sind in Tabelle 3-8 zusammengefasst. Wie dort angegeben wurden die Zellen 24 h vor der Infektion in die entsprechenden Kulturgefäße ausgesät. Für die Virusinfektion wurden die Zellen dann zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden V-Medium, Trypsin, gegebenenfalls Gentamicin sowie das Influenza-Saatvirus zu den Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. MOCK-infizierte („Schein-infizierte“) Kontrollen wurden genauso behandelt, jedoch wurde statt Saatvirus weiteres V-Medium zugegeben.

Tabelle 3-8: Zellzahlen, Medien-, Trypsin- und Virusvolumina bei der Zellaussaat und Virusinfektion in 6- und 24-Wellplatten

		6-Well	24-Well
1. Zellaussaat	Zellinokulum	1x10 ⁶	2x10 ⁵
	Z-Medium	2 mL	1 mL
2. Virusinfektion (24 h später)	Trypsin (500 U/mL)	20 µL	5 µL
	Gentamicin (10 mg/mL) ¹	20 µL	5 µL
	Virus	gemäß MOI	gemäß MOI
	V-Medium	auf 2 mL	auf 0,5 mL

¹ Antibiotika wurden nur bei Infektion von zuvor transfizierten oder mit konditioniertem Medium stimulierten Zellen verwendet

Das zur Realisierung der angestrebten MOI (Multiplicity of Infection) zu verwendende Saatvirusvolumen ergab sich nach Gleichung 3-1. Wurden die zu infizierenden Zellen wie hier beschrieben 24 h vor der Infektion ausgesät, so wurde das Saatvirusvolumen auf Basis der eingesäten Zellzahl berechnet. In den ersten 24 h nach Aussaat fand üblicherweise kein Zellwachstum statt, so dass die Zellzahl zum Zeitpunkt der Infektion der eingesäten Zellzahl entsprach. Wenn transfizierte Zellen infiziert wurden, wurde zum Zeitpunkt der Infektion die Zellzahl von mindestens zwei zusätzlich angesetzten, gleichbehandelten Wells entsprechend 3.5.1 bestimmt. Mit dem Mittelwert dieser Zellzahlen wurde das Saatvirusvolumen berechnet.

Gleichung 3-1:

$$V_{\text{Saatvirus}} = \frac{N_{\text{Zellen}} \times MOI}{TCID_{50(SV)}}$$

$V_{\text{Saatvirus}}$	Volumen zuzugebendes Saatvirus [mL]
N_{Zellen}	Lebendzellzahl im Kulturgefäß [Zellen]
MOI	Multiplicity of Infection
$TCID_{50(SV)}$	Konzentration infektiöser Viruspartikel im Saatvirus [ml ⁻¹]

3.4.5 Herstellung eines PR8-NIBSC Saatvirus mit hohem Anteil infektiöser Viren an der Gesamtpartikelzahl (21,3 %)

Um den Anteil infektiöser Viren an der Gesamtpartikelzahl bei PR8-NIBSC zu steigern, wurde ein vorhandenes PR8-NIBSC Saatvirus (0,26 % infektiös) bei sehr geringer MOI passagiert. Ziel dieses Vorgehens war es, eventuell vorhandene defekte interferierende Partikel „auszuverdünnen“. Zwei Tage vor der Infektion wurden zwei T175-Flaschen mit je 15 x 10⁶ MDCK-Zellen inokuliert. Zum Zeitpunkt der Infektion wurde die Zellzahl einer Flasche bestimmt und die andere entsprechend Gleichung 3-1 bei MOI 0,00001 infiziert. Das Medienvolumen bei der Infektion betrug 50 mL und die Trypsinkonzentration 5 U/mL. 40 h post Infektion (p.i.) wurde das neue Saatvirus (21,3 % infektiöse Partikel) geerntet, aliquotiert und danach bei -80 °C gelagert.

3.4.6 Thermische und chemische Inaktivierung von Influenza-Viren

Die chemische Virusinaktivierung erfolgte gemäß der Arbeitsanweisung „Chemische Inaktivierung von Influenza-Viren mit β-Propiolacton“ (vgl. 9.3.8). Die thermische Inaktivierung von Influenza-Viren

wurde mit Modifikationen nach Lindenmann *et al.* (1957) durchgeführt. 7 Teile Influenza-Saatvirus wurden in sterilen 2 mL Reaktionsgefäßen mit zwei Teilen einer 2 % Natriumcitrat-Lösung in PBS gemischt. Anschließend wurde die Mischung solange geschüttelt, bis sich anhand der Färbung des Phenolrots im Saatvirus ein alkalischer pH-Wert eingestellt hatte. Dann wurde die Mischung bei 56 °C im Thermomixer inaktiviert. Die Dauer der Inaktivierung ist in den jeweiligen Experimenten angegeben.

3.4.7 Stimulation von MDCK-Zellen mit konditioniertem Medium

Für die Herstellung von IFN-haltigem konditioniertem Medium (CM) wurden MDCK-Zellen mit PR8-delNS1 bei MOI 5 ohne Zugabe von Trypsin infiziert. Der Zellkulturüberstand wurde 14 h p.i. geerntet und für 10 min bei 300 g zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand erneut für 15 min bei 10000 g zentrifugiert. Zur Abtrennung des Virus wurden 14 mL CM in einen Vivaspin 20 Zentrifugationsfilter (100 kDa cut-off) überführt und bei 5000 g für 20 min zentrifugiert. Alle hier genannten Zentrifugationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. MOCK-CM von nicht-infizierten MDCK-Zellen wurde genauso hergestellt und diente bei Stimulationsexperimenten als Kontrolle.

Für IFN-Stimulationen mit anschließender Virusinfektion wurden 1×10^6 MDCK-Zellen in 6-Well-Platten für 5 h mit 1,5 mL virusfreiem CM inkubiert. Anschließend wurden das Saatvirus, 20 µL Trypsin (500 U/mL) sowie 20 µL Gentamicin (10 mg/mL) zugegeben und das Gesamtvolumen je Well mit frischem V-Medium aus 2 mL aufgefüllt. Stimulationen ohne anschließende Virusinfektion erfolgten in 24-Well Platten. $0,2 \times 10^6$ Zellen/Well wurden mit 0,5 mL CM für 3 h stimuliert.

3.5 Analytik

3.5.1 Zellzahlbestimmung

Zellzahlbestimmungen erfolgten gemäß der Kurzanleitung „Zellzählgerät ViCell XR“ (vgl. 9.3.5). Kurz zusammengefasst wurden die Zellen zunächst wie unter 3.4.2 beschrieben vollständig trypsinisiert und das Trypsin durch Zugabe von Z-Medium abgestoppt. Die Zellsuspension wurde anschließend im ViCell XR (Beckman Coulter) unter Verwendung des Protokolls „MDCK50“ vermessen. Das Gerät führt eine Trypanblau-Färbung durch und gibt als Ergebnis die Lebend- und die Gesamtzellkonzentration der vermessenen Probe aus.

3.5.2 HA-Assay

Die Durchführung des HA-Assays ist in Arbeitsanweisung „V05: HA-Assay“ (vgl. 9.3.6) beschrieben. Ergänzend dazu wurden Proben, bei denen ein HA-Titer $> 3 \log \text{ HA} / 100 \mu\text{L}$ zu erwarten war, in dieser Arbeit 1 zu 10 mit PBS vorverdünnt. Der Fehler einer Einzelmessung (95 % Konfidenzintervall)

im HA-Assay beträgt $\pm 0,149 \log \text{HA} / 100 \mu\text{L}$ (Kalbfuss *et al.*, 2008). Der HA-Assay beruht auf der Eigenschaft des viralen Hämagglutinins, Erythrozyten durch Bindung an Sialinsäuren auf deren Zelloberflächen zu vernetzen (Mahy & Kangro, 1996). Dies wird als Hämagglutination bezeichnet. Der HA-Assay misst daher jedes Viruspartikel mit funktionalem HA, unabhängig von dessen Infektiosität. Unter der Annahme, dass in der dem HA-Titer zugrunde liegenden Verdünnungsstufe das Verhältnis von Erythrozyten zu Viren eins beträgt (Burlison *et al.*, 1992), kann die absolute Partikelzahl aus dem HA-Titer nach Gleichung 3-2 berechnet werden:

Gleichung 3-2 :

$$C_{(\text{Virus})} = 10^{\log \text{HA} / 100 \mu\text{L}} \times C_{(\text{ER})}$$

$C_{(\text{Virus})}$	Viruskonzentration (mL^{-1})
$C_{(\text{ER})}$	Konzentration Erythrozyten (mL^{-1})
HA	HA-Titer, vgl. 3.5.2

3.5.3 TCID₅₀

Die Konzentration infektiöser Viruspartikel wurde in Form der „50 % tissue culture infective dose“ (TCID₅₀) durch Immuntitration bestimmt. Die experimentelle Vorgehensweise kann der Arbeitsanweisung „V 08: Bestimmung des TCID50“ (vgl. 9.3.7) entnommen werden. Für diesen Assay beträgt das Detektionslimit $3,2 \times 10^2$ infektiöse Viren / mL und der Standardfehler $\pm 0,3 \log \text{TCID}_{50}$.

3.5.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

DNA- oder RNA-Konzentrationen wurden durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Die Messung erfolgte mit dem Infinite 200 PRO NanoQuant (Tecan) unter Verwendung der NanoQuant-Platte (Tecan). Eine A260-Unit entsprach einer DNA-Konzentration von 50 ng/ μL bzw. einer RNA-Konzentration von 40 ng/ μL .

3.5.5 Genexpressionsbestimmung mit quantitativer reverse Transkriptase PCR

3.5.5.1 Probenahme

Das Medium der zu untersuchenden Zellkultur wurde abgenommen und falls erforderlich für die Virustiterbestimmung verwendet. Bei Verwendung von serumhaltigem Medium wurden die Zellen anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Bei serumfreien Medium war dieser Waschschrift nicht erforderlich. Danach wurden die Zellen durch Zugabe von 350 μL RA1-Puffer (Bestandteil des NucleoSpin RNA II Kits von Macherey-Nagel) mit 1 % β -Mercaptoethanol lysiert. Dieses Puffervolumen ist nach Herstellerangaben ausreichend für die Lyse von bis zu 5×10^6 Säugerzellen und wurde daher sowohl in 6-Well als auch 24-Well Platten verwendet. Bei 6-Well Platten wurde das Lysat anschließend mittels Zentrifugation (11000 g, 1 min, Raumtemperatur) durch eine Schredder-Säule (Bestandteil des NucleoSpin RNA II Kits von Macherey-Nagel) homogenisiert. Im 24-Well

Format war keine Homogenisierung erforderlich. Das Lysat wurde abschließend in sterile 2 mL Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C gelagert.

3.5.5.2 Isolation der zellulären RNA

Die Zellysate wurden auf Eis aufgetaut. Dann erfolgte die Extraktion der RNA mit gleichzeitigem DNase-Verdau der zellulären DNA mit dem NucleoSpin RNA II Kit von Macherey-Nagel gemäß Herstellerangaben (Protokoll „Total RNA purification from cultured cells and tissue with NucleoSpin RNA II“ im Handbuch des Kits). Die RNA-Konzentration des Extraktes wurde bestimmt (vgl. 3.5.4) und dieses anschließend bei -80 °C gelagert.

3.5.5.3 Reverse Transkription der zellulären RNA

Die reverse Transkription (RT) der zellulären RNA erfolgte mit Oligo(dT)-Primern (vgl. Tabelle 3-4) unter Verwendung der RevertAid H Minus Reverse Transkriptase und des RiboLock RNase-Inhibitors (beide Fermentas) gemäß Herstellerangaben. Die Reaktion erfolgte in einem T3000 Thermocycler (Biometra). Das Reaktionsvolumen betrug je nach benötigter cDNA-Menge 10 µL oder 20 µL. Für alle Proben eines Experiments wurde dieselbe RNA-Menge (ng pro Reaktion) umgeschrieben. Nach Möglichkeit wurden pro 10 µL Reaktion 500 ng RNA und pro 20 µL Reaktion 1000 ng RNA eingesetzt. Die RNA-Konzentration von Proben aus der späten Phase der Virusinfektion war dazu jedoch aufgrund der Apoptose-Induktion teilweise zu gering. Lagen solche Proben in einem Experiment vor, wurde von der am geringsten konzentrierten Probe die größtmögliche Menge RNA umgeschrieben und die restlichen Proben auf dieselbe RNA-Menge in der RT-Reaktion eingestellt. Typischerweise betrug die umgeschriebene RNA-Menge in solche Fällen 200 – 400 ng pro 10 µL Reaktion. Nach Abschluss der RT-Reaktion wurden die cDNAs bei -20 °C gelagert.

3.5.5.4 qPCR

Die qPCR wurde entweder auf einem iCycler (Biorad) oder einem Rotor-Gene Q (Qiagen) mit den in Tabelle 3-4 aufgeführten Primern durchgeführt. Bei Verwendung des iCyclers kam der MESA GREEN Master Mix Plus (Eurogentec) zum Einsatz. Das Volumen eines PCR-Ansatzes betrug 25 µL. Pro PCR-Ansatz wurde 1 µL der RT-Reaktionsprodukte (vgl. 3.5.5.3) analysiert. Auf dem Rotor-Gene Q wurde der Rotor-Gene SYBR Green PCR Mix (Qiagen) verwendet. Hier betrug das Volumen eines PCR-Ansatzes 10 µL und es wurden pro Ansatz 0,4 µL der RT-Reaktionsprodukte (vgl. 3.5.5.3) verwendet. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes, sowie die Temperaturführung bei der Reaktion entsprachen in beiden Fällen den Herstellerangaben zu den kommerziellen Mastermixen. Jede cDNA wurde doppelt gemessen.

3.5.5.5 Berechnung der relativen Genexpression

Die relative Genexpression wurde nach der $2^{-\Delta\Delta cq}$ -Methode entsprechend Gleichung 3-3 bestimmt (Livak & Schmittgen, 2001). β -Aktin oder GAPDH wurden in Experimenten ohne Virusinfektion, z.B. bei der Bestimmung der Mx1-Expression in CM-stimulierten Zellen, als Referenzgene gemessen. Bei Infektionsexperimenten waren diese Gene jedoch ungeeignet, da ihre Expression im Verlauf der Virusinfektion abnahm. In infizierten Zellen wurde daher 18s rRNA als Referenzgen verwendet. Die Konzentration ribosomaler RNA blieb in der Zelle über den Verlauf der Virusinfektion konstant.

Gleichung 3-3:

$$E_{rel} = 2^{-(cq_{GOI} - cq_{REF}) - (cq_{GOI,cal} - cq_{REF,cal})}$$

cq_{GOI} crossing point des Zielgens („gene of interest“) in infizierter Probe
 $cq_{GOI,cal}$ crossing point des Zielgens in der Kalibratorprobe (uninfizierte Kontrolle)
 cq_{REF} crossing point des Referenzgens in infizierter Probe
 $cq_{REF,cal}$ crossing point des Referenzgens in der Kalibratorprobe (uninfizierte Kontrolle)

Der technische Fehler der nach Gleichung 3-3 ermittelten Genexpression ergab sich nach Nordgård *et al.* (2006) durch lineare Fehlerfortpflanzung aus den Standardabweichungen der Mehrfachbestimmungen der vier in die Berechnung einfließenden cq-Werte (Gleichung 3-4).

Gleichung 3-4:

$$\frac{\sigma(E_{rel})}{E_{rel}} = \ln(2) \times \sqrt{\sigma(cq_{GOI})^2 + \sigma(cq_{GOI,cal})^2 + \sigma(cq_{REF})^2 + \sigma(cq_{REF,cal})^2 + COV}$$

$$COV = -2cov(cq_{GOI}, cq_{GOI,cal}) - 2cov(cq_{GOI}, cq_{REF}) + 2cov(cq_{GOI}, cq_{REF,cal}) + 2cov(cq_{GOI,cal}, cq_{REF}) - 2cov(cq_{GOI,cal}, cq_{REF,cal}) - 2cov(cq_{REF}, cq_{REF,cal})$$

$\sigma(E_{rel})$ Standardabweichung

E_{rel} relative Genexpression

cq_{GOI} crossing point des Zielgens („gene of interest“) in infizierter Probe

$cq_{GOI,cal}$ crossing point des Zielgens in der Kalibratorprobe (Kontrolle)

cq_{REF} crossing point des Referenzgens in infizierter Probe

$cq_{REF,cal}$ crossing point des Referenzgens in der Kalibratorprobe (Kontrolle)

Bei den in dieser Arbeit verwendeten, SYBR Green-basierten Assays wurden die cq-Werte für jedes Gen und jede Probe in unabhängigen Einzelreaktionen bestimmt. Die Einzelwerte der Doppelbestimmungen einer Probe für Ziel- und Kalibratorgen waren demnach nicht korreliert, so dass der Kovarianzterm in Gleichung 3-4 für die hier verwendeten Assays entfiel (Nordgård *et al.*, 2006).

3.5.6 Bestimmung von Virustitern mittels qRT-PCR

2 mL Medium einer infizierten Zellkultur wurden in ein steriles 2 mL Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 300 g (Raumtemperatur) zentrifugiert. Von dem Überstand wurden 140 µL abgenommen und daraus mit dem NucleoSpin RNA Virus Kit (Macherey-Nagel) die virale RNA gemäß Herstellerangaben isoliert. 11,5 µL der isolierten RNA wurden anschließend in einem Gesamtreaktionsvolumen von 20 µL mit der RevertAid H Minus Reverse Transkriptase (Fermentas) gemäß Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Als Primer kam dabei der Uni12-Primer (Hoffmann *et al.*, 2001) zum Einsatz, der an die konservierten Enden der Influenza-Virus Genomsegmente bindet. Die RT-Produkte wurden dann entsprechend 3.5.5.4 unter Verwendung des in Tabelle 3-4 angegebenen Primerpaars für das Influenza-Virus Matrixprotein vermessen. Bei der Messung wurde eine Plasmid-Standardreihe (A/PR/8/34 Segment 7 in pGEM, abgedeckter Konzentrationsbereich $4,5 \times 10^6$ bis $4,5 \times 10^{10}$ Plasmidkopien / mL) mitgeführt. Die Kalibrierfunktion wurde durch lineare Regression aus den Messergebnissen zu der Standardreihe ermittelt. Damit wurde die M1-Kopienzahl in der cDNA-Probe bestimmt. Davon ausgehend konnte unter Berücksichtigung der der Messung vorangegangenen Aufarbeitungsschritte die virale Genomkopienzahl in der Probe ermittelt werden (Gleichung 3-5).

Gleichung 3-5

$$C_{\text{virale Genomkopien}} = 10^{\left(\frac{cq-b}{m}\right)} \times \frac{V_{RT}}{V_{cDNA,qPCR}} \times \frac{V_{RNA,E}}{V_{RNA,RT}} \times \frac{1}{V_{\text{sample}}}$$

$C_{\text{virale Genomkopien}}$ Konzentration der Kopien des viralen Segment 7 (Matrixprotein) in der Probe [Kopien/mL]

cq crossing point der Probe in der qPCR

b Achsenabschnitt der Kalibriergeraden

m Steigung der Kalibriergeraden

V_{RT} Volumen der reverse Transkriptase-Reaktion [mL]

$V_{cDNA,qPCR}$ Volumen des in der qPCR analysierten Anteils der der reverse Transkriptase-Reaktion [mL]

$V_{RNA,E}$ Elutionsvolumen bei der RNA-Präparation [mL]

$V_{RNA,RT}$ Volumen des in die reverse Transkriptase-Reaktion eingesetzten Anteils der isolierten RNA [mL]

V_{sample} Volumen des Mediums, aus dem die RNA isoliert wurde [mL]

3.5.7 Luciferasebasierte Reporterger-Assays in MDCK-Zellen

3.5.7.1 Transfektion von Reportervektoren

Die Transfektion für die Durchführung von Reporterger-Assays in MDCK-Zellen wurde von Dr. C. Ehrhardt (Institut für Molekulare Virologie, Universität Münster) übernommen und wich von den zuvor beschriebenen Transfektionsmethoden ab. Hier war es nicht Ziel, die Zellen effizient, sondern möglichst schonend zu transfizieren. So sollte die Hintergrund-Luciferaseaktivität reduziert werden.

Die Transfektion der Zellen erfolgte in Suspension im 24-Well Format. Für ein Well wurden zunächst 200 ng des Firefly-Reportervektors und 20 ng des Renilla-Kontrollvektors in 10 µL V-Medium aufgenommen. Gleichzeitig wurden 2,5 µL Lipofectamine 2000 in 50 µL V-Medium gegeben. Beide Ansätze wurden 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend unter vorsichtigem Durchmischen vereint. Die Mischung wurde nochmals 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Parallel dazu wurden subkonfluent gewachsene MDCK-Zellen gemäß 3.4.2 trypsinisiert. Die Zellkonzentration der so entstandenen Zellsuspension wurde mit Z-Medium auf 1×10^6 Zellen/mL eingestellt. Die DNA/Lipofectamin 2000-Mischung wurde nach Ablauf der Inkubationszeit vollständig zu 0,5 mL dieser Zellsuspension gegeben. Es wurde gut durchmischt, das Produkt anschließend in ein Well einer 24-Well-Platte überführt und bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert.

3.5.7.2 Probenahme für den Reporteragen-Assay

Das Medium wurde abgenommen und für die Virustiterbestimmung verwendet oder verworfen. Dann wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 100 µL 1X PLB (passive lysis buffer, Promega) zugegeben und die Kulturgefäße für 15 min bei Raumtemperatur auf einem Thermomixer bei 600 rpm geschüttelt. Die Lysate wurden anschließend in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und bei -20 °C gelagert. Es war wichtig, dass die Proben vor der Messung mindestens einmal eingefroren und wieder aufgetaut wurden, da nur so von einer vollständigen Lyse ausgegangen werden konnte.

3.5.7.3 Bestimmung der Luciferaseaktivität

Firefly- und Renilla-Luciferasepuffer wurden für jede Messung frisch entsprechend Tabelle 3-9 und Tabelle 3-10 angesetzt. Für die Messung wurden 20 µL Zelllysat in ein Well einer weißen 96-Well Platte gegeben. Die Messung erfolgte mit einem Berthold Centro L960 Luminometer. Das Gerät injizierte zunächst 100 µL Firefly-Puffer zu der Probe. Es wurde 5 s bei Raumtemperatur inkubiert und dann die Firefly Luciferaseaktivität für 5 s gemessen. Anschließend wurden 100 µL Renilla-Puffer zugegeben, 5 s bei Raumtemperatur inkubiert und die Renilla Luciferaseaktivität für 5 s gemessen.

Tabelle 3-9: Zusammensetzung des Firefly-Luciferase-Puffers, übernommen aus Dyer *et al.* (2000)

Komponente	Konzentration
Glycylglycin	25 mM
Ethylenglycol Tetraessigsäure (EGTA)	4 mM
Adenosintriphosphat (ATP)	2 mM
Dithiothreitol (DTT)	1 mM
Magnesiumsulfat	15 mM
Coenzym A	0,1 mM
Luciferin	0,075 mM
lösen in 15 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 8	

Tabelle 3-10: Zusammensetzung des Renilla-Luciferasepuffers, übernommen aus Sherf *et al.* (2002)

Komponente	Konzentration
Natriumpyrophosphat	15 mM
Natriumacetat	7,5 mM
1,2-Cyclohexandinitrilotetraessigsäure (CDTA)	10 mM
Dinatriumsulfat	400 mM
APMBT (2-(4-Aminophenyl)-6-methylbenzothiazol) ¹	0,025 mM
Coelenterazine ²	0,00143 mM
mit Essigsäure auf pH 5,5 einstellen	

¹ als 100x Stock-Lösung in Methanol; ² als 50x Stock-Lösung in Methanol

3.5.7.4 Berechnung der relativen Induktion der Reportervektoren

Die relative Induktion der Reportervektoren ergab sich aus den gemessenen Luciferase-Aktivitäten gemäß Gleichung 3-6. Die Luciferasesignale des Renilla-Konstrukts mit konstitutiv aktivem Promoter dienen dabei dazu, experimentelle Schwankungen zwischen einzelnen Proben (z.B. Schwankungen in der Transfektions- oder Lyseeffizienz) auszugleichen. Die Signale der Firefly-Konstrukte mit den induzierbaren Promotern repräsentierten die relative Aktivierung der Promotoren durch die Virusinfektion.

Gleichung 3-6:

$$I_{rel} = \frac{\frac{FF_{inf.}}{RE_{inf.}}}{\frac{FF_{MOCK}}{RE_{MOCK}}}$$

I_{rel} relative Induktion des untersuchten Promoters
 $FF_{inf.}$ Firefly Luciferase-Aktivität in der infizierten Probe
 $RE_{inf.}$ Renilla Luciferase-Aktivität in der infizierten Probe
 FF_{MOCK} Firefly Luciferase-Aktivität in der MOCK-infizierten Kontrolle
 RE_{MOCK} Renilla Luciferase-Aktivität in der MOCK-infizierten Kontrolle

3.5.8 Proteinanalytik

3.5.8.1 RIPA-Puffer

Die RIPA-Stocklösung wurde gemäß Tabelle 3-11 angesetzt und bei 4 °C gelagert. Vor jedem Experiment wurde aus dieser Stock-Lösung frischer RIPA-Lysepuffer nach Tabelle 3-12 angesetzt.

Tabelle 3-11: Zusammensetzung des RIPA-Stocks

Komponente	Konzentration
Tris-Base	50 mM
EDTA	5 mM
Natriumchlorid	150 mM
Dikaliumhydrogenphosphat	10 mM
Glycerin	10%
Triton X-100	1%
SDS	0,05 % (w/V)
in Milli-Q-Wasser, pH auf 7,5 eingestellt	

Tabelle 3-12: Zusammensetzung RIPA-Lysepuffer

Komponente	Konzentration
Natriumvanadat	1 mM
Natriummolybdat	1 mM
Natriumfluorid	20 mM
PMSF	200 µM
Natriumpyrophosphat	10 mM
Glycerol-2-Phosphat	20 mM
Protease-Inhibitoren (Roche)	1x
RIPA-Stock	67%
mit Milli-Q-Wasser auf 100 % auffüllen	

3.5.8.2 Probenahme für die Western Blot-Analyse von IFN- β aus dem Kulturüberstand von infizierten MDCK-Zellen

Zunächst wurden wie unter 3.4.7 beschrieben die Viruspartikel im zu untersuchenden Zellkulturüberstand durch Ultrafiltration abgetrennt. Anschließend wurden 15 mL des virusfreien Zellkulturüberstands mit 30 mL TCA-Puffer (20 % Trichloressigsäure, 50 % Aceton und 20 mM Dithiothreitol in Milli-Q-Wasser) vermischt und für 20 min bei -20 °C inkubiert. Danach wurde erneut durchmischt und die Proteinfällung über Nacht bei 4 °C fortgesetzt. Das Gemisch wurde für 3 h bei 10000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in eiskaltem Aceton/DTT (80 % Aceton, 20 mM Dithiothreitol in Milli-Q-Wasser) homogenisiert und anschließend für 15 min, 17000 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Wasch- und Zentrifugationsschritt nochmals wiederholt. Danach wurde das Pellet bei Raumtemperatur unter dem Abzug getrocknet. Über Nacht wurde das Pellet bei 4 °C in 20 μ L RIPA-Puffer resuspendiert und danach komplett auf ein SDS-Gel (12 %) geladen.

3.5.8.3 Probenahme für die Western Blot-Analyse von viralen Proteinen aus dem Kulturüberstand von infizierten MDCK-Zellen

50 mL des zu untersuchenden Zellkulturüberstands wurden zunächst in drei aufeinanderfolgenden Zentrifugationsschritten (100 g für 20 min, 4000 g für 35 min und 10000 g für 45 min, alle bei 4 °C) vorgeklärt. Dabei wurde das Pellet jeweils verworfen und der Überstand weiterprozessiert. Anschließend wurden die Viruspartikel aus 30 mL des vorgeklärten Kulturüberstands durch Ultrazentrifugation (58000 g, 90 min, 4 °C) pelletiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Pellet in 200 μ L RIPA-Puffer resuspendiert. Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA-Assay bestimmt (vgl. 3.5.8.5). 1 μ g Protein war für die Analyse von viralem HA und M1 im Western Blot ausreichend. Gelagert wurden die Proteinproben bei -80 °C.

3.5.8.4 Probenahme für die Western Blot-Analyse von zellulären Proteinen

Die zugehörigen Experimente wurden im 6-Well Format durchgeführt. Nach Abnahme des Mediums wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die 6-Well Platten auf Eis gestellt und die Zellen in 200 μ L RIPA-Puffer pro Well lysiert. Die Lyse wurde durch Verwendung eines Zellschabers unterstützt. Das Lysat wurde mit einer sterilen Kanüle homogenisiert und anschließend für 10 min bei 17000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde danach entsprechend der Anzahl geplanter Western Blot-Analysen aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA-Assay bestimmt (vgl. 3.5.8.5). Für die Western Blot-Analyse von Mx1 wurden 20 μ g Protein und für die Detektion von pSTAT2 50 μ g Protein verwendet.

3.5.8.5 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) gemäß Herstellerangaben bestimmt. Zellproteinproben wurden vor der Messung 1 zu 10 mit Milli-Q-Wasser verdünnt.

3.5.8.6 SDS-PAGE / Western Blot

Die Auftrennung von Proteinproben in der SDS-Page mit anschließendem Western Blot und Immundetektion erfolgte gemäß der Arbeitsanweisung „MoBi 1: Western Blot mit anschließender Immundetektion“ (vgl. 9.3.9). Die dabei verwendeten Antikörper sind mit ihren zugehörigen Verdünnungen in Tabelle 3-13 aufgeführt. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte unter Verwendung des SuperSignal West Dura Extended Duration Substrats (Thermo Scientific) mit der Chemocam HR 16 3200 (INTAS).

Tabelle 3-13: Übersicht über die verwendeten Antikörper

Protein	1. Antikörper	Verdünnung	2. Antikörper	Verdünnung
Influenza HA	Best.-Nr. 03/242, NIBSC	1:2000 in 5 % BSA/TTBS	Esel anti-Schaf IgG ³	1:10000 in 5 % BSA/TTBS
Influenza M1	Best.-Nr. MCA401, AbD Serotec	1:2000 in 5 % BSA/TTBS	Esel anti-Maus IgG ⁴	1:10000 in 5 % BSA/TTBS
Mx1	Klon M143 ¹	1:10000 in 5 % BSA/TTBS	Esel anti-Maus IgG ⁴	1:50000 in 5 % BSA/TTBS
IFN-β	Kaninchen Antiserum ²	1:250 in 5% Milchpulver/TTBS	Ziege anti-Kaninchen IgG ⁵	1:2000 in 5% Milchpulver/TTBS
pSTAT2	Best.-Nr. 4441, Cell Signaling Technology	1:500 in 5 % BSA/TTBS	Ziege anti-Kaninchen IgG ⁵	1:5000 in 5% Milchpulver/TTBS
ERK 1/2	Best.-Nr. sc-153, Santa Cruz	1:10000 in 5% Milchpulver/TTBS	Ziege anti-Kaninchen IgG ⁵	1:20000 in 5% Milchpulver/TTBS

¹Flohr *et al.* (1999), zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. G. Kochs, Abteilung Virologie, Universitätsklinikum Freiburg; ²Nishikawa *et al.* (2000); ³bezogen von Sigma-Aldrich, HRP (horseradish peroxidase) konjugiert, Best.-Nr. A3415; ⁴bezogen von Jackson ImmunoResearch Laboratories, HRP konjugiert, Best.-Nr. 715-035-150; ⁵bezogen von Jackson ImmunoResearch Laboratories, HRP konjugiert, Best.-Nr. 111-035-003

3.5.8.7 SYPRO Ruby Färbung von SDS-PAGE Gelen

Die Durchführung der SDS-PAGE erfolgte gemäß der Arbeitsanweisung „MoBi 1: Western Blot mit anschließender Immundetektion“ (vgl. 9.3.9). Anschließend wurden die Gele mit SYPRO Ruby (molecular probes, Life Technologies) gemäß Herstellerangaben gefärbt. Ausgewertet wurden die Gele mit dem Typhoon Variable Mode Imager 9400 (GE Healthcare).

3.5.9 Durchflusszytometrische Untersuchung des Infektionsgrades und der Apoptose-Induktion

Durchflusszytometrische Messungen zu den Experimenten dieser Arbeit erfolgten im Rahmen einer Kooperation durch Britta Isken (MPI-Magdeburg, Bioprozesstechnik). Der Anteil infizierter Zellen wurde anhand einer Immunfärbung gegen das virale NP bestimmt. Apoptotische Zellen wurden mit dem TUNEL-Assay detektiert. Probenahme, Durchführung beider Färbungen und die anschließende durchflusszytometrische Messung sind bei Schulze-Horsel *et al.* (2009) beschrieben.

3.5.10 Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von Zellen wurden mit einem Axiovert S100 (Zeiss) unter Verwendung einer AVT Horn 3 CCD-Kamera (Sony) gemacht.

3.5.11 Statistik

Alle statistischen Berechnungen erfolgten mit IBM SPSS 19.

3.6 Vektorproduktion in *E. coli*

3.6.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

0,5 mL einer Übernachtskultur wurden in 50 mL Psi Broth Medium (5 g/L Bacto Yeast Extract, 20 g/L Bacto Trypton, 5 g/L MgSO₄, pH7,6) aufgenommen und bei 37 °C, 250 rpm bis zu einer OD₅₅₀ von 0,48 inkubiert. Anschließend wurde die Kultur 15 min auf Eis abgekühlt. Die Zellen wurden bei 5000 g für 5 min bei 4 °C pelletiert und der Überstand verworfen. Dann wurden die Zellen in 20 mL TfbI-Puffer (30 mM Kaliumacetat, 100 mM Rubidiumchlorid, 10 mM Kalziumchlorid, 50 mM Manganchlorid Tetrahydrat, 15 % Glycerin, pH 5,8) resuspendiert und 15 min auf Eis gestellt. Die Kultur wurde für 5 min bei 5000 g, 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 2 mL TfbII-Puffer (10 mM MOPS, 75 mM Kalziumchlorid, 10 mM Rubidiumchlorid, 15 % Glycerin, pH 6,5) aufgenommen und erneut 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Kultur auf 50 µL Aliquots aufgeteilt und bei -80 °C gelagert.

3.6.2 Transformation von *E. coli*

Ein Aliquot kompetente Zellen wurde auf Eis aufgetaut. 1- 10 ng Plasmid-DNA wurde zugegeben und der Ansatz für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 50 s bei 42 °C im Wasserbad. Dann wurden die Zellen erneut für 2 min auf Eis gestellt. 950 µL SOC-Medium (5 g/L Hefeextrakt, 2 g/L Bacto Trypton, 10 mM Natriumchlorid, 2,5 mM Kaliumchlorid, 10 mM Magnesiumchlorid, 10 mM Magnesiumsulfat, 20 mM Glukose) wurden zugefügt und dann für 1,5 h bei 37 °C und 150 rpm geschüttelt. 100 µL der transformierten Zellen wurden auf LB₀-Platten (10 g

Bacto Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g Natriumchlorid und 1,3 % Agar, pH 7) ausgestrichen. Der LB₀-Agar enthielt dabei jeweils das zur Antibiotikaresistenz des transformierten Plasmids passende Antibiotikum. Die Platten wurden anschließend bei 37 °C inkubiert.

3.6.3 Plasmid-Anzucht und -Präparation

Mit dem zu produzierendem Plasmid transformierte *E. coli*-Zellen wurden von einer Agar-Platte in 3 mL LB₀-Medium (10 g Bacto Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, pH 7) mit entsprechendem Antibiotikum überimpft und anschließend über Nacht bei 37 °C, 250 rpm inkubiert. Danach wurde 1 mL aus dieser Kultur in 100 mL LB₀ mit Antibiotikum gegeben und erneut über Nacht bei 37 °C, 250 rpm inkubiert. Diese Kultur wurde anschließend für die Plasmid-Präparation mit dem NucleoBond Xtra Midi Kit (endotoxinfrei, Macherey und Nagel) gemäß Herstellerangaben verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Methodenetablierung und Datenqualität

In diesem Abschnitt sollen einige der im Rahmen dieser Arbeit neu etablierten Methoden kurz vorgestellt und ein Eindruck über die Verlässlichkeit der mit diesen Methoden gemessenen Daten vermittelt werden.

4.1.1 Etablierung einer effizienten Transfektionsmethode für MDCK-Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit war es für mehrere Experimente erforderlich, verschiedene Proteine in MDCK-Zellen transient überzuexprimieren. Dafür musste zunächst eine effiziente Transfektionsmethode für MDCK-Zellen etabliert werden. Drei kommerziell erhältliche Transfektionsreagenzien (Metafectene Pro von Biontex, Lipofectamine 2000 und Lipofectamine LTX von Life Technologies) und zwei Elektroporationsmethoden (Microporator von Life Technologies und Nucleofector von Lonza) wurden dafür in MDCK-Zellen getestet und miteinander verglichen. Für die Transfektionen mit Metafectene Pro, Lipofectamine LTX und Lipofectamine 2000 wurden zunächst gemäß den Protokollen der Hersteller zwei Tage alte, subkonfluente MDCK-Zellen in 6-Well-Platten (1×10^6 Zellen/Well) ausgesät und 24 h später transfiziert. Bei der Transfektion mit dem Microporator und dem Nucleofector wurden 3 Tage alte, subkonfluente MDCK-Zellen verwendet. Mit allen Methoden wurden jeweils $4 \mu\text{g}$ pmax-GFP pro 1×10^6 Zellen transfiziert. Die GFP-Expression wurde 24 h nach der Transfektion mikroskopisch dokumentiert (Abbildung 4-1). Das beste Ergebnis wurde bei Elektroporation mit dem Microporator beobachtet. Der Vergleich der Durchlicht- und der Fluoreszenz-Aufnahme zeigte, dass etwa 80 – 90 % der Zellen GFP exprimierten und somit erfolgreich transfiziert wurden. Mit dem Nucleofector und Metafectene Pro konnten MDCK-Zellen ebenfalls erfolgreich transfiziert werden. Allerdings wurde bei diesen Verfahren maximal eine Transfektionseffizienz von 20 - 30 % erreicht. Bei Verwendung von Lipofectamine 2000 und Lipofectamine LTX lagen bei der Auswertung keine GFP-exprimierenden Zellen vor.

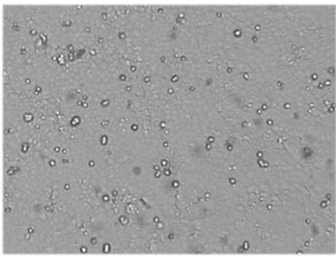
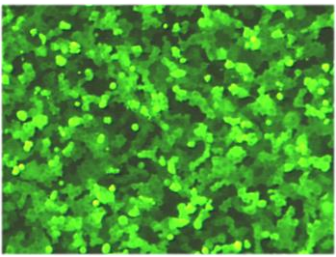
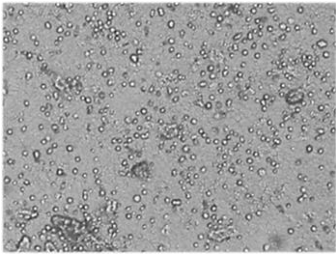
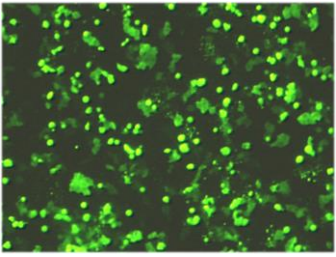
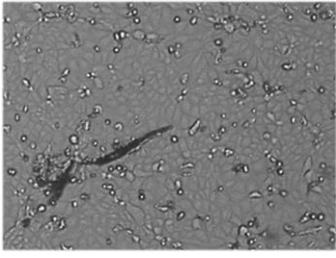
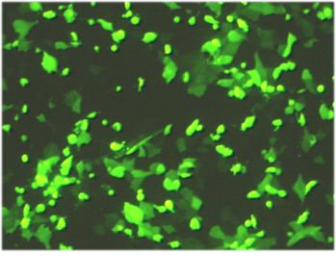
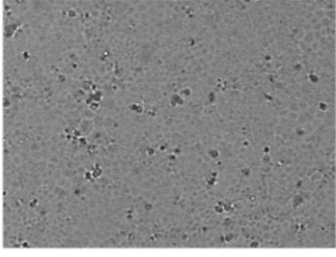
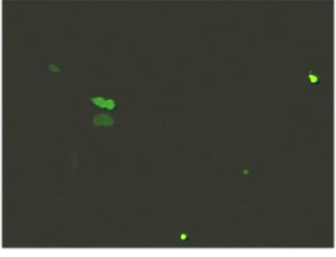
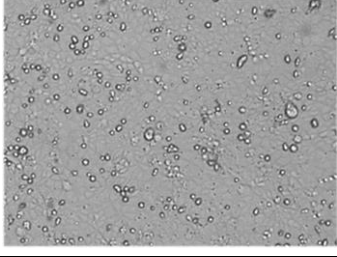
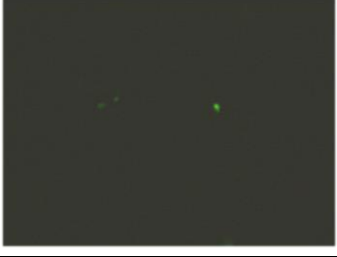
Transfektionsmethode	Durchlicht	Fluoreszenz
Microporator (Digital Bio / Life Technologies)		
Nucleofector (Amaxa / Lonza)		
Metafectene Pro (Biontex)		
Lipofectamine LTX (Life Technologies)		
Lipofectamine 2000 (Life Technologies)		

Abbildung 4-1: Test verschiedener Transfektionsmethoden für MDCK-Zellen. Es wurden jeweils 4 µg pmax-GFP pro 1×10^6 Zellen transfiziert. Für den Microporator und den Nucleofector wurden 3 Tage alte, subkonfluente MDCK-Zellen verwendet. Für die Transfektionen mit Metafectene Pro, Lipofectamine LTX und Lipofectamine 2000 wurden 2 Tage alte, subkonfluente MDCK-Zellen in 6-Well-Platten (1×10^5 Zellen/Well) ausgesät und 24 h später transfiziert. Die mikroskopische Auswertung erfolgte 24 h nach der Transfektion.

Zusammenfassend ließen sich MDCK-Zellen mit dem Microporator sehr effizient transfizieren, wogegen mit den vier anderen Methoden keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden konnten. Die Arbeitsgruppe von Dr. Harder am Friedrich-Loeffler-Institut gab dazu den Hinweis, dass sich MDCK-Zellen mit chemischen Transfektionsmethoden (Metafectene, Lipofectamine usw.) besser transfizieren lassen, wenn sich die Zellen direkt nach der Aussaat gerade abgesetzt hatten. Dementsprechend wurde das Experiment für Metafectene Pro, Lipofectamine LTX und Lipofectamine

2000 unter entsprechend modifizierten Bedingungen wiederholt. Diesmal erfolgte die Transfektion nur drei Stunden nach der Aussaat der Zellen. Vergleichbar zum Vorexperiment wurden jeweils 4 µg pmax-GFP pro 1×10^6 Zellen transfiziert. Tatsächlich verbesserte sich die Transfektionseffizienz durch die frühere Transfektion für alle drei Methoden wesentlich (Abbildung 4-2). Die zuvor mit dem Microporator beobachtete Transfektionseffizienz von 80 – 90 % wurde jedoch nicht erreicht. Für die transiente Überexpression von Proteinen in MDCK-Zellen wurde daher in dieser Arbeit ausschließlich der Microporator verwendet.

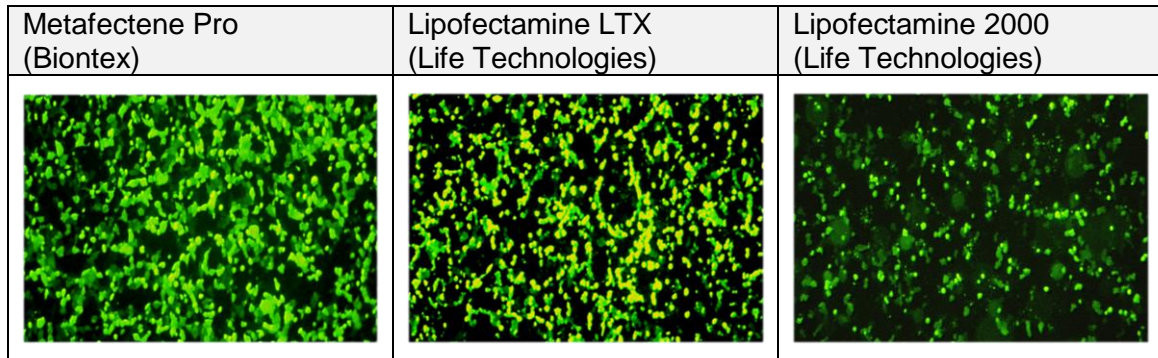


Abbildung 4-2: Effizienz verschiedener chemischer Transfektionsmethoden für frisch ausgesäte MDCK-Zellen. $0,2 \times 10^6$ Zellen/Well wurden in 24-Well-Platten ausgesät und 3 h später transfiziert. Pro Well wurden 0,8 µg pmax-GFP verwendet. Die mikroskopische Auswertung erfolgte 24 h nach der Transfektion.

4.1.2 Reporter-Gen-Assays in MDCK-Zellen

Eine weitere Methode, die im Rahmen dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe neu etabliert wurde, waren luciferasebasierte Reporter-Gen-Assays. Dafür gab es zwei Motivationen. (1) Das IFN-β-Gen enthält je eine AP1- und eine NFκB-Bindestelle, sowie zwei ISRE-Motive, an die IRF3-Homodimere oder IRF3/IRF7-Heterodimere binden können (Honda & Taniguchi, 2006). Sind alle vier Bindestellen belegt, kommt es zu einer robusten Transkription des IFN-β-Gens. Die Aktivierung der einzelnen Transkriptionsfaktoren erfolgt über unterschiedliche Signalwege (vgl. 2.3.2). Deren individuelle Bedeutung für die Aktivierung IFN-β könnte durch Einsatz von Reporter-Vektoren für die einzelnen Transkriptionsfaktoren (ISRE, AP1 und NFκB) bestimmt werden. Damit ließe sich abschätzen, welche Signalwege blockiert werden müssten, um die IFN-Expression bei der Virusinfektion zu verhindern. (2) Mit Reporter-Gen-Assays für die Aktivierung von IFN-β und Mx1 könnten die qPCR-Ergebnisse für die Expression beider Gene mit einer alternativen Methode überprüft werden.

Dazu wurden einerseits die Vektoren pISRE-Luc, pAP1-Luc und pNFκB-Luc aus dem Pathway Profiling System von Clontec und andererseits zwei Konstrukte mit den murinen Promotern für IFN-β- und Mx1 getestet. MDCK-Zellen wurden zunächst mit den angegebenen Konstrukten transfiziert (vgl. 3.5.7) und 24 h später mit PR8-delINS1 bei MOI 1 infiziert. 16 h p.i. wurden die Luciferaseaktivitäten ermittelt. Die Reporter für IFN-β- und Mx1 wurden durch die Virusinfektion eindeutig aktiviert (Abbildung 4-2a). Dies wurde durch parallele qRT-PCR-Messung der Induktion von IFN-β und Mx1 bestätigt. Beide Gene waren auch hier klar aktiviert (Abbildung 4-2b). Die Vektoren mit den murinen

Promotern für IFN- β - und Mx1 schienen also in MDCK-Zellen zu funktionieren. Damit konnten sie in dieser Arbeit als Alternative zur qRT-PCR für die quantitative Messung der IFN-Antwort in Influenza-virusinfizierten MDCK-Zellen eingesetzt werden.

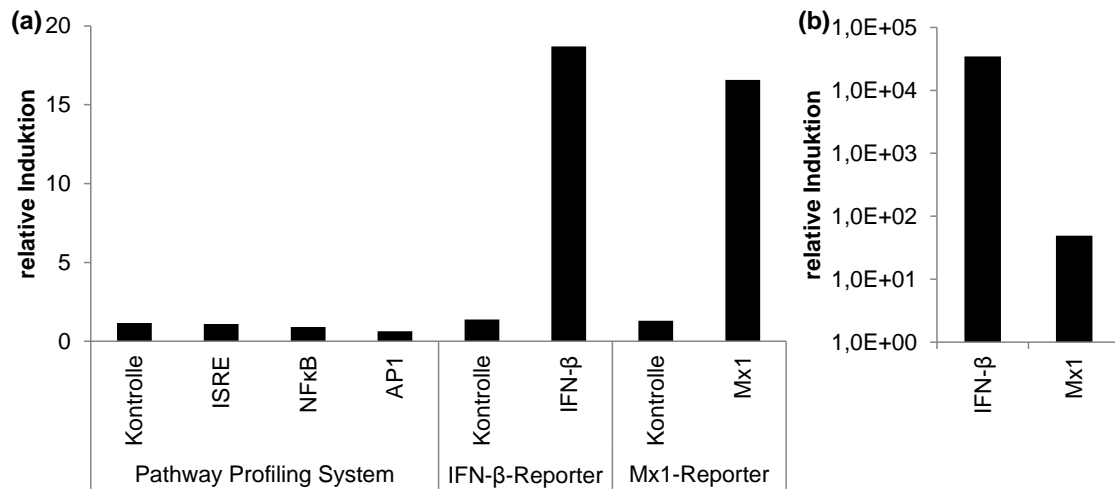


Abbildung 4-3: Bestimmung der IFN-Aktivierung mit luciferasebasierten Reporter-Gen-Assays. MDCK-Zellen wurden 24 h vor der Infektion mit den angegebenen Vektoren transfiziert. Die Infektion erfolgte mit delNS1, MOI 1. (a) 16 h p.i. wurden die Luciferaseaktivitäten bestimmt. Dargestellt ist das Verhältnis der Luciferaseaktivitäten von infizierten zu nicht-infizierten Zellen. Bei den Kontrollen handelt es sich um dieselben Vektoren wie bei den zugehörigen Reporterkonstrukten, jedoch ohne den entsprechenden Promoter. (b) Als Vergleich wurde die Expression von IFN- β und Mx1 mittels qRT-PCR bestimmt. Dargestellt ist die relative Induktion beider Gene bezogen auf eine nicht-infizierte Probe.

Im Gegensatz dazu konnte für die Reportervektoren mit den ISRE-, AP1- und NFkB-Enhancer-Elementen in keinem Fall eine Aktivierung durch die Virusinfektion nachgewiesen werden. Da aber gleichzeitig eine klare Induktion des IFN- β -Promoters vorlag, wäre eine Aktivierung der ISRE, AP1 und NFkB-Enhancer-Elemente zumindest in Teilen zu erwarten gewesen. Die Ursache für dieses widersprüchliche Ergebnis war zunächst unklar, so dass eine Reihe unterschiedlicher Optimierungsexperimente für pISRE-Luc, pAP1-Luc und pNFkB-Luc durchgeführt wurde. Um den Rahmen dieser Arbeit nicht zu sprengen, wurden die Ergebnisse dieser Experimente in Tabelle 4-1 qualitativ zusammengefasst. Das auffälligste Ergebnis war, dass sich pISRE-Luc und pNFkB-Luc zwar durch bekannte, starke Aktivatoren wie Poly(I:C) (beide) oder TNF- α (nur pNFkB-Luc) schwach aktivieren ließen, jedoch in Infektionsexperimenten unter allen getesteten Bedingungen nicht induziert wurden. Grundsätzlich konnten diese Reporter demnach in MDCK-Zellen aktiviert werden. Die Sensitivität war aber offensichtlich schlecht, da selbst sehr starke Stimuli nur zu einer schwachen Aktivierung führten. Bei dem in Abbildung 4-3 dargestellten Experiment wurde bereits PR8-delNS1 verwendet. PR8-delNS1 induzierte IFN- β von allen in dieser Arbeit verwendeten Virusstämmen am stärksten. Trotzdem wurden pISRE-Luc, pAP1-Luc und pNFkB-Luc nicht aktiviert. Damit war eine Bestimmung der individuellen Bedeutung der drei an der Aktivierung des IFN- β -Promoters beteiligten Signalwege mit diesen Reporter-Vektoren in MDCK-Zellen ausgeschlossen.

4.1 Ergebnisse - Methodenetablierung und Datenqualität

Tabelle 4-1: Zusammenfassung der Optimierungsversuche für luciferasebasierte Reporteragen-Assays mit pISRE-Luc, pAP1-Luc und pNFkB-Luc

Maßnahme	Ergebnis
Unterschiedliche Probenahmezeiten bei der Infektion	<ul style="list-style-type: none">• Weder zu frühen noch zu späten Zeitpunkten konnte während der Virusinfektion (PR8-delNS1) eine Aktivierung der ISRE-, NFkB- und AP1-Reporter beobachtet werden.
Test der Vektor-funktionalität durch Positivkontrollen	<ul style="list-style-type: none">• Der NFkB-Reporter, nicht jedoch der AP1-Reporter, konnte mit TNF-α schwach aktiviert werden.• Der NFkB- und der ISRE-Reporter konnten durch Poly(I:C)-Transfektion schwach aktiviert werden.
Elektroporation statt chemischer Transfektion	<ul style="list-style-type: none">• Bei Elektroporation trat stärkere Hintergrund-Luciferaseaktivität als bei chemischer Transfektion auf.• Dementsprechend trat bei den ISRE-, NFkB- und AP1-Reportern keine Verbesserung auf. Bei den IFN-β- und Mx1-Reportern verschlechterte sich die Sensitivität.
Einfluss von FCS	<ul style="list-style-type: none">• Serum-Entzug 24 h vor der Infektion verbesserte das Ergebnis nicht.
Optimierung des DNA-Verhältnisses Firefly-Reporter zu Renilla-Kontrollvektor	<ul style="list-style-type: none">• Für die IFN-β- und Mx1-Reporter wurden in Infektionsexperimenten die besten Ergebnisse bei einem Verhältnis von 10:1 Firefly zu Renilla erzielt.• Höhere Anteile des Renilla-Vektors steigerten geringfügig das Hintergrundrauschen.• Mit den ISRE-, NFkB- und AP1-Reportern konnte auch bei dem optimalen Verhältnis keine Aktivierung durch Virusinfektion beobachtet werden.
Verwendung einer anderen Zelllinie	<ul style="list-style-type: none">• In A549-Zellen konnten analog zu MDCK-Zellen keine Aktivierung der ISRE-, NFkB- und AP1-Reporter durch Virusinfektion beobachtet werden.

4.1.3 Datenqualität

4.1.3.1 Lineare Messbereiche und PCR-Effizienzen der qRT-PCR-Assays

In dieser Arbeit wurde die Expression verschiedener zellulärer und viraler Gene in virusinfizierten MDCK-Zellen mittels qRT-PCR bestimmt. Die Berechnung der relativen Genexpression aus den PCR-Daten erfolgte dabei nach der $2^{-\Delta\Delta Cq}$ -Methode (vgl. 3.5.5.5). Wesentliche Voraussetzung für die korrekte Anwendung dieser Methode ist, dass das Zielgen und das zur Normalisierung verwendete Referenzgen (hier 18s rRNA) mit vergleichbarer PCR-Effizienz amplifiziert werden (Livak & Schmittgen, 2001). Zudem ist sicherzustellen, dass die Cq -Werte beider Gene im linearen Messbereich der zugehörigen Assays liegen.

Eine Möglichkeit, sowohl die PCR-Effizienz als auch den linearen Bereich eines qPCR-Assays zu überprüfen, liegt in der Messung der Cq -Werte von Verdünnungsreihen und anschließender Durchführung einer linearen Regressionsanalyse. Dies wurde für Assays für 18s-rRNA, IFN- β , Mx1 und virales M1 durchgeführt und ist in Tabelle 4-2 dargestellt. Als Ausgangsmaterial für die Verdünnungsreihen wurden Plasmide verwendet, die die Zielsequenzen der jeweiligen Primerpaare enthielten. Diese Plasmide wurden mit nukleasefreiem Wasser seriell 1:10 verdünnt. Die

Verdünnungsreihen wurden dabei für jedes untersuchte Gen empirisch so ausgelegt, dass der abgedeckte cq-Bereich auch den Bereich umfasste, in dem die cq-Werte für 18s-rRNA, IFN-β, Mx1 und virales M1 in Infektionsexperimenten typischerweise lagen. Die cq-Werte der Verdünnungen wurden bestimmt und anschließend eine lineare Regression der cq-Werte gegen den dekadischen Logarithmus der zugehörigen Verdünnungsfaktoren durchgeführt. Die Wahl der Konzentrationseinheit der Verdünnungsreihe war hier nebensächlich. Bei der $2^{-\Delta\Delta cq}$ -Methode wird die Genexpression als relativer Unterschied zwischen einer Probe und einer Kontrolle direkt aus den cq-Werten ermittelt und ist folglich dimensionslos.

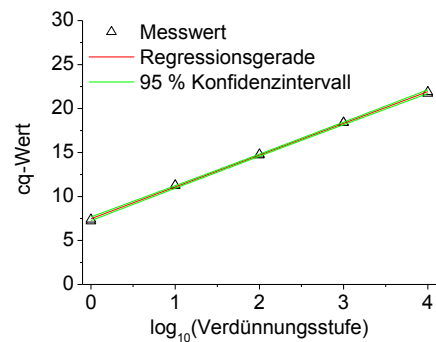
Tabelle 4-2: Linearer Messbereich und PCR-Effizienzen der qPCR-Assays für 18s rRNA, IFN-β, Mx1 und virales M1

18s rRNA (typische cq-Werte in infizierten Zellen: 10 – 14⁴)

$\log_{10}(\text{Verdünnungsfaktor}^1)$	0	1	2	3	4
Messwert 1 (cq)	7,2	11,2	14,7	18,4	21,7
Messwert 2 (cq)	7,4	11,3	14,8	18,4	21,9
Mittelwert (cq)	7,3	11,25	14,75	18,4	21,8
Standardabw.	0,14	0,07	0,07	0,00	0,14

Lineare Regression

Steigung	3,615
Reststandardabw. ²	0,166
Verfahrens-std.-abw. ³	0,046
Bestimmtheitsmaß R ²	0,999
PCR-Effizienz	89,07 %

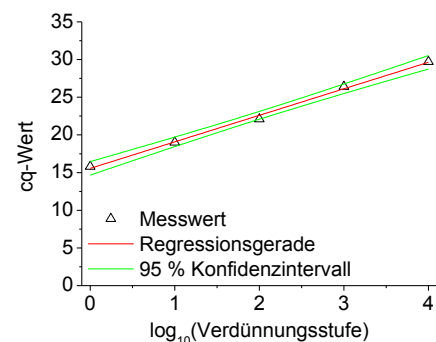


IFN-β (typische cq-Werte in infizierten Zellen: 18 – 30⁴)

$\log_{10}(\text{Verdünnungsfaktor}^1)$	0	1	2	3	4
Messwert 1 (cq)	15,8	19	22,1	26,4	29,7
Messwert 2 (cq)	15,7	19,2	22,1	26,4	29,6
Mittelwert (cq)	15,8	19,1	22,1	26,4	29,65
Standardabw.	0,1	0,14	0,00	0,00	0,07

Lineare Regression

Steigung	3,510
Reststandardabw. ²	0,348
Verfahrens-std.-abw. ³	0,099
Bestimmtheitsmaß R ²	0,997
PCR-Effizienz	92,7 %



Fortsetzung von Tabelle 4-2 auf der Folgeseite.

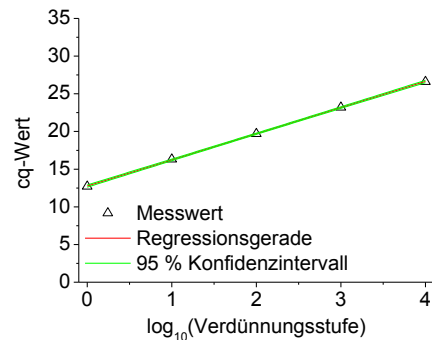
Fortsetzung Tabelle 4-2:

Mx1 (typische cq-Werte in infizierten Zellen: 13 – 25⁴)

$\log_{10}(\text{Verdünnungsfaktor}^1)$	0	1	2	3	4
Messwert 1 (cq)	12,7	16,3	19,7	23,2	26,6
Messwert 2 (cq)	12,7	16,6	19,8	23,6	26,6
Mittelwert (cq)	12,7	16,45	19,75	23,4	26,6
Standardabw.	0,0	0,21	0,07	0,28	0,00

Lineare Regression

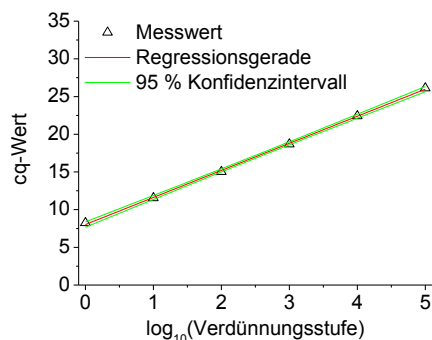
Steigung	3,475
Reststandardabw. ²	0,160
Verfahrens-std.-abw. ³	0,046
Bestimmtheitsmaß R^2	0,999
PCR-Effizienz	93,98 %

**virales M1** (Typische cq-Werte in infizierten Zellen / Überstandsproben: 8 – 25⁴)

$\log_{10}(\text{Verdünnungsfaktor}^1)$	0	1	2	3	4	5
Messwert 1 (cq)	8,2	11,5	15,0	18,7	22,4	26,1
Messwert 2 (cq)	8,2	11,7	15,0	18,8	22,6	26,3
Mittelwert (cq)	8,2	11,6	15	18,75	22,5	26,2
Standardabw.	0,00	0,14	0,00	0,07	0,14	0,14

Lineare Regression

Steigung	3,610
Reststandardabw. ²	0,181
Verfahrens-std.-abw. ³	0,050
Bestimmtheitsmaß R^2	0,999
PCR-Effizienz	89,23 %



¹Für die Bestimmung der PCR-Effizienz und des linearen Messbereichs wurden serielle Verdünnungsreihen von Plasmiden, die die Zielsequenzen für die jeweiligen Primerpaare enthielten, verwendet. ²Reststandardabw.: Reststandardabweichung; ³Verfahrens-std.-abw.: Verfahrensstandardabweichung; ⁴gibt den Wertebereich an, in dem die cq-Werte für das jeweilige Gen in den Experimenten dieser Arbeit lagen

Für alle vier Gene konnte über den gesamten Bereich der Verdünnungsreihen ein linearer Zusammenhang zwischen dem dekadischen Logarithmus des Verdünnungsfaktors und dem cq-Wert bestimmt werden (Tabelle 4-2). Damit umfasste der lineare Messbereich für virales M1 einen Konzentrationsbereich von mindestens 6 Zehnerpotenzen und für 18s-rRNA, IFN- β und Mx1 von mindestens 5 Zehnerpotenzen. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) war in allen Fällen größer als 0,997 und die Verfahrensstandardabweichung betrug maximal 0,1. Die von den Regressionsgeraden erfassten cq-Bereiche schlossen auch die Wertebereiche ein, in denen die cq-Werte für 18s-rRNA, IFN- β , Mx1 und virales M1 in Infektionsexperimenten typischerweise lagen. Die vier Assays messen also in dem für diese Arbeit relevanten cq-Bereich linear. Zudem wurden die PCR-Effizienzen aus den Steigungen

der Regressionsgeraden bestimmt (Rutledge & Côté, 2003). Die Werte lagen für alle vier Primerpaare zwischen 89 % und 94 %. Damit konnten vergleichbare PCR-Effizienzen als Voraussetzung für die Anwendung der $2^{-\Delta\Delta c_q}$ -Methode angenommen werden.

4.1.3.2 Reproduzierbarkeit von Versuchsergebnissen

Es ist allgemein bekannt, dass sich bei biologischen Versuchsreihen Einzelexperimente deutlich voneinander unterscheiden können. Die Ursache für diese Unterschiede ist meist nicht klar. Übliche Erklärungen sind jedoch die Eigenvarianz des verwendeten biologischen Systems oder unvermeidbare Änderungen in den experimentellen Rahmenbedingungen (z.B. Reagenzienwechsel, weil bislang verwendete aufgebraucht, oder Wechsel der Zellkultur, weil maximale Passagenzahl der vorherigen überschritten). Auch in dieser Arbeit traten in einigen Versuchsreihen Schwankungen in den Verläufen der Einzelexperimente auf. Dadurch wurde die Auswertung dieser Versuchsreihen teilweise erschwert. Der Umgang damit soll hier an einem einfachen Beispiel belegt und erläutert werden.

In Abbildung 4-4a sind dazu die Mx1-Expression und der HA-Verlauf von fünf unabhängigen Infektionsexperimenten mit PR8-NIBSC (MOI 0,025) in Gegenwart und Abwesenheit von Trypsin dargestellt. Ziel dieser Versuchsreihe war zu überprüfen, ob die IFN-Antwort bei Virusinfektionen in Abwesenheit von Trypsin reproduzierbar stärker aktiviert wird.

Tatsächlich wurde ohne Trypsin in allen Experimenten zu allen untersuchten Zeitpunkten eine höhere Expression von Mx1 als mit Trypsin beobachtet. Das wesentliche Ziel dieser Versuchsreihe wurde also eindeutig erreicht. Unabhängig davon ergaben sich zwischen den fünf Einzelexperimenten aber Unterschiede. So fiel zunächst für Infektionen ohne Trypsinzugabe auf, dass die Dynamiken sowohl der Mx1-Expression als auch der HA-Freisetzung von Experiment zu Experiment variierten. Das Maximum der Mx1-Expression wurde unter diesen Bedingungen zweimal schon bei 16 h p.i., zweimal bei 24 h p.i. und einmal erst bei 40 h p.i. erreicht. In Infektionen, in denen das Maximum der Mx1-Expression früh erreicht wurde, trat gleichzeitig auch ein früher Anstieg des HA-Titers auf. Eine spätere Aktivierung von Mx1 ging dagegen mit einem verzögerten Anstieg des HA-Titers einher. Die verschiedenen Verläufe der Mx1-Expression sind damit sicherlich auf unterschiedliche Infektionsdynamiken in den Einzelexperimenten zurückzuführen. Außerdem unterschied sich das absolute Level der Mx1-Aktivierung zwischen den fünf Experimenten. So schwankte die maximal gemessene Mx1-Expression in Abwesenheit von Trypsin zwischen einer 10- und einer 70-fachen Aktivierung. Messfehler allein konnten diese Abweichungen nicht erklären. Die durch die qPCR-Messung bedingten, relativen Fehler der Genexpressionswerte in Abbildung 4-4 betragen nur zwischen 10 % und 30 % der absolut gemessenen Werte. In geringerem Ausmaß traten derartige

Unterschiede in den Verläufen und den absolut ermittelten Werten bei den fünf Experimenten auch bei Infektionen mit Trypsin auf.

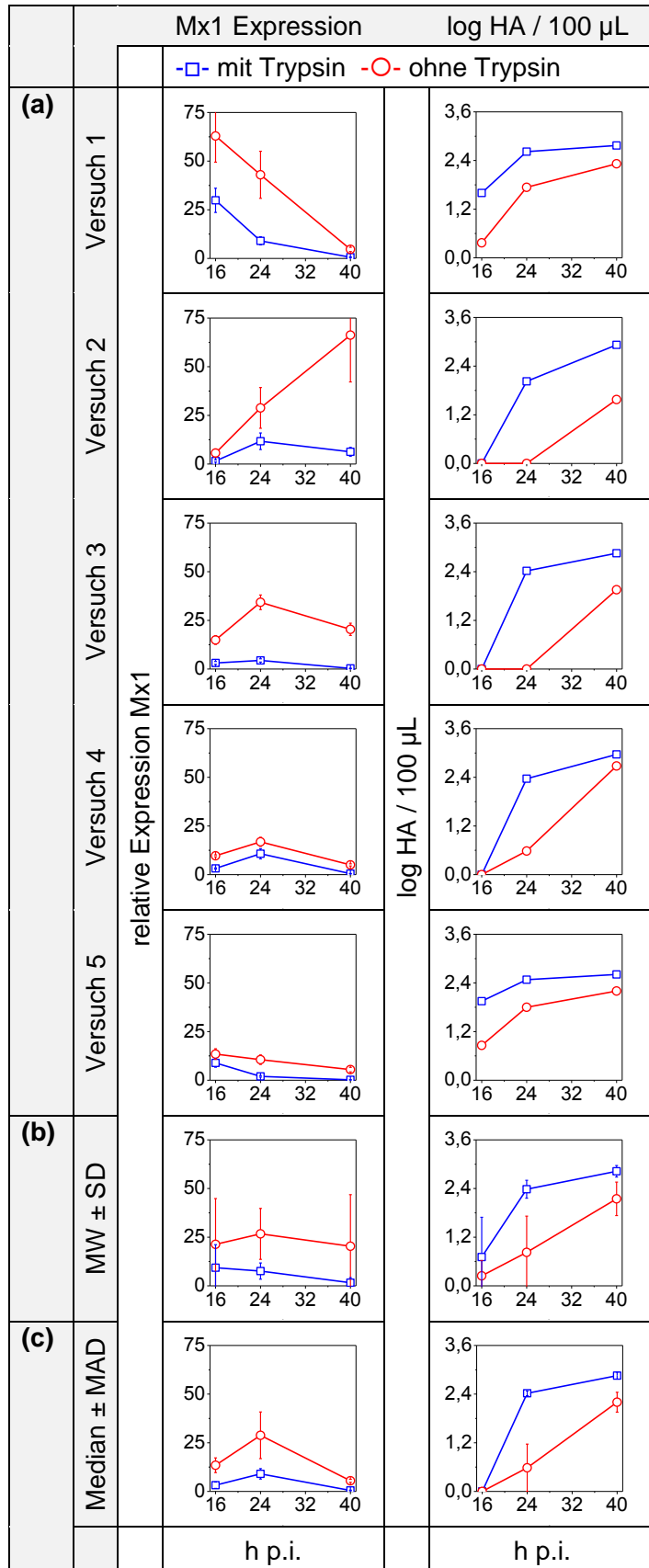


Abbildung 4-4: Reproduzierbarkeit der höheren Mx1-Expression in Abwesenheit von Trypsin in fünf unabhängigen Experimenten. MDCK-Zellen wurden mit PR8-NIBSC (MOI 0,025) mit oder ohne Trypsinzugabe infiziert. Die Expression von Mx1 wurde durch qRT-PCR relativ zu einer nicht-infizierten Probe bestimmt. Zudem wurden die HA-Verläufe aufgenommen. (a) Einzelergebnisse der Versuchsreihe. Die Fehlerbalken bei der Mx1-Expression wurden über lineare Fehlerfortpflanzung aus den Einzelfehlern der vier bei der $2^{\Delta\Delta_{cp}}$ -Methode miteinander verrechneten Messwerte bestimmt (vgl. 3.5.5.5). Der Fehler einer Einzelmessung im HA-Assay betrug $\pm 0,149$ log HA / 100 μ L (95 % Konfidenzintervall, Fehlerbalken nicht angegeben, vgl. 3.5.2). (b) Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) der fünf unabhängigen Experimente. (c) Median \pm Median der absoluten Abweichungen (MAD) der fünf unabhängigen Experimente.

Im Allgemeinen waren die Schwankungen in den Versuchsreihen dieser Arbeit weniger extrem als in dem hier gewählten Beispiel. Es verdeutlicht aber anschaulich eine Schwierigkeit, die bei mehreren Experimenten dieser Arbeit auftrat. Relative Unterschiede zwischen zwei experimentellen Zuständen (z.B. „ohne Trypsin wird die IFN-Antwort bei Virusinfektionen stärker als mit Trypsin aktiviert“ oder „Virusstamm A induziert die IFN-Antwort stärker als Virusstamm B“) waren ohne Ausnahme stets über mehrere unabhängige Experimente reproduzierbar. Die dynamischen Verläufe oder die absoluten Werte der gemessenen Größen unterschieden sich jedoch zum Teil. Dies erschwerte es, die Ergebnisse von Versuchsreihen in komprimierter Form zusammenzufassen und darzustellen. Abbildung 4-4b zeigt die Mittelwerte aus den fünf unabhängigen Experimenten zusammen mit der zugehörigen Standardabweichung. Das Mitteln der unterschiedlichen absoluten Werte und zeitlichen Verläufe führte insbesondere bei der Mx1-Expression in Abwesenheit von Trypsin zu einem artifiziellen Kurvenverlauf, der keinem der Einzelerperimente mehr entsprach. Gleichzeitig überschritten sich die Fehlerbalken für die Mx1-Expression in An- und Abwesenheit von Trypsin bei zwei von drei Zeitpunkten. Der in den Einzelerperimenten klare Trend einer in Abwesenheit von Trypsin zu allen Zeitpunkten höheren Mx1-Expression ging damit in dieser Darstellung verloren. Typischerweise wird in solchen Fällen die statistische Signifikanz in Form des p-Wertes eines gepaarten t-Tests angegeben, um Trends trotz sich überschneidender Fehlerbalken eindeutig zu belegen. Der t-Test setzt jedoch normalverteilte Daten und Varianzhomogenität voraus. In Tabelle 4-3 sind die p-Werte des Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung und des Leven's-Test auf Varianzhomogenität für die hier diskutierten Daten angegeben. Unter Annahme einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 5 % wurden die Kriterien der Normalverteilung und der Varianzhomogenität von einem Großteil der Daten nicht erfüllt. Die Ergebnisse eines gepaarten t-Tests für diese Daten (Tabelle 4-4) sind folglich fragwürdig.

Tabelle 4-3: p-Werte des Shapiro-Wilk-Tests und des Leven's Tests für die in Abbildung 4-4 dargestellten Daten

	Trypsin	Shapiro-Wilk-Test (Prüfung auf Normalverteilung)			Leven's-Test ¹ (Prüfung auf Varianzhomogenität)		
		16 h p.i	24 h p.i	40 h p.i	16 h p.i	24 h p.i	40 h p.i
Expression Mx1	+	0,009	0,868	0,012	0,279	0,037	0,060
	-	0,019	0,447	0,001			
log HA / 100 µL	+	0,038	0,106	0,991	0,003	0,003	0,109
	-	0,022	0,496	0,650			

¹ Vergleich in Gegenwart und Abwesenheit von Trypsin

Daher wurden nicht-parametrische Verfahren verwendet. Um die Signifikanz eines Unterschiedes für zwei oder mehrerer verbundener Stichproben zu testen, können der Friedman- oder der Wilcoxon-Test eingesetzt werden (Brosius, 2006). Diese Verfahren basieren auf dem Vergleich von Rangreihen und stellen somit keine Anforderungen an die Verteilung der Daten. Daher reagieren sie robuster als der t-Test auf größere Unterschiede in den absoluten Werten der zu vergleichenden Daten. Tabelle

4-4 gibt die p-Werte des Wilcoxon- und des Friedman-Tests für den Unterschied der Mx1-Expression und des HA-Verlaufs in An- und Abwesenheit von Trypsin an. Beide verteilungsfreien Verfahren bewerten unter Annahme einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 5 % den Unterschied in der Mx1-Expression in An- und Abwesenheit von Trypsin im Gegensatz zum t-Test zu allen untersuchten Zeitpunkten als signifikant.

Tabelle 4-4: p-Werte des t-Tests, des Wilcoxon-Tests und des Friedman-Tests für den paarweisen Vergleich der Expressionswerte von Mx1 und der HA-Titer in Gegenwart und Abwesenheit von Trypsin (Abbildung 4-4)

		t-Test	Wilcoxon-Test	Friedman-Test
16 h p.i.	Expression Mx1	0,092	0,043	0,025
	log HA / 100 µL	0,180	0,180	0,157
24 h p.i.	Expression Mx1	0,026	0,043	0,025
	log HA / 100 µL	0,011	0,043	0,025
40 h p.i.	Expression Mx1	0,155	0,043	0,025
	log HA / 100 µL	0,035	0,043	0,025

Bei Verletzung von Verteilungsvoraussetzungen charakterisiert der Median die zentrale Tendenz einer Verteilung besser als der Mittelwert (Iglewicz, 2000). Der Median sowie der MAD (Median der absoluten Abweichungen) als Streuungsmaß entsprechen zudem dem rangbasierten Charakter nichtparametrischer statistischer Tests. Weiterhin werden Median und MAD weniger stark von Extremwerten in den ihnen zugrunde liegenden Daten beeinträchtigt. In Abbildung 4-4c sind Median und MAD der hier verwendeten Daten dargestellt. Hier war der in den Einzelexperimenten klare Trend einer zu allen Zeitpunkten in Abwesenheit von Trypsin höheren Mx1-Expression auch in der zusammengefassten Darstellung der Daten eindeutig erkennbar. Weiterhin entsprachen die Verläufe der Medianwerte in Abbildung 4-4c besser den Verläufen der Messwerte in den Einzelexperimenten als die Verläufe der Mittelwerte (Abbildung 4-4b). Die Verwendung von Median und MAD statt Mittelwert und Standardabweichung erlaubte es hier also, die fünf Einzelexperimente in einer Form zusammenzufassen, in der der hier interessierende Trend einer höheren Mx1 Expression in Abwesenheit von Trypsin eindeutig ablesbar war. Mithilfe verteilungsfreier Verfahren konnte dieser Trend trotz variierender Infektionsdynamik und absolut gemessener Werte in den fünf Einzelexperimenten objektiv verifiziert werden. Ausgehend von der Verletzung der Normalverteilungsannahme wurden Versuchsreihen, in denen ein Trend zwar klar reproduzierbar war, die Einzelexperimente sich aber in der Infektionsdynamik und in den absolut gemessenen Werten stark unterschieden, grundsätzlich in dieser Form ausgewertet und dargestellt.

4.2 Aktivierung der IFN-Antwort in Influenza-virusinfizierten MDCK-Zellen

In einem ersten Schritt sollte die Induktion von IFN und die nachfolgende Expression IFN-stimulierter Gene in MDCK-Zellen für verschiedene, in der Arbeitsgruppe verwendete Influenza-Stämme charakterisiert werden. Von Interesse waren zunächst die zwei A/PR/8/34 (PR8) Varianten PR8-NIBSC und PR8-RKI, da PR8 häufig für die Herstellung von Reassortanten für die Impfstoffproduktion verwendet wird (Wood & Robertson, 2007). Außerdem hatten diese zwei Varianten in anderen Versuchen der Arbeitsgruppe bereits unterschiedliches Verhalten in Bezug auf die finale Virusausbeute, Apoptose-Induktion (Schulze-Horsel *et al.*, 2009) und ihrem Einfluss auf das Wirtszellproteom (Vester *et al.*, 2009) gezeigt. Eine Hypothese war, dass Unterschiede in der Induktion der IFN-Antwort für diese Ergebnisse verantwortlich sind. Zusätzlich sollte hier mit WSN33 auch ein von A/PR8 abweichender Stamm berücksichtigt werden. Um eine relative Beurteilung der Stärke der IFN-Induktion zu ermöglichen, wurde PR8-delNS1 mitgeführt. Dieser Stamm sollte aufgrund des fehlenden IFN-Antagonisten die maximal durch Influenza-Virusinfektion mögliche Aktivierung des IFN-Systems auslösen.

Für dieses Experiment wurden MDCK-Zellen bei MOI 5 mit den genannten Viren infiziert und zunächst als Kontrolle für die Infektion die HA-Verläufe aufgenommen (Abbildung 4-5a). Für alle vier Stämme war bereits zum Zeitpunkt der Infektion HA-Aktivität nachweisbar. Diese war auf die große Menge Saatvirus bei hoher MOI zurückzuführen. Die trotz gleicher MOI verschiedenen HA-Werte der vier Stämme kamen durch unterschiedliche Verhältnisse von infektiösen Viren ($TCID_{50}$) zur Gesamtheit der Viruspartikel (Partikel mit HA-Aktivität) in den vier Saatviren zustande. Für alle verwendeten Stämme kam es etwa 8-10 h nach der Infektion (h post infection, h p.i.) zu einem Anstieg der HA-Aktivität, so dass von einer erfolgreichen Infektion der Zellen ausgegangen werden konnte. Im Folgenden wurden die primäre IFN- β -Induktion, sowie die anschließende Mx1-Expression mittels qRT-PCR gemessen. Dabei diente Mx1 als Marker für die Induktion der IFN-stimulierten Gene. Um Wechselwirkungen zwischen Virusreplikation, IFN-Induktion und IFN-Unterdrückung beurteilen zu können, wurde für die WT-Stämme zudem die Expression des viralen IFN-Antagonisten NS1 bestimmt. Bei PR8-delNS1 wurde stattdessen die M1-Expression gemessen. Für alle vier Stämme stiegen die vmRNAs unmittelbar nach der Infektion schnell an (Abbildung 4-5b) und erreichten für delNS1, PR8-NIBSC und WSN33 nach 6 h bzw. für PR8-RKI nach 7 h ein stationäres Niveau. Dieses war für delNS1 und PR8-NIBSC vergleichbar hoch, etwas höher für PR8-RKI und am höchsten für WSN33. Zusammen mit dem Anstieg viraler Transkripte erfolgte ein Anstieg der IFN- β -Expression (Abbildung 4-5c). Für den delNS1-Stamm konnte bereits 2 h p.i. eine deutliche Steigerung der IFN- β -Expression auf etwa das 100-fache des Niveaus von MOCK-infizierten Zellen beobachtet werden. Dieses Level blieb bis etwa 4 h p.i. zunächst relativ konstant, stieg dann jedoch bis 10 h p.i. auf eine 10^5 -fach

höhere Expression als in unifizierten Zellen an. Danach erfolgte eine langsame Abnahme. Als Konsequenz dieser starken IFN-Induktion konnte bereits 5 h p.i. eine deutliche Hochregulation der Mx1-Expression beobachtet werden (Abbildung 4-5d), die im weiteren Verlauf bis auf das 80-fache des Niveaus nicht-infizierter Zellen zunahm. Im Vergleich dazu zeigten die zwei WT PR8-Stämme eine sehr viel geringere Aktivierung der IFN-Expression. Für PR8-NIBSC wurde bis 4 h p.i. noch eine zu delNS1 vergleichbare IFN- β -Induktion beobachtet, jedoch blieb das Expressionslevel anschließend etwa 100-fach geringer. Dies bewirkte eine deutliche Verzögerung des Anstiegs und ein geringeres maximales Level der Mx1-Expression. Bei PR8-RKI stieg die IFN- β -Expression deutlich langsamer an als bei PR8-NIBSC und das maximale Expressionsniveau fiel etwa 10-fach niedriger aus. Ein Anstieg der Mx1-Expression konnte erst nach 11 h beobachtet werden. Die maximale Mx1-Expression erreichte bei PR8-RKI aber nur etwa das Vierfache von MOCK-infizierten Zellen. WSN33 zeigte in Bezug auf IFN- β -Induktion in den ersten 4 h p.i. ein zu delNS1 und PR8-NIBSC vergleichbares Verhalten. Im Gegensatz zu den anderen Stämmen blieb die IFN- β -Induktion dann aber bis 6 h p.i. relativ konstant und fiel im Folgenden sogar ab. Dementsprechend fand für diesen Stamm über den beobachteten Zeitraum keine nennenswerte Aktivierung der Mx1-Expression statt.

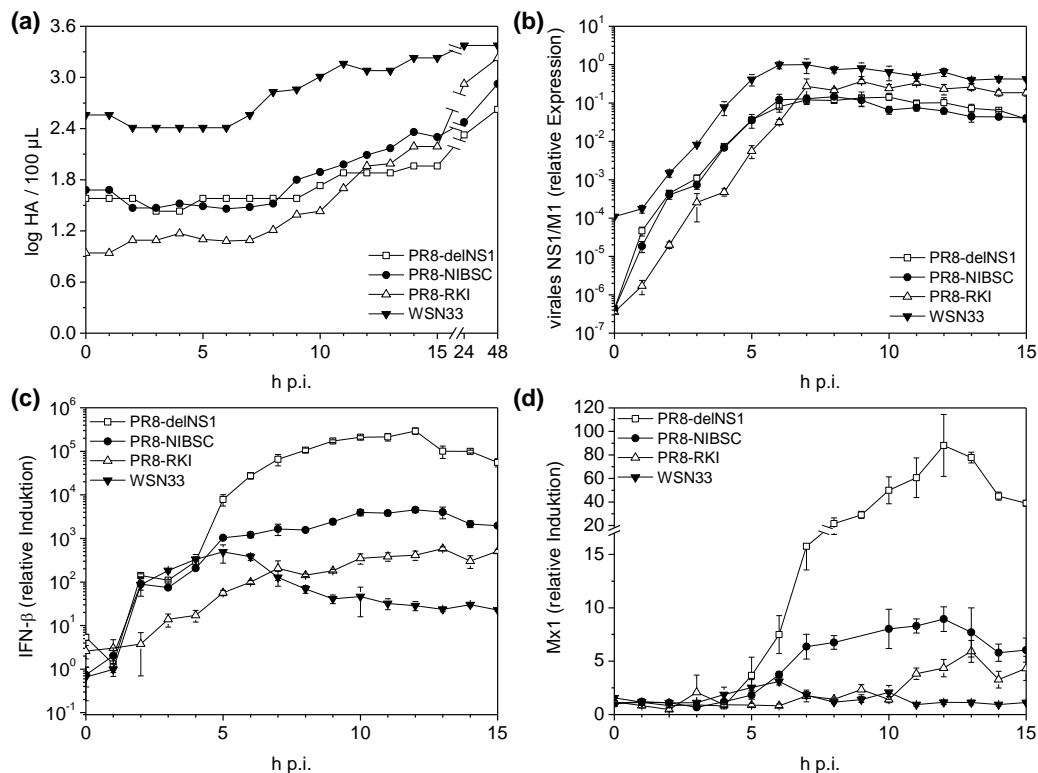


Abbildung 4-5: Stammabhängige Induktion der IFN-Antwort in Influenza-virusinfizierten MDCK-Zellen. Die Zellen wurden bei MOI 5 mit delNS1, PR8-NIBSC, PR8-RKI oder WSN33 infiziert. (a) HA-Verlauf. (b) Anstieg viraler mRNAs (NS1/M1). Der maximal in diesem Experiment erreichte Wert (WSN33, 6 h p.i.) wurde auf 1 gesetzt und die Expression der viralen Gene (M1/NS1) relativ zu diesem Wert angegeben. Für delNS1 wurde M1 statt NS1 gemessen. (c) Relative IFN- β -Expression. (d) Relative Mx1-Expression. Dargestellt ist die relative Änderung des Expressionslevels in virusinfizierten Zellen im Vergleich zum Mittelwert dreier nicht-infizierter Proben. Die Expression der angegebenen Gene wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Die angegebenen Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung von zwei infizierten Wells dar. Die dargestellten Verläufe sind repräsentativ für 3 vergleichbare, unabhängige Experimente.

Zusammenfassend konnte für alle Stämme eine Aktivierung der IFN-Antwort festgestellt werden, deren Stärke jedoch stammabhängig unterschiedlich ausfiel. PR8-RKI und WSN33 zeigen nur eine schwache IFN-Induktion, was zu einer späten bzw. nicht stattfindenden Aktivierung der Mx1-Expression führte. PR8-NIBSC induzierte deutlich mehr IFN, erreichte jedoch nicht das hohe Level von deINS1.

4.3 Der Beitrag nicht-infektiöser Viruspartikel zu der IFN-Induktion

Aus der Literatur ist bereits seit langem bekannt, dass auch nicht-infektiöse Influenza-Viruspartikel IFN induzieren können (Isaacs & Lindenmann, 1957). Im vorangegangenen Experiment fiel bereits auf, dass sich die dort verwendeten Virusstämme bezüglich des Verhältnisses von infektiösen Viren (TCID₅₀) zur Gesamtmenge an Viruspartikeln (Partikel mit HA-Aktivität) erheblich unterschieden. Aus der HA-Aktivität zum Zeitpunkt der Infektion (Abbildung 4-5a) ergibt sich unter Berücksichtigung der verwendeten MOI und dem TCID₅₀ der Saatviren der Anteil infektiöser Viren an der Gesamtpartikelzahl zu 2 % für PR8-RKI, 0,46 % für PR8-deINS1, 0,37 % für PR8-NIBSC und für 0,05 % für WSN33. Die Gesamtzahl der durch das Saatvirus zugeführten Viruspartikel (infektiös + nicht-infektiös) war also bei gleicher MOI für PR8-NIBSC oder deINS1 etwa 5-fach und für WSN33 etwa 40-fach höher als für PR8-RKI. Diese Unterschiede könnten sich auch auf die Induktion der IFN-Antwort ausgewirkt haben. In Abbildung 4-5c zeigten PR8-NIBSC, PR8-deINS1 und WSN33 zu Beginn der Infektion (0 - 4 h p.i.) eine nahezu identische, sehr schnelle Induktion von IFN- β , trotz vollständig unterschiedlichen Verhaltens im späteren Verlauf. Für PR8-RKI fiel die IFN-Induktion von 0 – 4 h p.i. dagegen sehr viel geringer aus. Folglich sollte hier der Beitrag nicht-infektiöser Viruspartikel zur Induktion der IFN-Antwort ermittelt werden.

4.3.1 IFN-Induktion durch Hitze- und β -Propiolacton-inaktivierte Influenza-Viren

Um den Einfluss nicht-infektiöser Viruspartikel im Saatvirus auf die IFN-Induktion zu bestimmen, sollte zunächst untersucht werden, ob chemisch oder thermisch inaktivierte Influenza-Viren in MDCK-Zellen das IFN-System aktivieren können. PR8-NIBSC (0,26 % infektiös) wurde bei 56 °C für 5, 10 und 15 min Hitze-inaktiviert, mit β -Propiolacton chemisch inaktiviert oder unbehandelt gelassen (Kontrolle). Die HA-Aktivität des Virus wird von beiden Inaktivierungsmethoden nicht beeinträchtigt (Kalbfuss *et al.*, 2007). Vermutlich bleibt das HA-Protein also intakt, so dass auf diese Weise inaktivierte Influenza-Viren trotzdem noch an Zellen binden und in diese eindringen können. Nach der Inaktivierung wurden MDCK-Zellen mit dem unbehandelten Saatvirus bei MOI 5 bzw. mit dem äquivalenten Volumen der inaktivierten Viruspräparationen infiziert. Die Expression von viralem M1, IFN- β und Mx1 wurde mittels qRT-PCR bestimmt.

4.3 Ergebnisse - Der Beitrag nicht-infektiöser Viruspartikel zu der IFN-Induktion

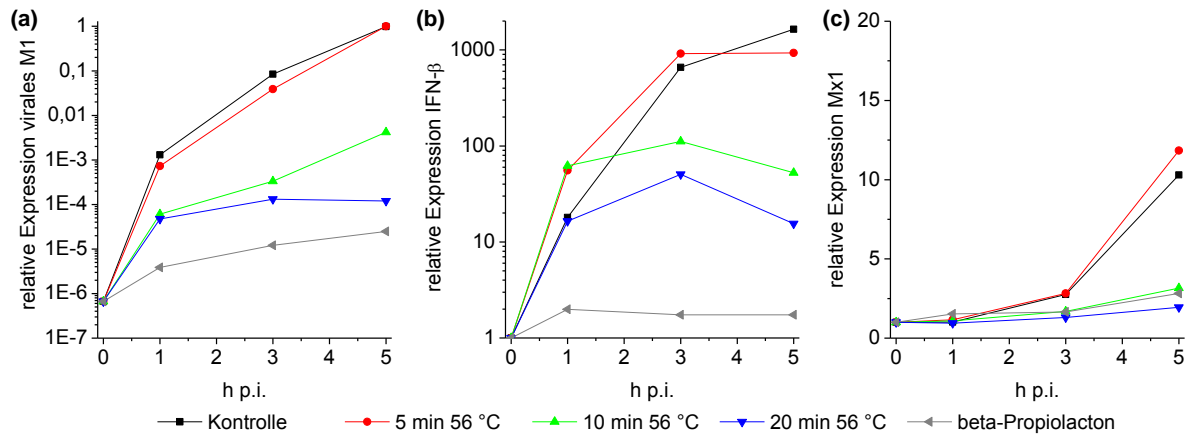


Abbildung 4-6: Aktivierung des IFN-Systems durch inaktivierte Influenza-Viren. PR8-NIBSC wurde durch β -Propiolacton oder für unterschiedliche Zeiten bei 56 °C inaktiviert. Anschließend wurden MDCK-Zellen bei MOI 5 mit unbehandeltem PR8-NIBSC (Kontrolle) oder dem gleichem Volumen inaktiviertem Saatvirus infiziert. (a) Expression von viralem M1. Der maximal in diesem Experiment erreichte Wert wurde auf 1 gesetzt und die Expression von M1 relativ zu diesem Wert angegeben. (b) Relative IFN- β -Expression. (c) Relative Mx1-Expression. Die Expression wurde relativ zu nicht-infizierten Zellen bestimmt. Die Daten sind repräsentativ für drei ähnliche Experimente mit vergleichbarem Ergebnis.

Die Kontrolle zeigte, analog zu Abbildung 4-5, unmittelbar nach der Infektion einen Anstieg von viraler mRNA und IFN- β (Abbildung 4-6a+b). Etwa 3 h p.i. konnte entsprechend eine Aktivierung von Mx1 beobachtet werden (Abbildung 4-6c). 5 min 56 °C inaktivierte Viren verhielten sich bei der Expression von viralem M1 identisch zur Kontrolle. Hier hatte offensichtlich keine messbare Inaktivierung stattgefunden. Entsprechend traten auch bei der Induktion von IFN- β und Mx1 kaum Unterschiede zur Kontrolle auf. Wurde das Saatvirus 10 min bei 56 °C inaktiviert, brach die Expression von viralem M1 im Vergleich zur Kontrolle deutlich ein. Hier wurde die Virusreplikation also klar beeinträchtigt. Wie auch bei 5 min 56 °C und der Kontrolle wurde IFN- β unmittelbar nach der Infektion aktiviert (1 h p.i.). Im weiteren Verlauf stieg diese Aktivierung jedoch nicht weiter an und blieb damit deutlich niedriger als in der Kontrolle, so dass keine Mx1-Aktivierung stattfand. Bei 20 min 56 °C war die M1-Expression verglichen mit 10 min 56 °C noch etwas stärker beeinträchtigt. Sie stieg zwar unmittelbar nach der Infektion (1 h p.i.) noch klar an, blieb dann aber stationär. Auch hier wurde noch eine initiale Aktivierung von IFN- β beobachtet. Diese blieb im Verlauf der Infektion jedoch deutlich unter dem Expressionslevel in der Kontrolle oder den 5 bzw. 10 min inaktivierten Saatviren zurück. Folglich wurde auch keine Mx1-Aktivierung beobachtet. β -Propiolacton-inaktivierte Saatviren wiesen nur noch einen minimalen Anstieg der viralen mRNAs auf und zeigten keine nennenswerte IFN- β und Mx1 Aktivierung.

Thermisch inaktivierte Saatviren aktivierten das IFN-System zu Beginn der Infektion also ähnlich stark wie unbehandelte Saatviren, blieben aber im weiteren Verlauf der Infektion deutlich hinter der Kontrolle zurück. Das spricht dafür, dass nicht-infektiöse Viruspartikel zur initialen Aktivierung von IFN- β beitragen, im späteren Verlauf jedoch die Virusreplikation die treibende Kraft für die IFN-Induktion ist. Die sehr schnelle Induktion von IFN- β (Abbildung 4-5c) durch PR8-NIBSC, PR8-delNS1 und WSN33 zu Beginn der Infektion (0 - 4 h p.i.) könnte somit auf den Einfluss nicht-infektiöser Viren

zurückzuführen sein. Chemisch inaktivierte Viren zeigten im Gegensatz zu thermisch inaktivierten keine Induktion des IFN-Systems. Bei 56 °C wurden wahrscheinlich die viralen Polymerasen inaktiviert (Marcus *et al.*, 2005), wogegen β -Propiolacton mit der viralen RNA reagiert (Colburn *et al.*, 1965; Roberts & Warwick, 1963). Intakte virale RNA war demnach für die IFN-Induktion in Abwesenheit von Virusreplikation erforderlich.

4.3.2 Einfluss nicht-infektiöser Viruspartikel auf die IFN-Induktion in der frühen Phase der Virusinfektion

Das vorangegangene Experiment verdeutlicht, dass thermisch inaktivierte Viren auch in Abwesenheit von Virusreplikation eine schwache IFN-Induktion auslösen können. Im Folgenden sollte nun der Beitrag nicht-infektiöser Viren zur IFN-Induktion während der Virusreplikation untersucht werden. Dazu wurden Infektionen mit drei verschiedenen Saatvirus-Chargen von PR8-NIBSC durchgeführt, die sich in dem Anteil nicht-infektiöser Partikel unterschieden (Tabelle 4-5). Das im vorangegangenen Experiment verwendete PR8-NIBSC Saatvirus (0,37 % infektiös) war nicht mehr verfügbar.

Tabelle 4-5: Übersicht über die in 4.3.2 verwendeten Saatviren

Herstellungsdatum	log HA / 100 μ L	TCID ₅₀ [mL ⁻¹]	infektiöse Viren [%]
15.12.2005	2,6	1,30 x 10 ⁷	0,16%
06.11.2007	2,08	6,32 x 10 ⁶	0,26%
02.03.2011	2,37	1,00 x 10 ⁹	21,33%

Mit diesen 3 Saatviren sollten MDCK-Zellen bei MOI 3 infiziert werden. In Vorexperimenten hatte sich allerdings die Einstellung einer festen MOI bei Saatviren mit deutlich verschiedenem TCID₅₀ (vgl. Tabelle 4-5) als problematisch herausgestellt. Die tatsächlich realisierte MOI, bestimmt durch TCID₅₀-Messung im Infektionsmedium 0 h p.i., fiel bei Saatviren mit hohem TCID₅₀ ($> 1 \times 10^8$ mL⁻¹) in drei unabhängigen Experimenten stets um Faktor 2-3 geringer aus als bei Saatviren mit niedrigem TCID₅₀ (Daten nicht gezeigt). Um diesen Effekt zu kompensieren, wurde hier für das Saatvirus mit 21,3 % infektiösen Viren zusätzlich eine Infektion bei MOI 10 durchgeführt.

Zunächst wurden die HA-Titer bestimmt (Abbildung 4-7a). Für die beiden Stämme mit 0,16 % und 0,26 % infektiösen Viren war zum Zeitpunkt der Infektion HA-Aktivität vorhanden, wogegen für das Saatvirus mit 21,3 % infektiösen Viren sowohl bei MOI 3 als auch MOI 10 kein messbarer HA-Titer vorlag. Dies verdeutlicht den Unterschied in der zugeführten Virus-Partikelmenge zwischen den drei Saatviren. Als nächstes wurde die Expression von Mx1, IFN- β und viralem M1 mittels qRT-PCR bestimmt. Der Verlauf der M1-Expression war für die Saatviren mit 0,16 % und 0,26 % infektiösen Viren nahezu deckungsgleich (Abbildung 4-7b). Die M1 Expressionslevel waren für diese zwei Saatviren zu allen Zeitpunkten deutlich höher (Faktor 10-20) als für das Saatvirus mit 21,3 % infektiösen Viren. Durch Erhöhung der MOI von 3 auf 10 konnte die M1-Expression für das Saatvirus

4.3 Ergebnisse - Der Beitrag nicht-infektiöser Viruspartikel zu der IFN-Induktion

mit 21,3 % infektiösem Anteil zwar geringfügig gesteigert werden (Faktor zwei), blieb aber trotzdem noch hinter den beiden anderen Saatviren zurück. Ungenauigkeiten bei der MOI-Einstellung konnten daher als Ursache für die unterschiedlich hohen M1 mRNA-Level ausgeschlossen werden. Bei der IFN-Induktion (Abbildung 4-7c) zeigte sich für die Saatviren mit 0,16 % und 0,26 % infektiösen Partikeln ein sehr schneller starker Anstieg unmittelbar nach Beginn der Infektion. Dieser schnelle Anstieg wurde bereits zuvor für PR8-NIBSC beobachtet (Abbildung 4-5c). Das Saatvirus mit 21,3 % infektiösem Anteil induzierte dagegen bei beiden verwendeten MOIs deutlich weniger IFN und der Anstieg der Expression erfolgte erheblich langsamer. In Übereinstimmung damit konnte für das Saatvirus mit 21,3 % infektiösen Partikeln bei beiden MOIs im untersuchten Zeitraum keine Mx1-Induktion beobachtet werden (Abbildung 4-7d). Bei den beiden anderen Saatviren war Mx1 bereits 3 h p.i. deutlich induziert.

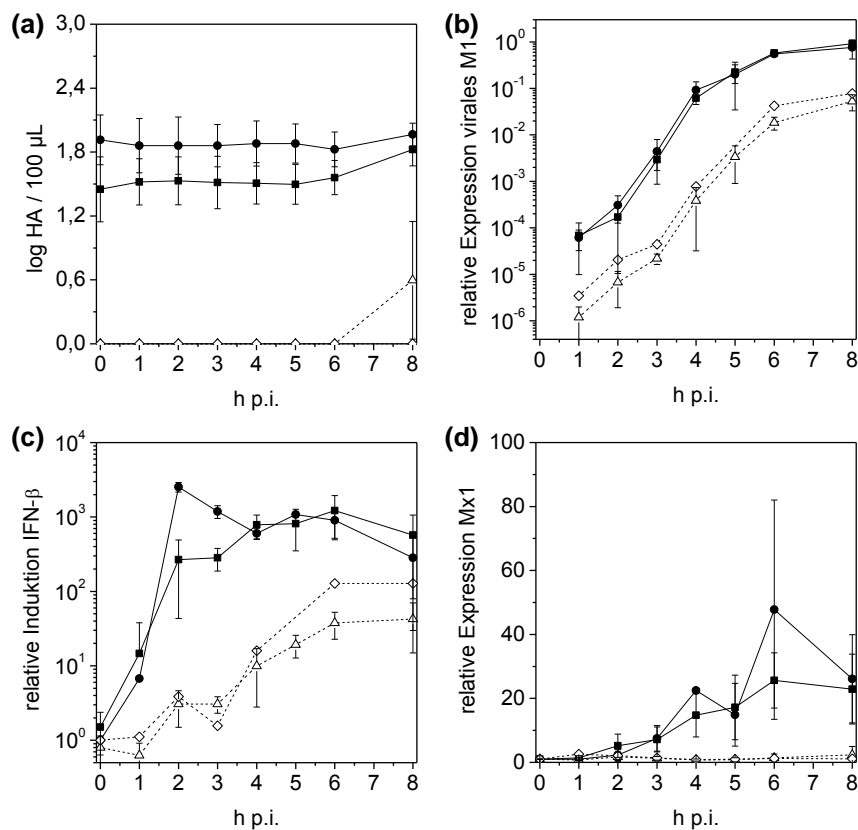


Abbildung 4-7: Einfluss nicht-infektiöser Viruspartikel im Saatvirus auf die Induktion der IFN-Antwort. ■ 0,26 % infektiöse Viren (MOI=3), • 0,16 % infektiöse Viren (MOI=3), Δ 21,3 % infektiöse Viren (MOI=3), ◊ 21,3 % infektiöse Viren (MOI=10). MDCK-Zellen wurden bei der angegebenen MOI mit 3 verschiedenen Saatviren von PR8-NIBSC infiziert, die sich im Anteil aktiver Viren (bestimmt über TCID₅₀) an der Gesamtheit aller Virionen (bestimmt über HA-Aktivität) unterschieden. (a) HA-Aktivität im Medium. (b) Anstieg des viralen Transkript-Niveaus (M1 mRNA). Die M1-Expression wurde relativ zu dem maximal in diesem Experiment ermittelten Wert (auf 1 gesetzt) dargestellt. (c) IFN-β-Expression. (d) Mx1-Expression. Dargestellt ist die relative Änderung des Expressionslevels im Vergleich zum Zeitpunkt der Infektion. Die Messung der Genexpression erfolgte durch qRT-PCR. Angegeben sind die Mittelwerte ± SD von drei (0,26 % infektiöse Viren, 21,3 % infektiöse Viren) bzw. zwei (0,13 % infektiöse Viren) unabhängigen Experimenten. Für das Saatvirus mit 21,3 % infektiösen Viren (MOI=10) wurde nur ein Experiment durchgeführt.

Zusammenfassend schien ein schlechtes Verhältnis von infektiösen zu nicht-infektiösen Viren bei PR8-NIBSC zu einer starken IFN-Induktion zu führen. Durch Erhöhung des Anteils infektiöser Viren

konnte die Aktivierung der IFN-Antwort dagegen deutlich gesenkt werden. Für die in Abbildung 4-5 zu Beginn der Infektion schwächere IFN-Induktion durch PR8-RKI im Vergleich zu PR8-NIBSC, PR8-delNS1 und WSN33 war also wahrscheinlich der höhere Anteil infektiöser Partikel bei PR8-RKI mitverantwortlich.

4.3.3 Beeinträchtigung der Virusreplikation durch nicht-infektiöse Viruspartikel

Das vorangegangene Experiment legt einen deutlichen Einfluss nicht-infektiöser Viruspartikel auf die Induktion der IFN-Antwort nahe. Um auch den Einfluss der Saatvirus-Zusammensetzung auf die Virusreplikation und die IFN-Induktion über den gesamten Verlauf der Infektion zu ermitteln, sollte ein vergleichbares Experiment über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden. Dazu wurden MDCK-Zellen bei MOI 1 mit vier unabhängig voneinander hergestellten Saatviren des Stamms PR8-NIBSC infiziert, von denen jeweils zwei einen hohen (7,3 und 21,3 % infektiös) bzw. niedrigen Anteil (0,22 % und 0,26 % infektiös) infektiöser Viren aufwiesen (vgl. Tabelle 4-6).

Tabelle 4-6: Übersicht über die in 4.3.3 verwendeten Saatviren

Herstellungsdatum	log HA / 100 µL	TCID ₅₀ [mL ⁻¹]	infektiöse Viren [%]
06.11.2007	2,08	6,32 x 10 ⁶	0,26%
16.07.2009	2,1	5,43 x 10 ⁶	0,22%
17.02.2010	2,8	9,20 x 10 ⁸	7,29%
02.03.2011	2,37	1,00 x 10 ⁹	21,33%

Unmittelbar nach der Infektion (0 h p.i.) wurde der TCID₅₀ des Infektionsmediums bestimmt (Abbildung 4-8a) und daraus die tatsächlich realisierte MOI berechnet. Für die beiden Saatviren mit niedrigerem Anteil infektiöser Viren (0,22 % und 0,26 % infektiös) ergab sich eine tatsächliche MOI von 2, für die zwei Saatviren mit hohem infektiösem Anteil fiel die tatsächliche MOI mit 1,5 (7,3 % aktiv) bzw. 1,15 (21,3% aktiv) etwas geringer aus. Die angestrebte MOI von 1 wurde also in allen Fällen überschritten. In Anbetracht der sehr unterschiedlichen TCID₅₀-Werte der Saatviren (vgl. Tabelle 4-6) und dem Fehler des TCID₅₀ ($\pm 0.3 \log \text{TCID}_{50}$) sind die Abweichungen in der tatsächlichen MOI hier jedoch als verhältnismäßig gering einzuschätzen. Bei Betrachtung der TCID₅₀- (Abbildung 4-8b) und HA-Verläufe (Abbildung 4-8c) ergaben sich zwischen den Saatviren mit hohem bzw. niedrigem Anteil infektiöser Viren klare Unterschiede. Für die Saatviren mit hohem Anteil infektiöser Viren (7,3 % und 20,3 % infektiös) stiegen TCID₅₀ und HA im Verlaufe der Infektion schnell an und es wurden mit über 1×10^9 aktiven Viren/mL (TCID₅₀) und 3 log HA / 100 µL verhältnismäßig hohe Virustiter erreicht. Bei den Saatviren mit niedrigem Anteil infektiöser Viren (0,22 % und 0,26 % infektiös) konnte dagegen nach der Infektion keine Zunahme des TCID₅₀ beobachtet werden. Der HA stieg zwar an, jedoch wurde nur ein maximaler Titer von 2,4 log HA / 100 µL (0,22 % infektiös) bzw. 2,6 log HA / 100 µL (0,26% infektiös) erreicht. Trotz der niedrigeren Titer zeigte die Messung der viralen mRNA-Level (Abbildung 4-8d) in den ersten 16 h p.i. deutlich höhere Werte für die Saatviren

4.3 Ergebnisse - Der Beitrag nicht-infektiöser Viruspartikel zu der IFN-Induktion

mit niedrigem Anteil infektiöser Viren (0,22 % und 0,26 % infektiös). Dies entspricht den Ergebnissen des vorangegangenen Experiments. Im weiteren Verlauf glichen sich die M1-Expressionslevel aller vier Saatviren aneinander an. Bei der IFN-Induktion konnten ebenfalls die bereits zuvor beobachteten Trends bestätigt werden. Die Saatviren mit niedrigem Anteil infektiöser Viren (0,22 % und 0,26 % infektiös) aktivierten IFN- β (Abbildung 4-8e) und Mx1 (Abbildung 4-8f) in der frühen Phase der Infektion deutlich stärker als die zwei anderen. Dieser klare Unterschied verschwand auch hier im späteren Verlauf der Infektion.

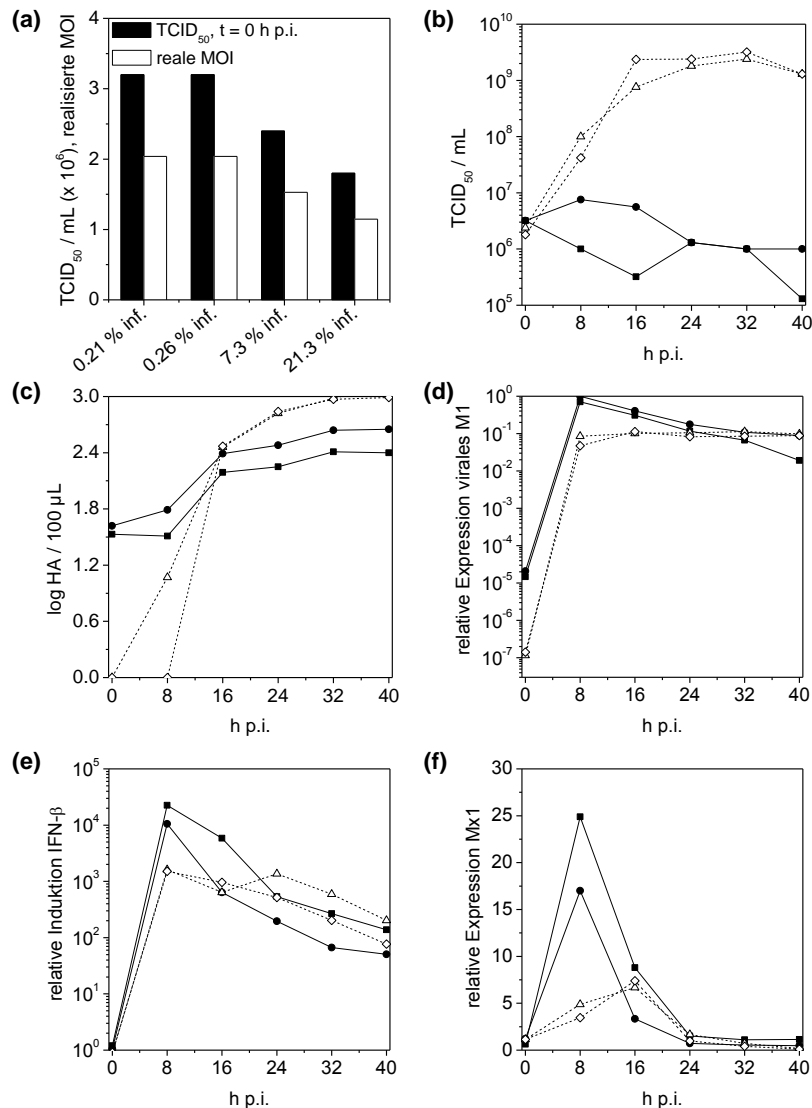


Abbildung 4-8: Einfluss nicht-infektiöser Viruspartikel auf die Virusreplikation. ■ 0,22 % infektiöse Viren, ● 0,26 % infektiöse Viren, △ 7,3 % infektiöse Viren, ◇ 21,3 % infektiöse Viren. MDCK-Zellen wurden bei MOI 1 mit vier verschiedenen Saatviren von PR8-NIBSC infiziert, die sich im Anteil aktiver Viren (bestimmt über TCID₅₀) an der Gesamtheit aller Virionen (bestimmt über HA-Aktivität) unterschieden. (a) Realisierte MOI. Die TCID₅₀-Werte im Infektionsmedium wurden zum Zeitpunkt 0 h p.i. direkt ohne zwischenzeitliches Einfrieren bestimmt und daraus zusammen mit der Startzellzahl die tatsächliche MOI berechnet. (b) TCID₅₀-Verlauf. (c) HA-Verlauf. (d) Anstieg des viralen Transkript-Levels (M1 mRNA). Die M1-Expression wurde relativ zu dem maximal in diesem Experiment ermittelten Wert (auf 1 gesetzt) dargestellt. (e) IFN- β -Expression. (f) Mx1-Expression. Die Messung der Genexpression erfolgte durch qRT-PCR. Dargestellt ist die relative Änderung des Expressionslevels im Vergleich zum Zeitpunkt der Infektion.

Große Mengen nicht-infektiöser Partikel schienen also die Bildung neuer aktiver Viren bei der Infektion stark zu inhibieren und wirkten sich in geringerem Maße auch negativ auf den HA-Titer aus. Gleichzeitig verursachten sie eine stärkere Aktivierung des IFN-Systems. Nicht-infektiöse Viruspartikel hatten somit einen erheblichen Einfluss auf die Virusinfektion.

4.4 Unterdrückung der Interferonantwort

Unabhängig von den zugrunde liegenden Ursachen verdeutlichen die zuvor dargestellten Ergebnisse, dass sich verschiedene Virusstämme oder auch Saatviren erheblich in der Stärke der induzierten IFN-Antwort unterscheiden. Auffällig ist dabei, dass PR8-RKI und WSN33, die bei der Infektion verhältnismäßig hohe HA-Titer liefern (vgl. Abbildung 4-5), sich durch eine vergleichbar schwache IFN-Induktion auszeichnen. Dagegen induzieren PR8-NIBSC und delNS1 IFN deutlich stärker und erreichen gleichzeitig niedrigere Titer als PR8-RKI und WSN33. Folglich sollte untersucht werden, ob eine Unterdrückung der IFN-Induktion für diese Stämme zu einer Verbesserung der Virusausbeute führt.

4.4.1 Unterdrückung der IFN-Antwort durch Überexpression von NS1 – verschiedene Influenza-Virusstämme

Das NS1 Protein ist als IFN-Antagonist bekannt (vgl. 2.3.4.1). Abbildung 4-5 zeigt jedoch, dass IFN bereits sehr früh nach der Infektion aktiviert wird. NS1 liegt zu dieser Zeit noch nicht vor, da es als nicht-strukturelles Protein erst während der Virusinfektion produziert wird. Aufgrund der positiven Feedback-Mechanismen des Type I IFN-Systems könnte allerdings gerade diese frühe Phase der Infektion die Stärke der IFN-Antwort wesentlich beeinflussen. Eine transiente Überexpression von NS1 bereits vor der Infektion sollte die IFN-Induktion entsprechend deutlich reduzieren, da dadurch eine frühe IFN-Induktion verhindert wird.

Entsprechend wurden MDCK-Zellen 24 h vor der Infektion mit einem Expressionsvektor für PR8-NS1 bzw. dem entsprechenden Leervektor (Kontrolle) transfiziert. Die Transfektion erfolgte über Elektroporation, womit Transfektionseffizienzen von etwa 80-90 % der Zellen erreicht werden (vgl. 4.1.1). Für die Infektion wurden PR8-NIBSC und delNS1 gewählt, da diese Stämme zuvor (Abbildung 4-5) eine starke IFN-Induktion zeigten. WSN33 wurde repräsentativ für einen schwach IFN-induzierenden Stamm verwendet. Zunächst wurden die Expressionslevel von IFN- β und Mx1 mittels qRT-PCR bestimmt und zwischen NS1- und Leervektor-transfizierten Zellen verglichen (Abbildung 4-9a). NS1-Transfektion führte bei allen Stämmen zu einer deutlichen Verringerung der Expression beider Gene. Entsprechend konnten für delNS1 eine deutlich schnellere Replikation und höhere Virusausbeuten in NS1-transfizierten Zellen ermittelt werden (Abbildung 4-9b). PR8-NIBSC zeigte ebenfalls in NS1-transfizierten Zellen einen etwas früheren Anstieg des Virustiters (Abbildung 4-9c).

4.4 Ergebnisse - Unterdrückung der Interferonantwort

Bei qRT-PCR-Messung der viralen Genomkopien im Überstand konnte auch für diesen Stamm ein geringfügig höherer finaler Virustiter in NS1-transfizierten Zellen beobachtet werden, jedoch lag beim finalen HA-Titer kein Unterschied vor. WSN33 zeigte in NS1- und Leervektor-transfizierten Zellen sowohl bei qRT-PCR-Messung als auch im HA denselben finalen Virustiter und auch die Titerverläufe unterschieden sich nicht wesentlich (Abbildung 4-9d). Die Virusausbeute für die WT-Stämme PR8-NIBSC und WSN33 schien damit nicht durch die IFN-Antwort limitiert zu werden.

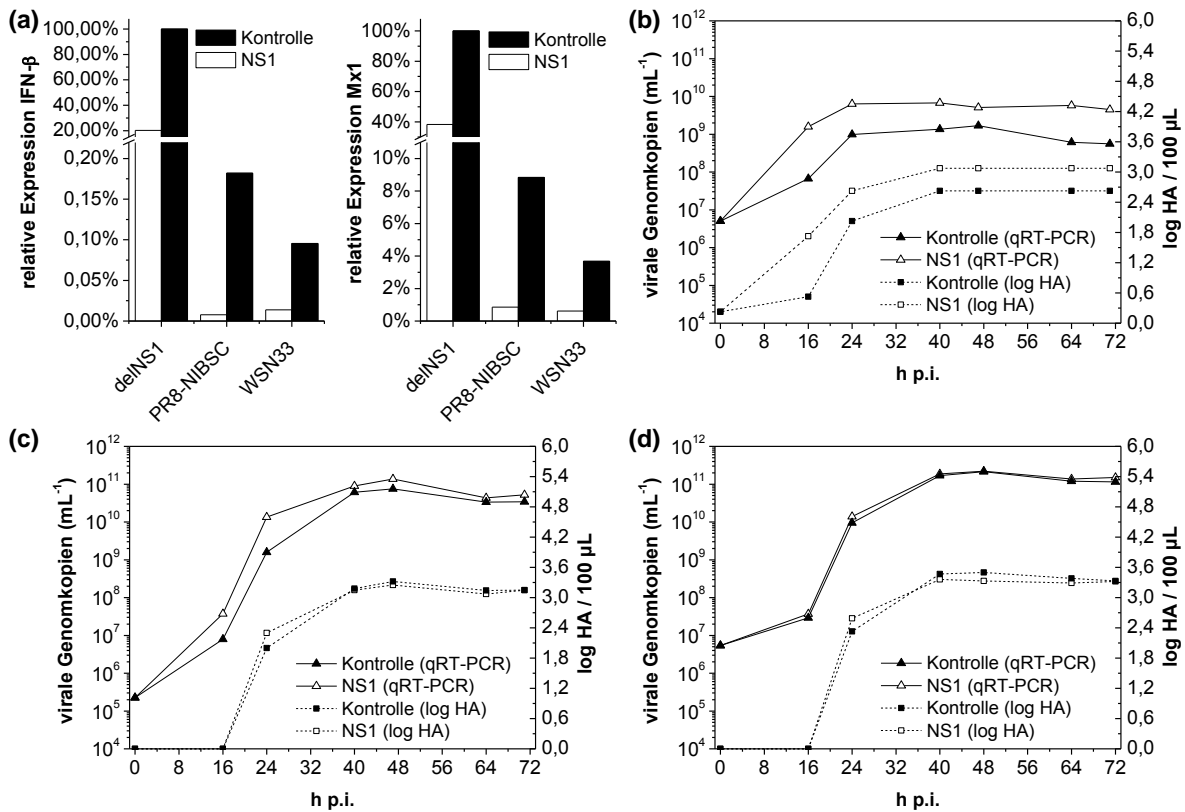


Abbildung 4-9: Effekt der IFN-Unterdrückung durch transiente Überexpression von PR8-NS1 auf die Replikation verschiedener Influenza-Virusstämme. MDCK-Zellen wurden 24 h vor der Infektion mit einem Expressionsvektor für PR8-NS1 oder dem zugehörigen Leervektor (Kontrolle) transfiziert. Die Infektion erfolgte mit delNS1, PR8-NIBSC und WSN33 bei MOI 0,025. (a) Unterdrückung der IFN-Induktion in NS1-transfizierten Zellen. Die Expression von IFN- β und Mx1 wurde 24 h p.i. mittels qRT-PCR bestimmt. Die Expressionslevel sind relativ zu dem für delNS1 in Leervektor-transfizierten Zellen vorliegenden Wert (100 %) dargestellt. (b,c,d) Titerverlauf von delNS1 (b), PR8-NIBSC (c) und WSN33 (d). Die Virustiter wurden mittels HA-Assay und qRT-PCR (M1) bestimmt. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

4.4.2 Unterdrückung der IFN-Antwort durch Überexpression von NS1 – verschiedene MOIs

Für die Impfstoffproduktion werden möglichst niedrige MOIs angestrebt (Aggarwal *et al.*, 2011). In der Literatur finden sich jedoch Hinweise, dass die Bedeutung von NS1 für die Virusreplikation mit abnehmender MOI zunimmt (Solórzano *et al.*, 2005; van Wielink *et al.*, 2011). Niedrige MOIs verlängern die Prozessdauer, so dass auch mehr Zeit für die IFN-Antwort zur Verfügung steht. In IFN-stimulierten Zellen nimmt zudem das inhibitorische Potential des IFN-induzierten, antiviralen Status mit der Dauer der Stimulation zu (Arnheiter & Haller, 1983; Colonna & Pang, 1982). Demnach könnte

der Einfluss der IFN-Antwort auf die Virusreplikation bei geringer MOI höher sein. Das vorangegangene Experiment (4.4.1) legt nahe, dass die Virusausbeute bei WT-Stämmen nicht durch die IFN-Antwort limitiert wird. Um einen Einfluss der MOI auf dieses Ergebnis auszuschließen, wurde das Experiment für PR8-NIBSC mit drei unterschiedlichen MOIs (0,025; 0,0025; 0,00025) wiederholt. Analog zu Abbildung 4-9c wurde bei allen MOIs in NS1-transfizierten Zellen ein etwas früherer Anstieg des HA-Titers beobachtet als in Leervektor-transfizierten Zellen (Abbildung 4-10a), jedoch unterschieden sich die finalen Virusausbeuten kaum (Abbildung 4-10b). Die Unterdrückung der IFN-Induktion durch NS1-Transfektion schien daher in dieser Arbeit MOI-unabhängig keinen wesentlichen Einfluss auf die Replikation des WT-Stammes PR8-NIBSC zu haben.

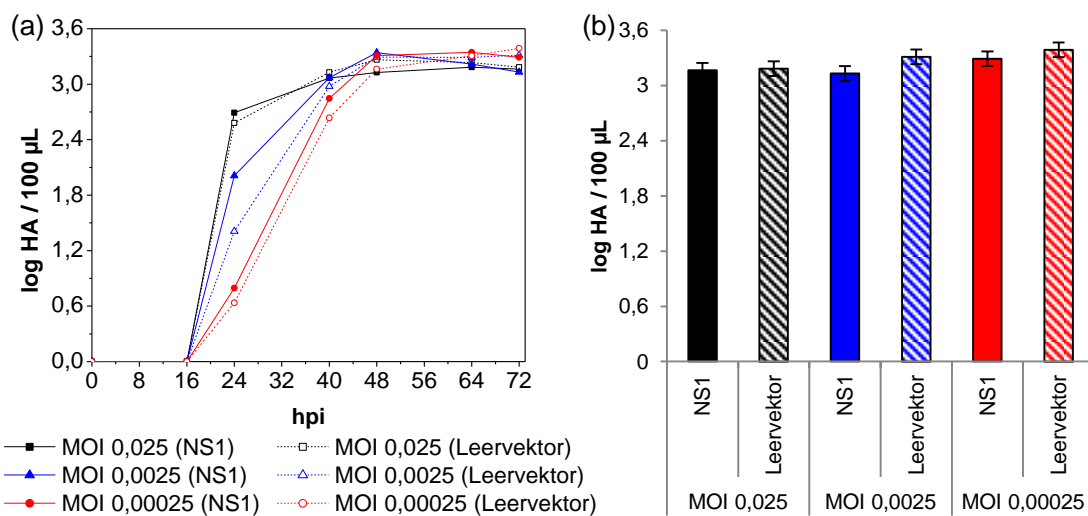


Abbildung 4-10: Effekt der IFN-Unterdrückung durch transiente Expression von PR8-NS1 auf die Virusreplikation bei verschiedenen MOIs. MDCK-Zellen wurden 24 h vor der Infektion mit einem Expressionsvektor für PR8-NS1 oder dem zugehörigen Leervektor transfiziert. Die Infektion erfolgte mit PR8-NIBSC bei den angegebenen MOIs. (a) Titerverlauf. (b) Vergleich der Endtiter (72 h p.i.) Die Virustiter wurden mittels HA-Assay bestimmt. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des HA-Assays an.

4.4.3 Unterdrückung der IFN-Antwort durch Überexpression von Rabies-Virus P und Ebola-Virus VP35

In den vorangegangenen Experimenten (4.4.1, 4.4.2) konnten die finalen Titer der WT-Stämme PR8-NIBSC sowie WSN33 nicht nennenswert durch Überexpression von NS1 und damit einhergehender Unterdrückung der IFN-Antwort verbessert werden. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob sich dieses Ergebnis in vergleichbaren Experimenten mit anderen viralen IFN-Antagonisten bestätigt. Dazu wurden zusätzlich das Rabies-Virus P (Phosphoprotein) und das Ebola-Virus VP35 (viral protein 35) getestet. Expressionsvektoren für NS1, P und VP35 wurden einzeln oder in verschiedenen Kombinationen miteinander in MDCK-Zellen transfiziert (vgl. Abbildung 4-11a). Leervektor-transfizierte Zellen dienten als Kontrolle. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen bei MOI 0,025 mit PR8-NIBSC infiziert. Die Expression von IFN- β und Mx1 wurde 24 h p.i. mittels qRT-PCR bestimmt.

4.4 Ergebnisse - Unterdrückung der Interferonantwort

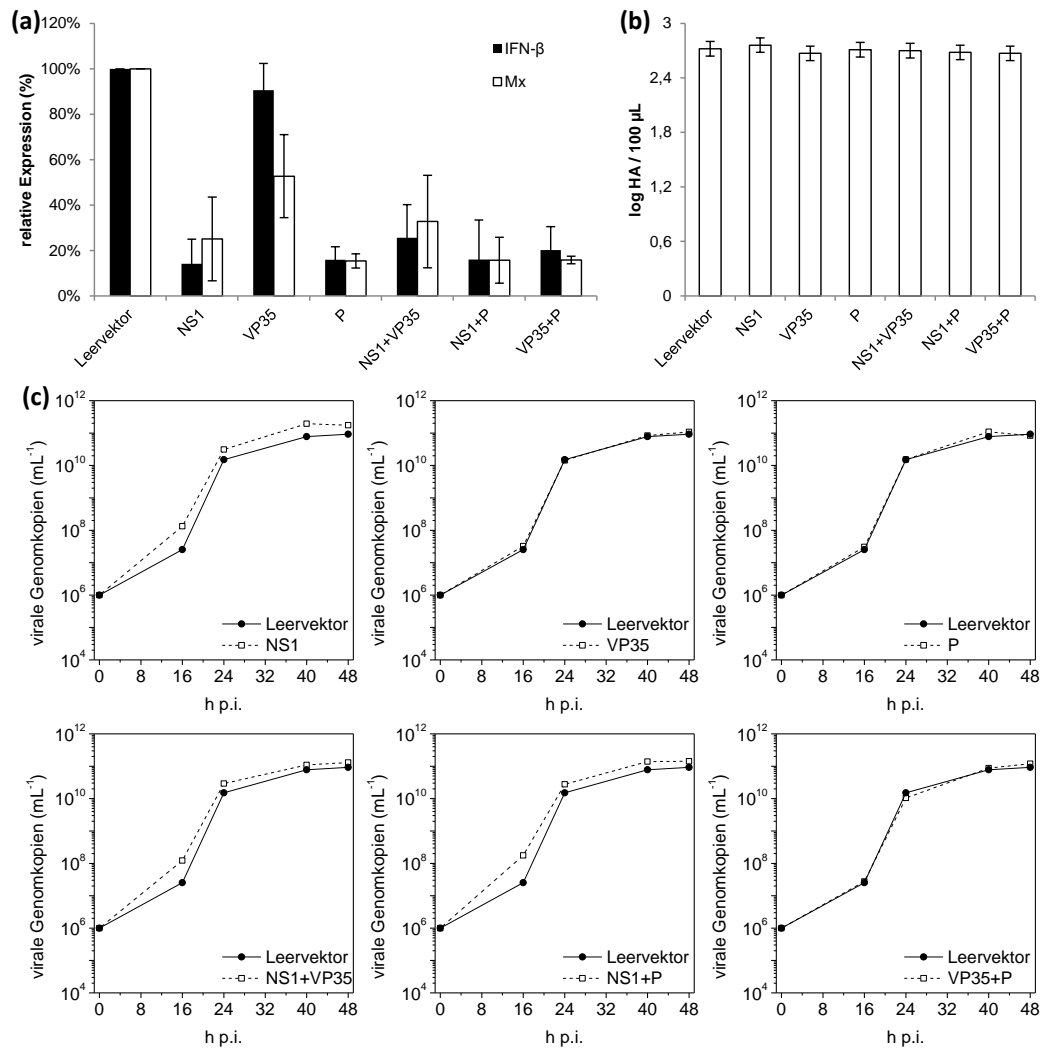


Abbildung 4-11: Unterdrückung der IFN-Antwort durch verschiedene virale IFN-Antagonisten in MDCK-Zellen. Die Zellen wurden 24 h vor der Infektion mit den entsprechenden Expressionsvektoren transfiziert. Bei alleiniger Transfektion eines Antagonisten wurden 4 μg des jeweiligen Konstrukts pro 1.5×10^6 Zellen transfiziert. Bei der Kombination zweier Antagonisten wurden je 2 μg beider Konstrukte pro 1.5×10^6 Zellen verwendet. Infiziert wurde mit PR8-NIBSC bei MOI 0,025. (a) Unterdrückung der IFN-Antwort. 24 h p.i. wurde die Expression von IFN-β und Mx1 mittels qRT-PCR bestimmt. Die Expressionslevel wurden relativ zu dem jeweils in Leervektor-transfizierten Zellen vorliegenden Wert (100 %) berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten \pm SD. (b) Einfluss der Antagonisten-Transfektion auf den finalen HA-Titer. Die Titer wurden 48 h p.i. bestimmt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des HA-Assays an. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente (c) Einfluss der Antagonisten-Transfektion auf den Titerverlauf. Die Virustiter wurden mittels qRT-PCR (M1) bestimmt. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

Transfektion von NS1 und P führten zu einer deutlichen Verringerung der IFN-Antwort im Vergleich zur Kontrolle, wogegen für VP35 alleine nahezu kein Effekt beobachtet werden konnte (Abbildung 4-11a). Im Vergleich zur Transfektion einzelner Antagonisten führten Kombinationen der Konstrukte zu ähnlich guten, jedoch nicht besseren Ergebnissen bei der IFN-Unterdrückung. Wie bereits zuvor für NS1 beobachtet, wurde auch hier verglichen zur Kontrolle keine Steigerung des finalen HA-Titers durch Unterdrückung der IFN-Antwort erreicht (Abbildung 4-11b). Die Messung der Virusakkumulation über qRT-PCR zeigte erneut für alle Ansätze, bei denen NS1 allein oder auch in Kombination mit P bzw. VP35 transfiziert wurde, eine gegenüber der Kontrolle leichte Beschleunigung der Virusfreisetzung und geringfügig höhere finale Titer (Abbildung 4-11c). Bei

Transfektion von P oder VP35, allein oder in Kombination, waren die Titerverläufe dagegen vollständig identisch mit der Kontrolle. P reduzierte die IFN-Antwort jedoch vergleichbar effektiv wie NS1. Damit können die im Vergleich zur Kontrolle schnellere Virusfreisetzung und der leicht erhöhten finalen Virustiter (qRT-PCR) in NS1-transfizierten Zellen nicht auf die schwächere Aktivierung des IFN-Systems zurückzuführen sein. Zusammengefasst konnte also auch hier kein limitierender Einfluss der IFN-Antwort auf die Replikation des WT-Stamms PR8-NIBSC festgestellt werden.

Zusätzlich wurde der Einfluss einer IFN-Unterdrückung durch Transfektion von NS1 oder P noch für weitere Influenza-Virus Stämme untersucht. Abbildung 4-12 fasst die Ergebnisse dieser Experimente zusammen. Für den IFN-sensitiven deINS1-Stamm führte IFN-Unterdrückung sowohl durch Transfektion von P als auch NS1 zu einer signifikanten Titersteigerung. Allerdings fiel diese mit NS1 sehr viel deutlicher aus als mit P. Für die Wildtyp-Stämme PR8-RKI, B-Malaysia und WSN33 konnte dagegen, wie bereits zuvor für PR8-NIBSC beobachtet, durch Antagonisten-Überexpression in keinem Fall eine signifikante Steigerung der HA Ausbeute im Vergleich zu Leervektor-transfizierten Zellen erreicht werden. Dieses Ergebnis war nicht überraschend, da PR8-RKI, WSN33 und B/Malaysia IFN schwächer induzierten als PR8-NIBSC (vgl. Abbildung 4-5 für PR8-RKI und WSN33, sowie Frensing *et al.* (2011) für B/Malaysia). Zusammenfassend deutet dieses Ergebnis stark darauf hin, dass die Aktivierung der IFN-Antwort in MDCK-Zellen kein limitierender Faktor für die Produktion von Impfstoffen auf Basis nicht-attenuierter Influenza-Stämme ist.

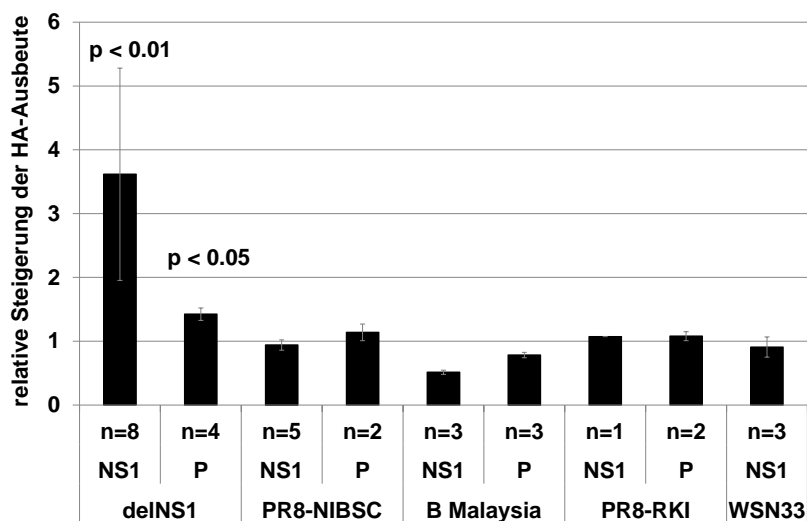


Abbildung 4-12: Einfluss der IFN-Unterdrückung durch Überexpression von NS1 und P für verschiedene Influenza-Virusstämme. MDCK-Zellen wurden 24 h vor der Infektion mit Expressionsvektoren für die angegebenen Proteine oder als Kontrolle mit dem zugehörigen Leervektor transfiziert. Die Infektion erfolgte für alle Stämme bei MOI 0,025. Die HA-Titer wurden 48 h nach der Infektion bestimmt. Angegeben ist das Verhältnis der HA-Aktivität von Antagonisten-transfizierten Zellen zu der HA-Aktivität desselben Stamms bei Leervektor-transfizierten Kontrollen. n kennzeichnet die Anzahl unabhängiger Experimente. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts der unabhängigen Experimente an. p: p-Wert eines gepaarten t-Test bei Vergleich der absoluten HA-Titer von Antagonisten-transfizierten Zellen mit der zugehörigen Kontrollinfektion.

4.5 Der Einfluss von Trypsin auf die IFN-Antwort

Bei der Impfstoffproduktion in MDCK-Zellen werden dem Medium während der Virusinfektion geringe Mengen Trypsin zugesetzt (Lazarowitz & Choppin, 1975; Tree *et al.*, 2001). Trypsin spaltet das virale Hämagglutinin und ermöglicht so nach Eindringen der Viren in die Wirtszelle die Freisetzung der viralen RNA in das Zytoplasma (Klenk *et al.*, 1975). Darüber hinaus könnte Trypsin einem negativen Einfluss der IFN-Antwort auf die Virusreplikation in MDCK-Zellen vorbeugen. So ist für Interferone aus unterschiedlichen Spezies eine starke Anfälligkeit gegenüber Trypsin bekannt (Buckler & Baron, 1966; Burke & Isaacs, 1958; Ramon *et al.*, 2005). Proteolytischer IFN-Abbau durch Trypsin könnte die Stärke der IFN-Antwort bei der Virusreplikation reduzieren. Außerdem läuft der virale Replikationszyklus in MDCK-Zellen schneller ab als in anderen Zellen (Ueda *et al.*, 2008). Gleichzeitig vertragen MDCK-Zellen vergleichsweise hohe Trypsinkonzentrationen, die eine effektive HA-Spaltung ermöglichen. Diese Kombination aus schneller Virusreplikation in MDCK-Zellen und effektiver HA-Spaltung durch Trypsin führt selbst bei geringer MOI zu einer schnellen Ausbreitung der Virusinfektion. In der Literatur finden sich Hinweise, dass schnelle Ausbreitung der Virusinfektion im Wirt eine Möglichkeit darstellt, der antiviralen Immunantwort zu entkommen (Grimm *et al.*, 2007; Randall & Goodbourn, 2008). Entsprechend sollten hier die Wechselwirkungen zwischen Trypsin, der IFN-Induktion und dem inhibitorischen Einfluss der IFN-Antwort für die Influenza-Virusreplikation untersucht werden.

4.5.1 Aktivierung der IFN-Antwort in Gegenwart und Abwesenheit von Trypsin

4.5.1.1 Influenza-Virusreplikation und IFN-Induktion in An- und Abwesenheit von Trypsin

Zunächst sollte der Einfluss von Trypsin sowohl auf die IFN-Induktion als auch auf die Virusreplikationsdynamik untersucht werden. Dazu wurden MDCK-Zellen in Gegenwart oder Abwesenheit von 5 U/mL Trypsin mit PR8-NIBSC (MOI 0,025) infiziert. 5 U/mL ist die Standard-Trypsinkonzentration zur Infektion von MDCK-Zellen mit Influenza-Viren in unserer Arbeitsgruppe und alle Experimente in dieser Arbeit wurden, wenn nicht anders angegeben, bei dieser Konzentration durchgeführt. 64 h p.i. wurden die Viren aus dem Überstand mittels Ultrazentrifugation pelletiert und die HA-Spaltung im Western Blot untersucht (Abbildung 4-13a). Bei Verwendung von Trypsin konnte eine vollständige Spaltung des HA0 in die Untereinheiten HA1 und HA2 beobachtet werden. Aber auch ohne Trypsinzugabe lag ein kleiner Teil des HAs in der gespaltenen Form vor. Gleichzeitig wurde der Fortschritt der Virusinfektion anhand des HA-Anstiegs bestimmt. Der HA-Titer stieg in Abwesenheit von Trypsin deutlich langsamer und auch die finale Virusausbeute blieb geringer als mit Trypsin (Abbildung 4-13b).

4.5 Ergebnisse - Der Einfluss von Trypsin auf die IFN-Antwort

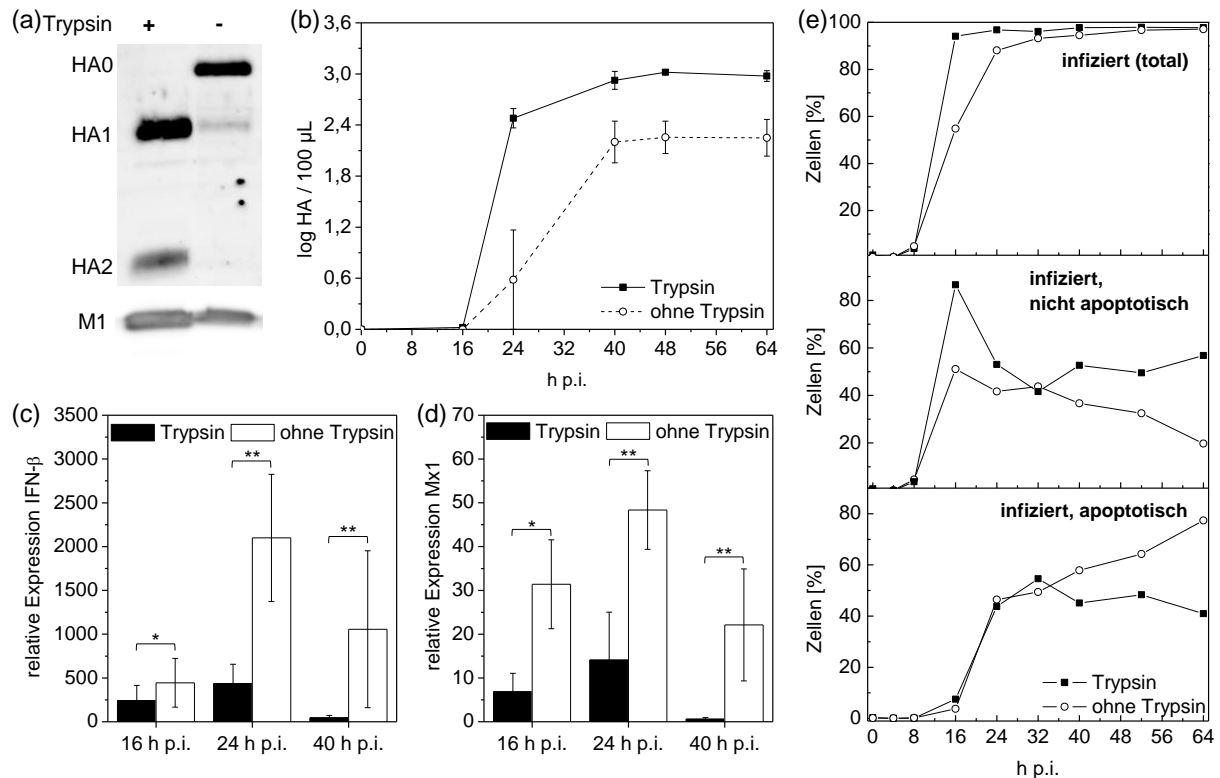


Abbildung 4-13: IFN-Antwort und Virusreplikation in An- und Abwesenheit von Trypsin. MDCK-Zellen wurden mit PR8-NIBSC (MOI 0,025) mit oder ohne Trypsinzugabe (5 U/mL) infiziert. (a) HA-Spaltung. Die Viren wurden 64 h p.i. mittels Ultrazentrifugation pelletiert und die HA-Spaltung im Western Blot analysiert. Virales M1 diente als Ladekontrolle. (b) Virusreplikation. Die Titer wurden mit dem HA-Assay bestimmt. (c) IFN-β Induktion. (d) Mx1 Aktivierung. Die Genexpression wurde durch qRT-PCR relativ zu einer nicht-infizierten Probe bestimmt. Dargestellt ist der Median \pm dem Median der absoluten Abweichungen von 9 unabhängigen Experimenten. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ Friedman Test. (e) Ausbreitung der Virusinfektion und Apoptose-Induktion. Die Zellen wurden mit Durchflusszytometrie analysiert. Die Unterscheidung zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen erfolgte anhand einer NP-Färbung und zwischen normalen und apoptotischen Zellen mit dem TUNEL-Assay. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen.

Als nächstes wurde die Aktivierung der IFN-Antwort unter diesen unterschiedlichen Bedingungen durch qRT-PCR-Messung von IFN-β und Mx1 analysiert. Mx1 diente hier vor allem als Marker für die extrazelluläre IFN-Aktivität. IFN-β und Mx1 waren in Abwesenheit von Trypsin beide über den gesamten Infektionsverlauf deutlich stärker induziert, was auf höhere Konzentrationen von extrazellulären IFN schließen lässt (Abbildung 4-13c+d). Da es in der Literatur Hinweise gibt, dass höhere IFN-Level mit stärkerer Apoptose korrelieren (Balachandran *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2010), wurde die Apoptoseinduktion ebenfalls bestimmt. Es wurde eine Doppelfärbung der Zellen unter Verwendung des TUNEL-Assays (TdT-mediated dUTP nick end labelling) und einer Immunfärbung gegen virales NP durchgeführt und die Zellen anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dadurch konnten die Ausbreitung der Infektion und die Apoptoseinduktion parallel erfasst werden. Mit Trypsin schritt die Infektion sehr schnell voran, so dass bereits 16 h p.i. mehr als 90 % der Zellen infiziert waren (Abbildung 4-13e). Weniger als 10 % der infizierten Zellen waren zu diesem Zeitpunkt apoptotisch. Erst nach 24 h konnte in etwa 50 % der Zellen Apoptose-Induktion nachgewiesen werden. In Gegenwart von Trypsin bestand also zwischen Infektion und Apoptose-Induktion ein klarer

zeitlicher Versatz. Ohne Trypsin war der Infektionsfortschritt langsamer. So waren nach 16 h p.i. erst 50 – 60 % der Zellen infiziert und die vollständige Infektion aller Zellen konnte erst 24-32 h p.i. beobachtet werden. Trotzdem waren nach 24 h p.i. bereits etwa 50 % der Zellen apoptotisch. Der zeitliche Versatz zwischen Infektion und Apoptose-Induktion war hier also im Vergleich zu Infektionen mit Trypsinzugabe kürzer. Weiterhin wurden in Abwesenheit von Trypsin im späteren Verlauf der Infektion deutlich höhere Anteile apoptotischer Zellen an der Zellpopulation beobachtet. Die stärkere IFN-Aktivierung bei Verzicht auf Trypsin korrelierte also tatsächlich mit einer schnelleren und stärkeren Apoptoseinduktion. Zusätzlich zeigen die Daten, dass die Zugabe von Trypsin für die hier verwendete MDCK-Zelllinie für die Ausbreitung der A/PR8/34-Infektion („multi-cycle replication“) bei niedriger MOI nicht unbedingt erforderlich wäre. Auch ohne Trypsin wurden alle Zellen infiziert. Allerdings verlangsamte die im Vergleich zu Trypsin ineffizientere HA-Spaltung die Ausbreitung der Infektion (Abbildung 4-13 a,b,e).

Zusammenfassend äußerte sich ein Verzicht auf Trypsin in einer deutlich stärkeren IFN- und Apoptoseinduktion, einer langsameren Ausbreitung der Infektion und geringeren Virusausbeuten. Trypsin reduzierte dagegen die IFN- und Apoptoseinduktion deutlich und bewirkte gleichzeitig ein schnelles Voranschreiten der Virusinfektion.

4.5.1.2 Hemmung der IFN-Antwort durch unterschiedliche Trypsinkonzentrationen

In der Literatur werden meist Masse-Trypsinkonzentrationen ($\mu\text{g}/\text{mL}$) statt Trypsinaktivitäten (U/mL) angegeben. Eine Umrechnung ist oft nicht möglich, da die spezifische Aktivität ($\text{U}/\mu\text{g}$) des verwendeten Trypsins in der Regel nicht berichtet wird. Ausgehend von den angegebenen Massekonzentrationen werden vor allem in virologischen Arbeiten (Penski *et al.*, 2011; Pleschka *et al.*, 2001; Walkiewicz *et al.*, 2011) und auch in einigen Studien zu zellkulturbasierter Herstellung von Influenza-Impfstoffen (Audsley & Tannock, 2005; Liu *et al.*, 2009; Makizumi *et al.*, 2008) geringere Trypsinkonzentrationen als in unserer Arbeitsgruppe (5 U/mL bzw. 4,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) verwendet. Daher sollte untersucht werden, ob auch niedrigere Trypsinkonzentrationen einen Einfluss auf die IFN-Signaltransduktion haben. MDCK-Zellen wurden unter Verwendung von 6 unterschiedlichen Trypsinkonzentrationen (0 – 5 U/mL bzw. 0 – 4,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) mit PR8-NIBSC, MOI=0,025 infiziert.

Zunächst wurden die HA-Spaltung mittels Western Blot und der HA-Verlauf untersucht (Abbildung 4-14 a+b). Für 5 U/mL und 1,575 U/mL Trypsin wurde vollständige HA-Spaltung beobachtet. Im Einklang damit wurden der schnellste HA-Anstieg und der höchste finale HA-Titer in diesem Experiment mit 5 U/mL Trypsin beobachtet. Im Vergleich dazu wurde mit 1,575 U/mL Trypsin derselbe finale HA-Titer erreicht und der HA-Anstieg war nur minimal verzögert. Bei 0,5 U/mL lag bereits der größere Anteil des HA als ungespaltenes HA0 vor, es waren aber noch deutlich mehr der Spaltprodukte HA1 und HA2 nachweisbar als in Abwesenheit von Trypsin. Der Einfluss dieser im Vergleich zu höheren Trypsinkonzentrationen weniger effizienten HA-Spaltung auf den HA-Titer war

4.5 Ergebnisse - Der Einfluss von Trypsin auf die IFN-Antwort

jedoch noch verhältnismäßig gering. Bei Trypsinkonzentrationen unter 0,5 U/mL konnte im Vergleich zu trypsinfreien Infektionen kein klarer Unterschied in der HA-Spaltung mehr beobachtet werden. Dementsprechend waren die HA-Verläufe mit 0,1575 U/mL Trypsin, 0,05 U/mL Trypsin und ohne Trypsinzugabe vollständig identisch. Unter diesen Bedingungen erfolgte der HA-Anstieg am spätesten und die finalen Titer waren die niedrigsten in diesem Experiment. Zusätzlich war das bei gleicher Trypsinkonzentration zu allen Probenahme-Zeitpunkten identische HA-Spaltverhältnis auffällig. Die Protease-Aktivität schien also über die Infektionsdauer nicht abzunehmen.

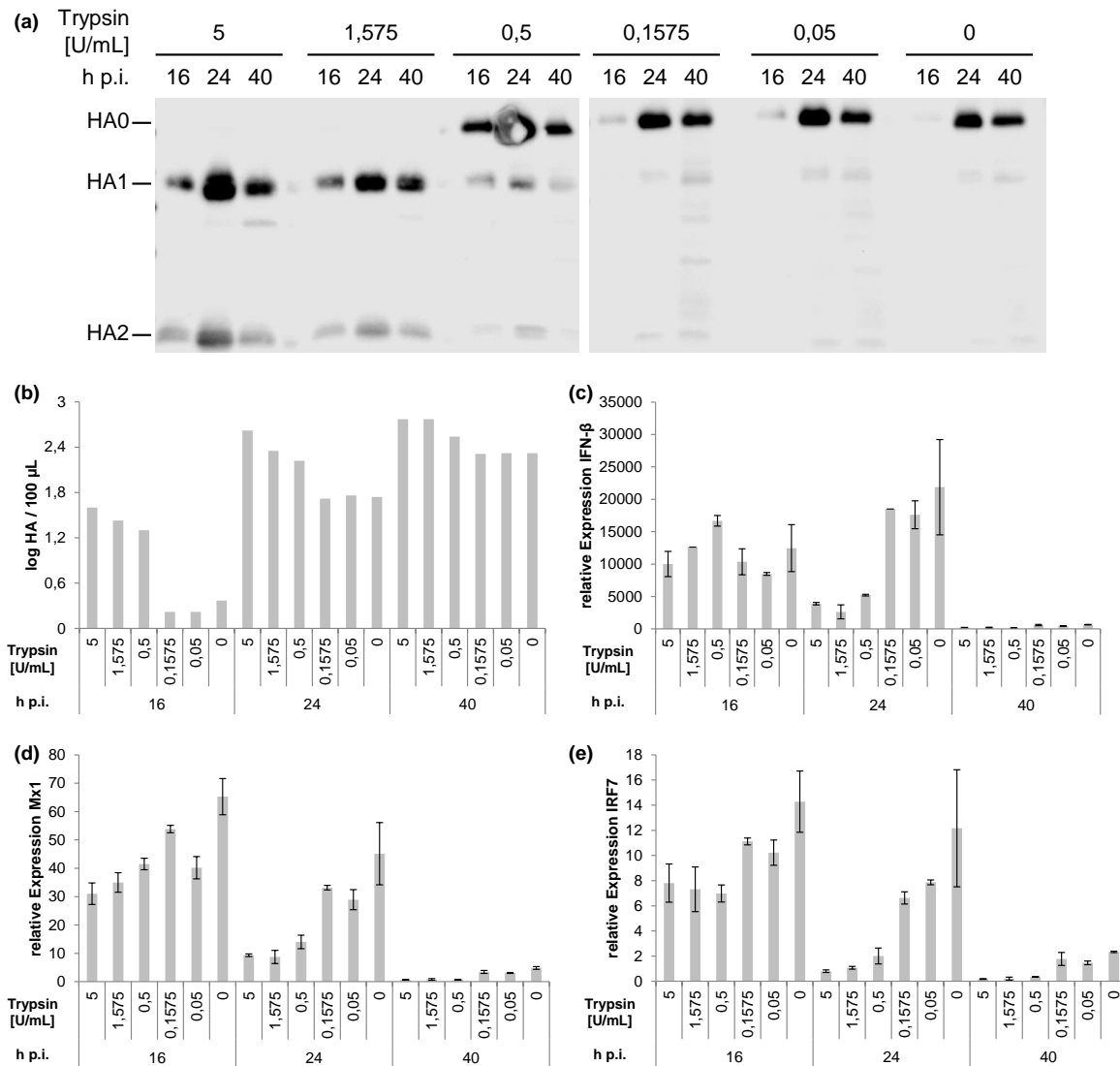


Abbildung 4-14: Einfluss unterschiedlicher Trypsinkonzentrationen auf die HA-Spaltung und die IFN-Antwort. MDCK-Zellen wurden mit PR8-NIBSC (MOI=0,025) unter Verwendung der angegebenen Trypsinkonzentrationen infiziert. (a) HA-Spaltung. Die Viren wurden mittels Ultrazentrifugation pelletiert und die HA-Spaltung anschließend im Western Blot analysiert. (b) HA-Titer. (c) IFN-β-Expression. (d) Mx1-Expression. (e) IRF7-Expression. Die Genexpression wurde durch qRT-PCR relativ zu einer nicht-infizierten Probe bestimmt. Pro Zustand und Zeitpunkt wurden jeweils 2 Wells einer 6-Well-Platte analysiert. In (c),(d) und (e) sind die Mittelwerte ± Standardabweichung der beiden Wells dargestellt. Für den HA Blot mussten zur Sicherstellung einer ausreichenden Proteinkonzentration die Überstände beider Wells vereint werden. Die HA-Titer wurden nach der Vereinigung bestimmt und haben daher keine Fehlerbalken. Es kann aber der Standardfehler des Assays (± 0,149 log HA / 100 µL) angenommen werden. Das Experiment wurde mit vergleichbarem Ergebnis einmal wiederholt.

Zur Beurteilung der IFN-Signaltransduktion wurden die Expression von IFN- β (Abbildung 4-14c), Mx1 (Abbildung 4-14d) und IRF7 (Abbildung 4-14e) mittels qRT-PCR analysiert. IRF7 ist, ebenso wie Mx1, ein ISG und wurde hier als weiterer Marker für IFN-Aktivität verwendet. Betrachtet man zunächst die Expression der drei Gene bei 16 h p.i., so waren beim IFN- β noch keine systematischen Unterschiede zwischen den sechs Trypsinkonzentrationen nachweisbar (vgl. Abbildung 4-14c). Für Mx1 und IRF7 konnten jedoch bereits geringfügig höhere Expressionswerte bei den drei niedrigeren Trypsinkonzentrationen (0,1575 U/mL, 0,05 U/mL und 0 U/mL) festgestellt werden. Dieser Trend bestätigte sich bei 24 h p.i. Hier war im Vergleich zu den drei höheren Trypsinkonzentrationen die Expression aller drei Gene für die drei niedrigeren Trypsinkonzentrationen deutlich stärker. Interessanterweise waren aus bislang unbekanntem Gründen die Expressionswerte für alle drei Gene jeweils innerhalb der drei hohen und innerhalb der drei niedrigen Konzentrationen relativ vergleichbar. Bei 40 h p.i. konnte dieser Trend ebenfalls beobachtet werden, allerdings wird zu diesem Zeitpunkt die Genexpression durch das beginnende Absterben der Zellen beeinflusst, so dass die Werte insgesamt im Vergleich zu 24 h p.i. geringer ausfielen.

Eine Trypsinkonzentration von 0,5 U/mL (entspricht 0,45 $\mu\text{g/mL}$) reduzierte hier die IFN-Antwort während der Infektion vergleichbar effektiv wie eine 10-fach höhere Konzentration. Die Ergebnisse aus 4.5.1.1 wurden somit bestätigt. Gleichzeitig war für die vollständige HA-Spaltung nur eine Trypsinkonzentration von 1,575 U/mL notwendig. Für die effektive Reduktion der IFN-Antwort war also eine geringere Trypsinkonzentration ausreichend als für die HA-Spaltung erforderlich war.

4.5.1.3 Aktivierung des IFN-induzierten, antiviralen Status in Gegenwart und Abwesenheit von Trypsin auf Proteinebene

Bislang konnte mittels qRT-PCR gezeigt werden, dass in Abwesenheit von Trypsin eine stärkere Induktion IFN-stimulierter Gene erfolgt. Dieses Ergebnis sollte mit einer unabhängigen Methode bestätigt werden. Dazu wurde die Aktivierung von Stat2 und Mx1 für PR8-NIBSC, PR8-RKI und WSN33 (MOI 0,025) in Anwesenheit und Abwesenheit von Trypsin im Western Blot untersucht. Infektionen mit PR8-NIBSC führen zu einer relativ frühen Apoptose-Induktion. Infolgedessen lösen sich die Zellen von der Oberfläche der Kulturgefäße ab. Um ausreichende Proteinkonzentrationen für den Western Blot sicherzustellen, wurden daher für PR8-NIBSC bereits 16 und 24 h p.i. Proteinproben genommen. Bei Infektionen mit PR8-RKI und WSN33 lösen sich die Zellen erst deutlich später von der Oberfläche, so dass hier spätere Zeitpunkte (24 und 30 h p.i.) betrachtet werden konnten.

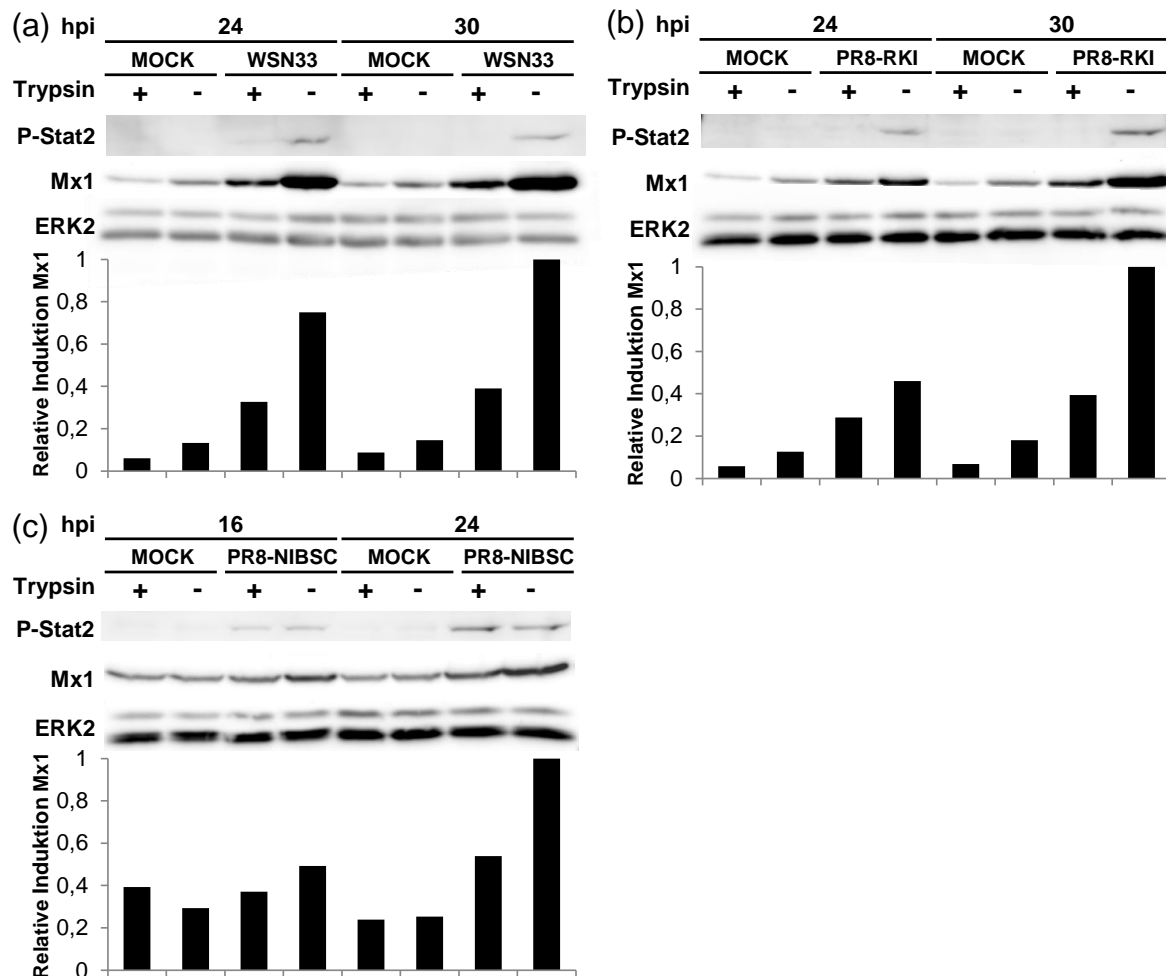


Abbildung 4-15: Aktivierung von STAT2 und Mx1 bei Virusinfektion in Anwesenheit und Abwesenheit von Trypsin. MDCK-Zellen wurden mit WSN33 (a), PR8-RKI (b) und PR8-NIBSC (c) mit oder ohne Zugabe von Trypsin bei MOI 0,025 infiziert. Die Aktivierung von Stat2 und Mx1 wurde mittels Western Blot analysiert. ERK2 diente als Ladekontrolle. Bei der densitometrischen Auswertung der Mx1-Expression wurde das ERK2-Signal zur Normalisierung verwendet. Die Mx1-Expression ist relativ zur jeweils maximalen Expression für den angegebenen Virusstamm dargestellt (auf 1 gesetzt).

Im Western Blot konnte für die schwach IFN-induzierenden Stämme PR8-RKI und WSN33 nur in Abwesenheit von Trypsin, eine Phosphorylierung von STAT2 beobachtet werden (Abbildung 4-15a+b). Da der JAK/STAT-Signalweg direkt durch extrazelluläres IFN aktiviert wird, muss in Abwesenheit von Trypsin mehr IFN im Medium vorgelegen haben. Die Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges induziert außerdem die Transkription der ISGs. Dementsprechend wurde für PR8-RKI und WSN33 zu beiden Messzeitpunkten in Abwesenheit von Trypsin eine höhere Mx1-Induktion beobachtet. Für den verhältnismäßig stark IFN-induzierenden PR8-NIBSC waren die Mx1-Proteinlevel 16 h p.i. noch vergleichbar (Abbildung 4-15c). 24 h p.i. lag in Abwesenheit von Trypsin aber ebenfalls sichtbar mehr Mx1 vor. Die Aktivierung von STAT2 war dagegen für diesen Stamm mit und ohne Trypsin vergleichbar. Eine stärkere Mx1-Aktivierung ohne gleichzeitig stärkere Phosphorylierung von STAT2 erscheint zunächst widersprüchlich. Die Phosphorylierung von STAT2 vermittelt jedoch nur einen Einblick in das aktuell zum Zeitpunkt der Probenahme extrazellulär vorliegende IFN-Level. Mx1 akkumuliert dagegen in Reaktion auf IFN in den Zellen, so dass im Mx1-Proteinlevel der Verlauf der

IFN-Konzentration bis zum Zeitpunkt der Probenahme integriert wird. Dementsprechend müssen für den vergleichsweise stark IFN-induzierenden PR8-NIBSC gemäß der Phosphorylierung von STAT2 zu den zwei Messzeitpunkten mit und ohne Trypsin zwar ähnliche IFN-Mengen im Medium vorgelegen haben. Das in Abwesenheit von Trypsin stärkere Mx1-Signal belegt allerdings, dass ohne Trypsinzusatz über den Verlauf der Infektion mehr IFN gebildet wurde.

Die höhere Aktivierung IFN-stimulierter Gene in Abwesenheit von Trypsin konnte damit auch auf Proteinebene bestätigt werden. Dieser Trend war allerdings für PR8-NIBSC weniger ausgeprägt als für die verhältnismäßig schwach IFN-induzierenden Stämme PR8-RKI und WSN33. Der reduzierende Einfluss von Trypsin auf die IFN-Antwort schien also bei stärker IFN-aktivierenden Stämmen Grenzen zu haben.

4.5.2 Die Ursache für die Reduktion des IFN-Antwort in Gegenwart von Trypsin

4.5.2.1 Proteolytischer Abbau von IFN durch Trypsin

Bereits 1959 wurde bei IFN-Bioassays beobachtet, dass IFN durch Trypsinbehandlung seine antivirale Aktivität verliert (Isaacs & Burke, 1959). Bislang wurde aber nicht untersucht, ob durch die verhältnismäßig geringe, im Impfstoffprozess verwendete Trypsinkonzentration ein nennenswerter IFN-Abbau erfolgt. Dies sollte hier experimentell überprüft werden. IFN-haltiges, virus-freies Medium von delNS1-infizierten MDCK-Zellen (conditioned medium: CM) oder Medium von nicht-infizierten Zellen (MOCK-CM) wurde mit oder ohne Zugabe von 5 U/mL Trypsin für 7 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Trypsininkubation wurden die Proteine im Medium mit TCA gefällt und mittels SDS-PAGE analysiert.

Unbehandeltes CM und MOCK-CM zeigten beide ein komplexes Bandenmuster, unterschieden sich jedoch nicht wesentlich (Abbildung 4-16a). Wahrscheinlich wurden die Unterschiede zwischen dem Medium infizierter und nicht-infizierter Zellen durch den Peptongehalt (0,2 %) des verwendeten Zellkulturmediums überlagert. Trypsin reduzierte aber in CM und MOCK-CM die Anzahl detektierbarer Banden erheblich und veränderte das Bandenmuster. Für glykosiliertes Hunde-IFN- β wurde ein Molekulargewicht von ca. 34 kDA erwartet (Nishikawa *et al.*, 2000). Es konnte jedoch keine Bande eindeutig als IFN- β identifiziert werden. Daher wurde als nächstes ein Western Blot gegen Hunde-IFN- β durchgeführt (Abbildung 4-16b). In unbehandeltem CM trat für IFN- β eine klare Bande auf. Diese Bande war für trypsinbehandeltes CM nicht mehr nachweisbar und fehlte auch im MOCK-CM. MDCK-IFN- β wird also im Infektionsmedium durch 5 U/mL Trypsin effektiv abgebaut. Um nachzuweisen, dass dies auch zu einem Verlust der IFN-Aktivität führt, wurde im Folgenden der Einfluss der Trypsinzugabe auf die Induktion IFN-stimulierter Gene durch CM untersucht. Diesmal wurde CM mit unterschiedlichen Trypsinkonzentrationen (0 – 4,5 μ g/mL bzw. 0 – 5 U/mL) für 7 h bei 37 °C inkubiert. Damit sollte der für die Impfstoffproduktion relevante Konzentrationsbereich

abgedeckt werden (Genzel *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2008; Makizumi *et al.*, 2008; Pau *et al.*, 2001; Tree *et al.*, 2001). Zusätzlich wurde in diesem Experiment eine Kontrolle mit 5 U/mL TPCK-Trypsin mitgeführt, um eine gegebenenfalls vorhandene Chymotrypsin-Restaktivität in dem sonst verwendeten, pankreatischen Trypsin als Ursache für den IFN-Abbau ausschließen zu können. Im Anschluss an die Inkubation wurden MDCK-Zellen für 3 h mit dem CM stimuliert und die Mx1-Expression über qRT-PCR relativ zu MOCK-CM stimulierten Zellen bestimmt. Unbehandeltes CM bewirkte eine 50-fache Aktivierung der Mx1-Expression (Abbildung 4-16c). Bei Zusatz von 5 U/mL Trypsin wurde jedoch nur noch eine 4-fache Aktivierung der Mx1-Expression beobachtet. Ein vergleichbares Ergebnis trat auch mit 5 U/mL TPCK-Trypsin ein. Selbst geringere Trypsinkonzentrationen senkten die Mx1-Expression noch erheblich, wenn auch nicht so effektiv wie 5 U/mL. Die typischerweise in der Impfstoff-Produktion verwendeten Trypsinkonzentrationen waren also ausreichend, um IFN-Aktivität durch proteolytischen IFN-Abbau deutlich zu inhibieren.

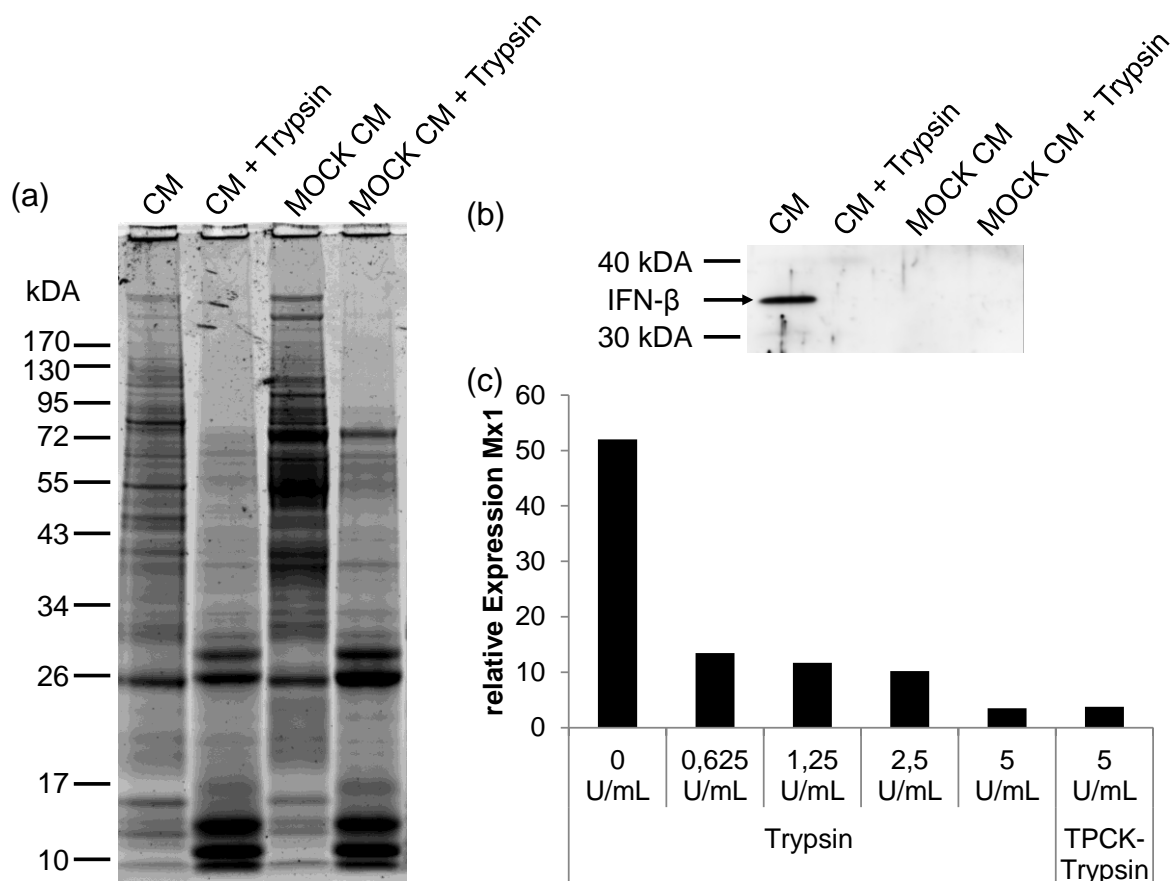


Abbildung 4-16: Proteolytischer Abbau von MDCK-IFN durch Trypsin. IFN-haltiges CM von deINS1-infizierten MDCK-Zellen oder MOCK-CM von uninfizierten Zellen wurde für 7 h mit oder ohne Zugabe von 5 U/mL Trypsin bei 37 °C inkubiert. (a) Einfluss der Trypsinzugabe auf die Proteine im Medium. Die Proteine wurden mit TCA gefällt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Färbung des Gels erfolgte mit SYPRO-Ruby. (b) Einfluss der Trypsinzugabe auf IFN- β . Es wurde ein Western Blot unter Verwendung eines Kaninchen-Antiserums gegen Hunde-IFN- β durchgeführt. (c) Einfluss auf die Induktion IFN-stimulierter Gene. IFN-haltiges CM wurde für 7 h bei 37 °C mit den angegebenen Trypsinkonzentrationen inkubiert. Anschließend wurden MDCK-Zellen für 3 h mit dem CM stimuliert und die Mx1-Expression mittels qRT-PCR bestimmt. Mit trypsinfreiem MOCK-CM stimulierte Zellen dienten als Kalibrator (auf 1 gesetzt) für die Berechnung der relativen Mx1 Expression. Die hier dargestellten Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

4.5.2.2 Der Einfluss der Infektionsdynamik auf die IFN-Induktion

Unabhängig von proteolytischem IFN-Abbau könnte auch die trypsinvermittelte, schnelle Virusreplikation zu der schwächeren IFN-Antwort in Gegenwart von Trypsin beitragen (vgl. Abbildung 4-17). Die Stärke der IFN-Induktion wird während der Infektion von zwei konkurrierenden Prozessen bestimmt. Einerseits inhibieren Influenza-Viren in infizierten Zellen die Induktion von IFN und des antiviralen Status durch Expression von NS1 und weitere Mechanismen (vgl. 2.3.4). Andererseits können die Zellen diesen viralen Gegenmaßnahmen zur antiviralen Antwort durch Aktivierung positiver Feedback-Mechanismen im IFN-System zuvorkommen (vgl. 2.3.2). Die Vermutung lag daher nahe, dass eine schnelle Ausbreitung der Virusinfektion in Gegenwart von Trypsin der Aktivierung positiver Feedback-Mechanismen im IFN-System vorbeugt und dadurch die IFN-Antwort reduziert.

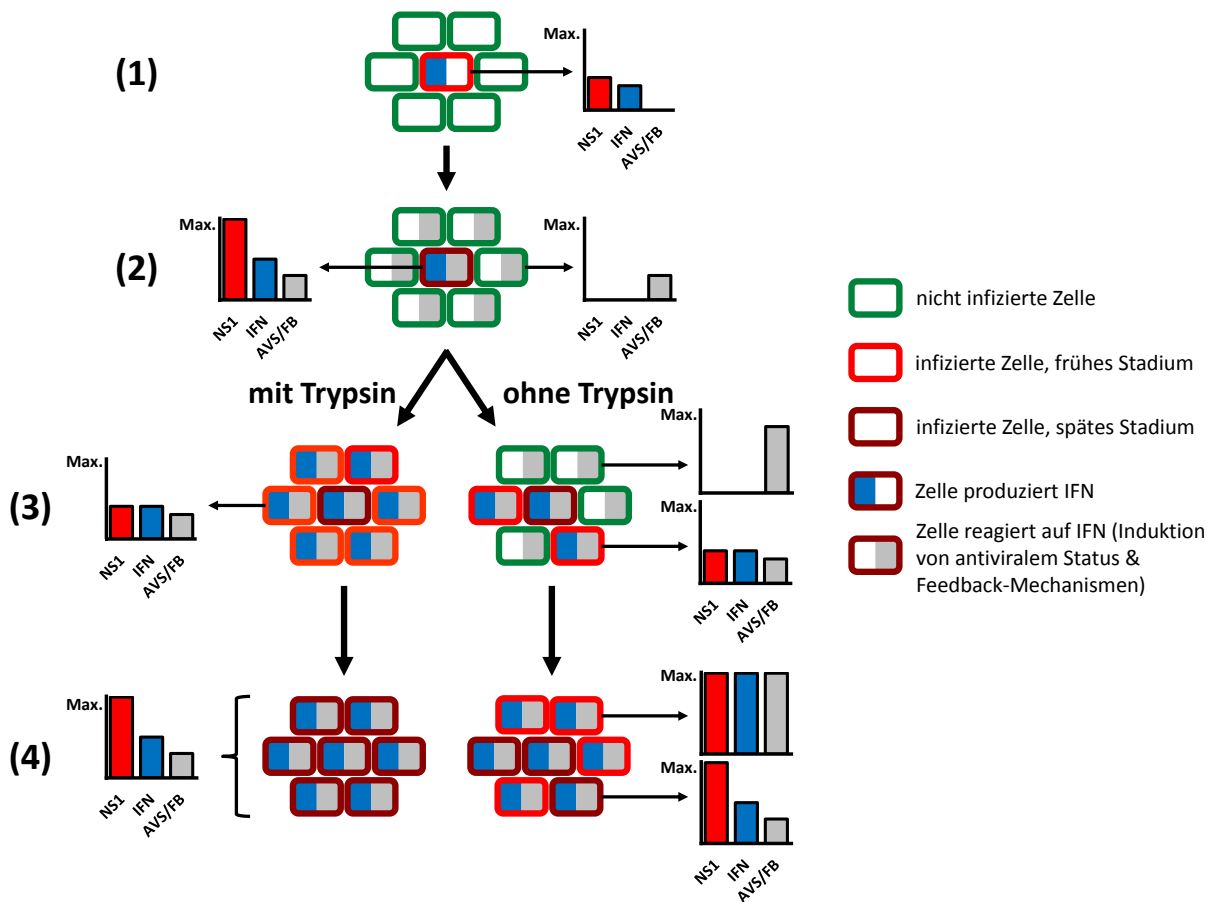


Abbildung 4-17: Potentieller Einfluss der Infektionsdynamik auf die Stärke der IFN-Antwort. Vereinfachte schematische Darstellung. **(1)** Eine Zelle wird mit Influenza-Viren infiziert, wodurch die IFN-Antwort aktiviert wird. **(2)** Sekretiertes IFN induziert auto- und parakrin den Aufbau eines antiviralen Zustands (AVS). Einige dabei aktivierte Gene (IRF7, RIG-I, vgl. 2.3.2) tragen zu einer positiven Feedback-Schleife (FB) bei, die die Aktivierung des IFN-Systems weiter verstärkt. In der infizierten Zelle limitiert NS1 die Induktion von IFN und antiviralem Status. **(3)** Mit Trypsin breitet sich die Virusinfektion schnell auf alle Zellen aus. Neu-infizierten Zellen tragen zur IFN-Antwort bei, werden dabei jedoch durch neu-produziertes NS1 gestört. Ohne Trypsin erfolgt die Ausbreitung der Infektion langsamer. Ein größerer Teil der Zellen bleibt im nicht-infizierten Zustand und wird folglich beim Aufbau des antiviralen Zustands und der Aktivierung positiver Feedbackelemente des IFN-Systems nicht beeinträchtigt. **(4)** Folglich bleibt in Abwesenheit von Trypsin einem Teil der Zellen ausreichend Zeit, die positiven Feedbackelemente des IFN-Systems vollständig zu etablieren. Werden diese Zellen infiziert, können die Feedback-Mechanismen der IFN-inhibierenden Wirkung von NS1 entgegenwirken, so dass es trotz NS1 zu einer starken IFN-Expression kommt. Mit Trypsin steht die Zeit zur vollständigen Etablierung der positiven Feedbackelemente des IFN-Systems aufgrund der schnellen Ausbreitung der Virusinfektion nicht zur Verfügung, so dass die IFN-Antwort insgesamt geringer ausfällt. Ein weiterer Einfluss von Trypsin auf die IFN-Antwort durch proteolytischen IFN-Abbau wurde hier aus Gründen der Anschaulichkeit nicht berücksichtigt.

4.5.2.2.1 Einfluss einer Beschleunigung der Infektionsdynamik in Abwesenheit von Trypsin auf die IFN-Antwort

Um zu untersuchen, ob trypsinvermittelte schnelle Ausbreitung der Infektion die Aktivierung der IFN-Antwort reduziert, wurde Trypsin in einem ersten Schritt durch die Transmembran-Protease Serine 2 (TMPRSS2) ersetzt. Überexpression von TMPRSS2 in MDCK-Zellen ermöglicht die intrazelluläre Spaltung von neu-synthetisiertem HA (Böttcher-Friebertshauer *et al.*, 2010). Diese Autoren fanden jedoch keine extrazelluläre TMPRSS2-Aktivität, so dass ein Abbau von sekretierten IFN durch TMPRSS2 nicht zu erwarten war. Dies sollte zunächst überprüft werden. MDCK-Zellen wurden mit TMPRSS2 bzw. der inaktiven Mutante TMPRSS2(S441A) (Böttcher *et al.*, 2006) elektroporiert. Um die HA-Spaltung durch TMPRSS2 beurteilen zu können, wurden diese Zellen 24 h nach der Infektion bei MOI 0,025 mit PR8-RKI infiziert. Im Western Blot (Abbildung 4-18a) zeigte sich in Abwesenheit von Trypsin eine deutliche Verbesserung der HA-Spaltung durch TMPRSS2. Mit Trypsin war die HA-Spaltung aber noch deutlich effektiver. Um einen IFN-Abbau ausschließen zu können, wurden die TMPRSS2- oder TMPRSS2(S441A)-transfizierten Zellen 24 h nach der Elektroporation für 16 h mit CM von delNS1-infizierten MDCK-Zellen bei 37 °C inkubiert. Das Medium wurde im Anschluss auf frische Zellen gegeben und die Mx1-Expression nach 3 und 8 h Stimulation bestimmt (Abbildung 4-18b). Im Gegensatz zu Trypsin fand durch TMPRSS2 kein messbarer IFN-Abbau statt. Es konnte also bestätigt werden, dass TMPRSS2 zwar HA spaltet, jedoch nicht extrazelluläres IFN abbaut.

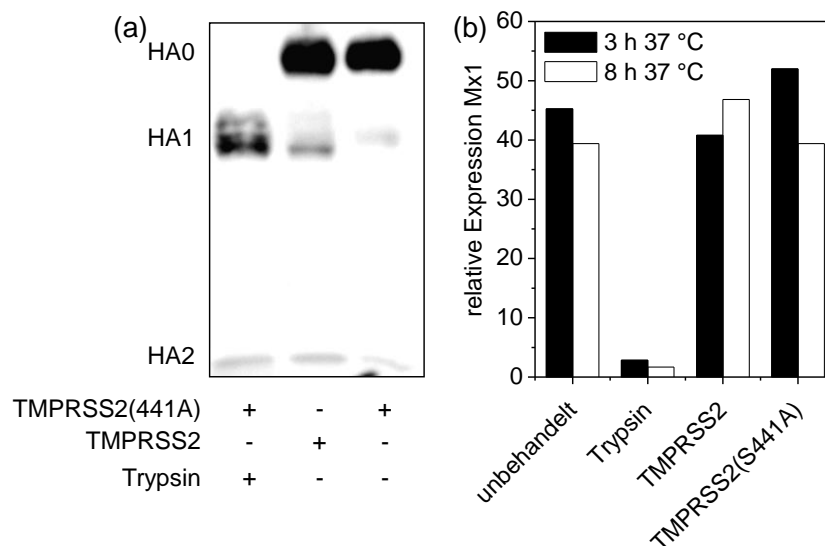


Abbildung 4-18: Einfluss von TMPRSS2 auf die HA-Spaltung und extrazelluläres IFN- β . MDCK-Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für TMPRSS2 oder eine inaktive Mutante, TMPRSS2(S441A) transfiziert. (a) HA-Spaltung. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit PR8-RKI mit oder ohne Trypsinzugabe infiziert (MOI 0,025). 64 h p.i. wurden die Viren mittels Ultrazentrifugation pelletiert und die HA-Spaltung im Western Blot bestimmt. (b) Proteolytische Degradation von IFN. IFN-haltiges CM wurde mit Trypsin versetzt, auf TMPRSS2- oder TMPRSS2(S441A)-transfizierte Zellen (24 h vorher transfiziert) gegeben oder unbehandelt gelassen. Das CM wurde für 16 h bei 37 °C inkubiert und anschließend für die Stimulation frischer MDCK-Zellen verwendet. Nach 3 und 8 h Stimulation wurde die Mx1-Expression relativ zu nicht-stimulierten Zellen bestimmt.

Im Folgenden sollte TMPRSS2 nun genutzt werden, um den Einfluss einer schnellen Ausbreitung der Virusinfektion auf die IFN-Antwort zu ermitteln. Dazu wurden TMPRSS2- und TMPRSS2(S441A)-transfizierte Zellen mit PR8-RKI (MOI 0,025) ohne Trypsinzugabe infiziert. PR8-RKI wurde hier gewählt, da dieser Stamm nur eine schwache IFN-Induktion zeigt. Damit sollte neben der Effektivität der HA-Spaltung eine starke IFN-Antwort als zusätzlicher Einflussfaktor auf die Infektionsdynamik ausgeschlossen werden. Eine zusätzliche Infektion von TMPRSS2(S441A)-transfizierten Zellen mit Trypsin diene als Kontrolle.

Zur Beurteilung der Infektionsdynamik wurde der HA-Verlauf aufgenommen. In Abwesenheit von Trypsin führte TMPRSS2 zu einer schnelleren Infektionsdynamik (Abbildung 4-19a). Am schnellsten erfolgte die Virusinfektion jedoch mit Trypsin. Auffällig war dabei, dass bei Verwendung von Trypsin in TMPRSS2(S441A)-transfizierten Zellen ein etwas schnellerer HA-Anstieg und höherer finaler HA-Titer beobachtet wurde als in Zellen, die funktionales TMPRSS2 exprimierten. Die Zellzahlen waren zum Zeitpunkt der Infektion für TMPRSS2 und inaktive Mutante identisch (nicht gezeigt). Wird also unabhängig von TMPRSS2 eine effektive HA-Spaltung sichergestellt, beeinflusst die Überexpression von funktionalem TMPRSS2 die Virusproduktion scheinbar negativ. In Abwesenheit von Trypsin überwiegt dagegen deutlich der positive Einfluss der effektiveren, TMPRSS2-vermittelten HA-Spaltung.

Die IFN-Antwort wurde durch qRT-PCR Messung von IFN- β und Mx1 erfasst. Infektionen von TMPRSS2- und TMPRSS2(S441A)-transfizierten Zellen in Gegenwart von Trypsin unterschieden sich hierbei nicht wesentlich und zeigten die schwächste IFN-Induktion in diesem Experiment. In Abwesenheit einer Protease war die IFN-Antwort am stärksten (Abbildung 4-19 a+b). Verglichen zu Protease-freien Infektionen fiel die Induktion von IFN- β in TMPRSS2-transfizierten Zellen geringer aus (Abbildung 4-19b). Gleichzeitig erfolgte die Mx1-Aktivierung mit TMPRSS2 etwas verzögert, jedoch war das maximal erreichte Expressionslevel (24 h p.i.) nur marginal geringer als in Protease-freien Infektionen (Abbildung 4-19c). In der späten Phase der Infektion (40 h p.i.) wurde mit TMPRSS2 eine erheblich geringere Mx1-Expression beobachtet. Allerdings war zu diesem Zeitpunkt mit TMPRSS2 bereits der maximale HA-Titer erreicht und ein Großteil der Zellen im Überstand (nicht gezeigt), wogegen ohne Protease der HA-Titer bis 48 h noch stieg und die Zellen noch überwiegend adhärent waren. Zusammenfassend lässt sich damit sagen, dass eine schnelle, TMPRSS2-vermittelte Ausbreitung der Infektion zwar die primäre Aktivierung von IFN- β in Abwesenheit von Trypsin klar reduziert, die maximale Induktion von ISGs jedoch nur wenig verringert. Vergleichbar geringe Expressionsniveaus wie in Gegenwart von Trypsin konnten mit TMPRSS2 nicht erreicht werden. Damit liegt der Schluss nahe, dass vor allem der proteolytische Abbau von IFN für die geringe Aktivierung der IFN-Antwort in Gegenwart von Trypsin verantwortlich war.

4.5 Ergebnisse - Der Einfluss von Trypsin auf die IFN-Antwort

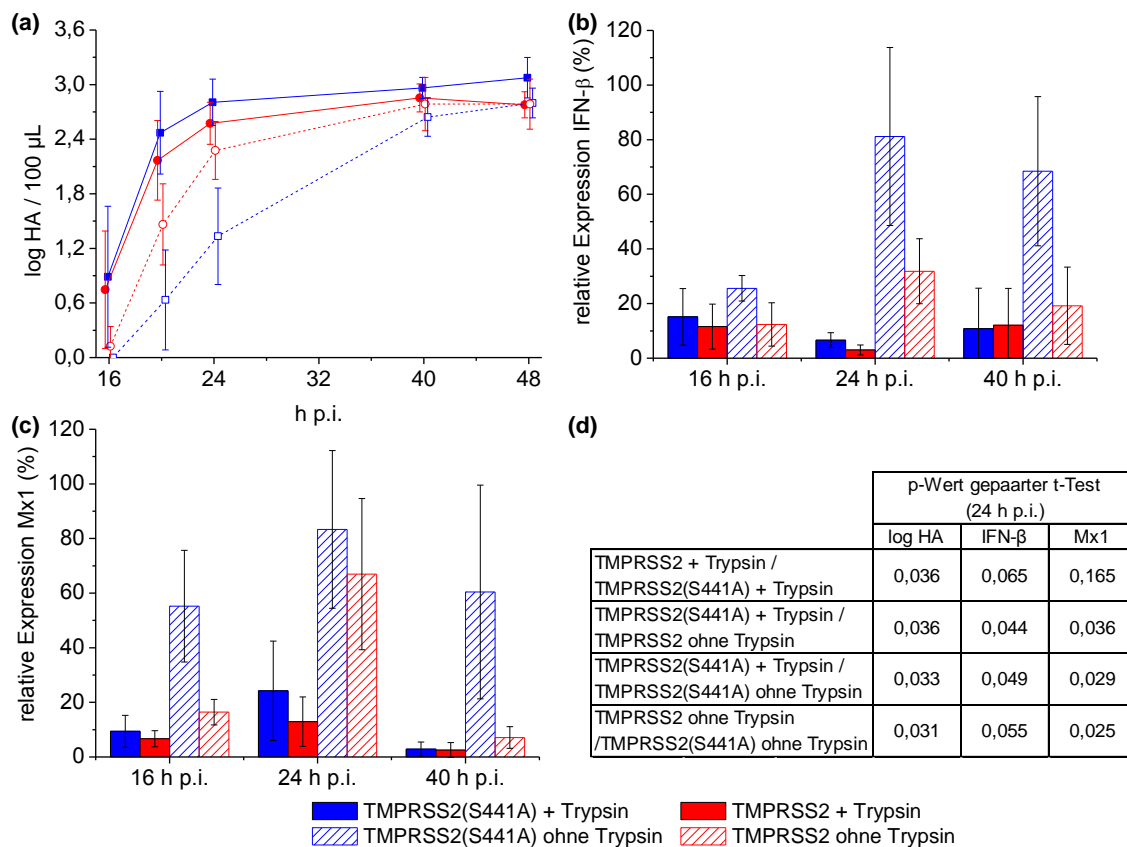


Abbildung 4-19: Trypsinunabhängige Beschleunigung der Infektionsausbreitung durch TMPRSS2. MDCK-Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für TMPRSS2 oder eine inaktive Mutante, TMPRSS2(S441A) transfiziert und 24 h später mit PR8-RKI mit oder ohne Trypsinzugabe infiziert (MOI 0,025). (a) HA-Verlauf. Die Titer wurden nach 16, 20, 24 und 40 h p.i. bestimmt. Um die Fehlerbalken zuordnen zu können, wurden die Werte im Bereich $\pm 0,3$ h p.i. um den jeweiligen Messzeitpunkt versetzt dargestellt. (b) IFN- β Expression. (c) Mx1 Expression. Die Genexpression wurde mit qRT-PCR gemessen und jeweils auf das maximal beobachtete Level normalisiert (auf 100 % gesetzt). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von drei unabhängigen Experimenten. (d) Signifikanz der Unterschiede. Es wurde ein paarweiser t-Test für die Ergebnisse der drei Experimente zum Zeitpunkt 24 h p.i. durchgeführt.

4.5.2.2.2 Einfluss einer verlangsamten Infektionsdynamik in Anwesenheit von Trypsin auf die IFN-Induktion

Um die Ergebnisse des vorangegangenen Experiments zu bestätigen, wurde in einem komplementären Ansatz der Einfluss einer Verlangsamung der Infektionsausbreitung in Anwesenheit von Trypsin auf die IFN-Antwort untersucht. Bei langsamerem Infektionsfortschritt steht mehr Zeit für die Aktivierung positiver Feedback-Mechanismen des IFN-Systems zur Verfügung, so dass es zu einer stärkeren IFN-Induktion kommen könnte. Verzicht auf Trypsin verlangsamt die Ausbreitung der Virusinfektion durch weniger effiziente HA-Spaltung. Um eine vergleichbare Verzögerung auch bei Trypsinzugabe zu erreichen, wurden Infektionen unter Zugabe des Neuraminidase-Inhibitors Zanamivir durchgeführt. Neuraminidase-Inhibition verlangsamt ebenfalls die Ausbreitung der Infektion, da sich neugebildete Viren unter diesen Bedingungen nicht von der Oberfläche infizierter Zellen lösen können (Palese *et al.*, 1974; von Itzstein, 2007). MDCK-Zellen wurden also mit WSN33 (MOI 0,025) mit Trypsin (Kontrolle), ohne Trypsin sowie unter Zugabe von Trypsin und 60 nM Zanamivir infiziert. WSN33 hatte in Vorexperimenten bei dieser Konzentration eine starke

Anfälligkeit gegenüber Zanamivir gezeigt (Daten nicht gezeigt). Zunächst wurde der HA-Verlauf aufgenommen (Abbildung 4-20a). Verzicht auf Trypsin oder die Zugabe von Zanamivir verzögerten den Anstieg der HA-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle nahezu identisch. Im nächsten Schritt wurde die IFN-Antwort durch qRT-PCR-Messung von IFN- β und Mx1 untersucht. Die Expressionslevel beider Gene blieben in der Kontrolle mit Trypsin auch in diesem Experiment wieder relativ gering, wohingegen ohne Trypsin deutlich höhere Werte beobachtet wurden (Abbildung 4-20 b+c). Die Zugabe von Zanamivir führte zwar im Vergleich zur Kontrolle 24 und 40 h p.i. zu einer stärkeren Aktivierung von IFN- β (Abbildung 4-20b), was aber nur in einer geringfügig höheren Mx1-Expression resultierte (Abbildung 4-20c). Die hohen Expressionswerte in Abwesenheit von Trypsin wurden aber auch unter Zusatz von Zanamivir für IFN- β nicht erreicht und für Mx1 klar unterschritten. Damit schien in Anwesenheit von Trypsin der proteolytische IFN-Abbau unabhängig von der Infektionsdynamik das Level der IFN-Aktivierung gering zu halten.

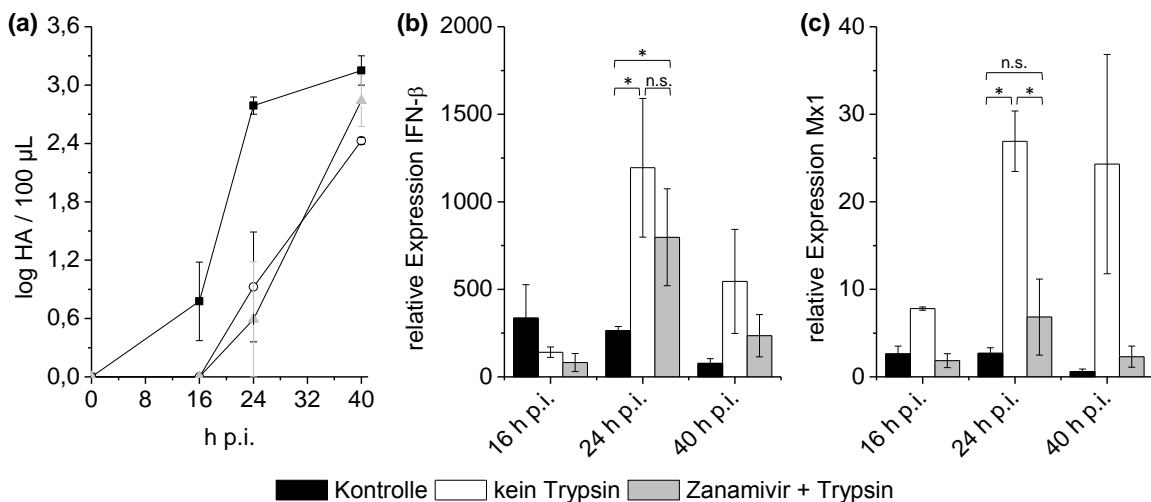


Abbildung 4-20: IFN-Aktivierung bei Verzögerung der Infektionsdynamik in Gegenwart von Trypsin durch Zanamivir. MDCK-Zellen wurden mit WSN33 (MOI 0.025) in Gegenwart von Trypsin, Trypsin + 60 nM Zanamivir oder ohne Trypsin und Zanamivir infiziert. (a) HA-Verlauf. (b) IFN- β Expression. (c) Mx1 Expression. Die Genexpression wurde durch qRT-PCR relativ zu einer nicht-infizierten Probe bestimmt. Dargestellt ist der Median \pm dem Median der absoluten Abweichungen von 4 unabhängigen Experimenten. (*) $p < 0.05$ Friedman Test

4.5.3 Der Einfluss von Trypsin auf das inhibitorische Potential des IFN-induzierten antiviralen Status

4.5.3.1 Die Bedeutung von Trypsin für die Replikation von delNS1 in MDCK-Zellen

Bislang wurde der Einfluss von Trypsin auf die Stärke der IFN-Induktion bei der Virusinfektion untersucht. Dabei wurde deutlich, dass Trypsin die IFN-Antwort reduziert. Die vorangegangenen Experimente erlauben jedoch keine Aussage darüber, ob dies auch Auswirkungen für die Virusproduktion hat. Um diese Frage zu beantworten, wurde in einem ersten Ansatz die Bedeutung von Trypsin für das Wachstum von PR8-delNS1 untersucht. Dieser Stamm wurde zuvor auch in MDCK-Zellen als stark IFN-sensitiv beschrieben (Egorov *et al.*, 1998; García-Sastre *et al.*, 1998), zeigte

4.5 Ergebnisse - Der Einfluss von Trypsin auf die IFN-Antwort

in den Experimenten dieser Arbeit jedoch ein vergleichbar robustes Wachstum in Gegenwart von Trypsin (vgl. 4.4). Möglicherweise war die hier verwendete, auf maximales Viruswachstum optimierte Trypsinkonzentration (5 U/mL) für diesen Unterschied verantwortlich. Entsprechend sollte die Replikation von PR8-delNS1 in Gegenwart und Abwesenheit von Trypsin verglichen werden. Zusätzlich wurde die IFN-Antwort trypsinunabhängig durch Transfektion viraler IFN-Antagonisten (NS1 oder P) inhibiert. Falls Trypsin also den inhibitorischen Einfluss der IFN-Antwort auf die Virusreplikation reduziert, sollte dieser Stamm von Trypsinzugabe oder Antagonisten-Transfektion in ähnlichem Maße profitieren.

MDCK-Zellen wurden also mit den Expressionsvektoren für NS1, P oder dem Leervektor (Kontrolle) elektroporiert und 24 h später mit PR8-delNS1 mit und ohne Trypsin infiziert (MOI 0,025). Als Maß für die Virusreplikation wurden die HA-Titer, sowie die Transkript-Level des viralen M1 bestimmt. Die IFN-Antwort wurde durch qRT-PCR-Messung von IFN- β und Mx1 erfasst.

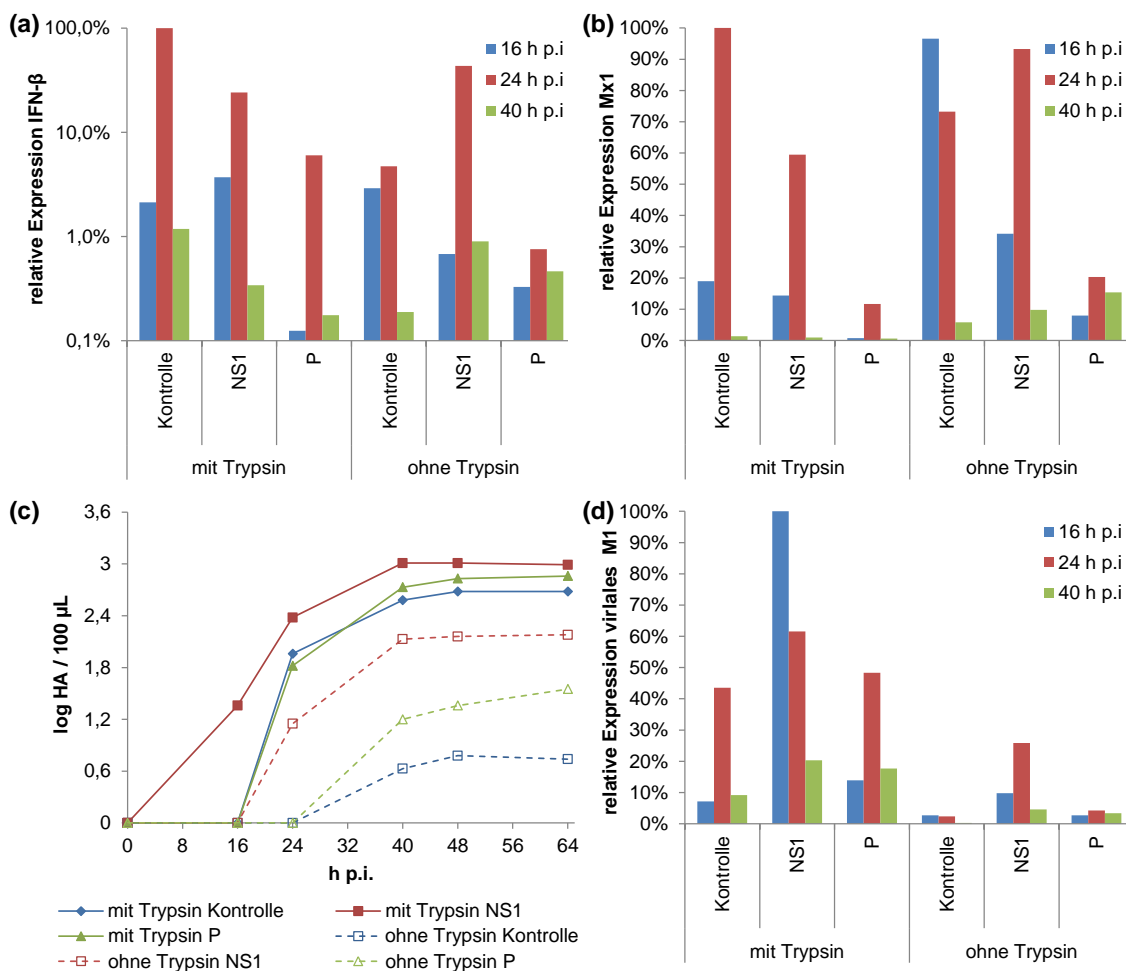


Abbildung 4-21: Der Effekt von Trypsin auf das Wachstum von PR8-delNS1 in MDCK-Zellen. MDCK-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für PR8-NS1, Rabies-Virus P bzw. dem Leervektor transfiziert und 24 h später mit delNS1, MOI 0,025 mit oder ohne Trypsin infiziert. (a) IFN- β Expression. (b) Mx1 Expression. (c) HA-Verlauf. (d) Expression von viralem M1. Die Messung der Genexpressionen erfolgte durch qRT-PCR. Die Genexpression wurde relativ zu dem maximal für das jeweilige Gen beobachteten Wert (auf 100% gesetzt) berechnet. Die dargestellten Werte sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

In Gegenwart von Trypsin wurde das IFN-System in der Kontrolle am stärksten aktiviert (Abbildung 4-21a+b). Trotzdem zeigte delNS1 unter diesen Bedingungen ein robustes Wachstum und erreichte einen finalen HA-Titer von 2,8 log HA / 100 μ L (Abbildung 4-21c). Durch Transfektion von P konnte die IFN-Antwort in Anwesenheit von Trypsin deutlich reduziert werden. Trotzdem traten in P-transfizierten Zellen unter diesen Bedingungen nur wenig höhere finale HA-Titer und virale mRNA-Level (Abbildung 4-21d) auf als in der Kontrolle. Die Transfektion von NS1 reduzierte die Aktivierung des IFN-Systems in Gegenwart von Trypsin ebenfalls, jedoch weniger effektiv als P. Gleichzeitig wurden in NS1-transfizierten Zellen zwar deutlich höhere M1-Expressionslevel, sowie ein früherer HA-Anstieg als in der Kontrolle gemessen. Der finale Titer war jedoch auch hier verglichen mit der Kontrolle nur geringfügig erhöht (3,0 log HA / 100 μ L).

Bei Verzicht auf Trypsin war die Expression von IFN- β in der Kontrolle geringer als mit Trypsin. Die maximalen Expressionslevel von Mx1 waren dagegen in den Kontrollen mit und ohne Trypsin vergleichbar. Allerdings wurde das Maximum der Mx1-Expression in Abwesenheit von Trypsin früher erreicht. Gleichzeitig behinderte der Verzicht auf Trypsin die Virusreplikation, sodass in der Kontrolle lediglich ein finaler Titer von 0,9 log HA / 100 μ L erzielt wurde. Transfektion von P reduzierte auch in Abwesenheit von Trypsin die IFN-Antwort. Dadurch wurden, im Gegensatz zu Infektionen mit Trypsin, der HA-Titer (Endtiter 1,7 log HA / 100 μ L) und in geringerem Maße auch das virale mRNA-Level eindeutig gesteigert. Wurde NS1 transfiziert, traten ohne Trypsin zu Beginn der Infektion (16 h p.i.) ebenfalls geringere Expressionswerte für IFN- β und Mx1 als in der Kontrolle auf. Dagegen wurden im weiteren Verlauf, verglichen mit der Kontrolle, höhere Expressionswerte für IFN- β und vergleichbare Expressionswerte für Mx1 beobachtet. Trotzdem führte die Transfektion von NS1 auch in Abwesenheit von Trypsin zu einer wesentlichen Steigerung der M1-Expression, sowie zu einem deutlich früherem HA-Anstieg und höherem Endtiter (2,3 log HA / 100 μ L) als in der Kontrolle oder P-transfizierten Zellen.

Eine vollständige Interpretation der hier beobachteten Wechselwirkungen zwischen der Virusreplikation und der Induktion sowie dem inhibitorischen Einfluss der IFN-Antwort erfolgt aufgrund der Komplexität dieses Datensatzes in der Diskussion (vgl. 5.5.3.1). Dort werden auch scheinbare Widersprüche, wie z.B. die hier im Gegensatz zu vorangegangenen Experimenten (vgl. 4.5.1) in Abwesenheit von Trypsin schwächere IFN-Induktion erklärt. Eindeutig war jedoch, dass Abwesenheit von Trypsin die Replikation von delNS1 in MDCK-Zellen nahezu vollständig inhibierte. Diese Inhibition konnte durch Transfektion viraler IFN-Antagonisten in Teilen aufgehoben werden. Für die Replikation von delNS1 stellte die IFN-Antwort damit in Abwesenheit von Trypsin eindeutig einen limitierenden Faktor dar. In Anwesenheit von Trypsin zeigte delNS1 dagegen robustes Viruswachstum, das durch Transfektion von IFN-Antagonisten nur unwesentlich verbessert werden

konnte. Trypsin schien damit den limitierenden Einfluss der IFN-Aktivierung auf die Replikation von delNS1 in MDCK-Zellen zu beseitigen.

4.5.3.2 Trypsinvermittelte Überwindung des IFN-induzierten, antiviralen Status in Influenza-virusinfizierten MDCK-Zellen

Das vorangegangene Experiment legt bereits nahe, dass Trypsin den inhibitorischen Einfluss der IFN-Antwort auf die Influenza-Virusreplikation in MDCK-Zellen reduziert. Parallel zu den hier vorgestellten Experimenten wurde in der Arbeitsgruppe der Einfluss einer starken IFN-Stimulation der Zellen bereits vor der Virusinfektion untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass IFN-Stimulation zwar den HA-Anstieg verzögert, jedoch keinen Einfluss auf den finalen Virustiter hat (Frensing *et al.*, 2011; Seitz *et al.*, 2010). Diese Experimente wurden unter den Standard-Infektionsbedingungen der Arbeitsgruppe durchgeführt, so dass Trypsin möglicherweise für den dort beobachteten, sehr geringen inhibitorischen Einfluss der IFN-Stimulation auf die Virusreplikation verantwortlich war. Entsprechend sollte hier untersucht werden, ob eine IFN-Stimulation in Abwesenheit von Trypsin bei verlangsamter Infektionsdynamik und fehlendem IFN-Abbau einen stärkeren inhibitorischen Effekt auf das Viruswachstum hat. Um zuordnen zu können, ob trypsinvermittelte, schnelle Infektionsdynamik oder IFN-Abbau einen negativen Einfluss der IFN-Stimulation verhindert, wurde Trypsin zudem durch FCS ersetzt und das Experiment mit WSN33 durchgeführt. Dieser Stamm aktiviert die Umwandlung von Serum-Plasminogen zu Plasmin, welches WSN33-HA trypsinunabhängig spaltet (Lazarowitz *et al.*, 1973; LeBouder *et al.*, 2008). In Vorexperimenten wurde die Effizienz der HA-Spaltung bei WSN33-Infektionen in Gegenwart von 5 U/mL Trypsin, 1 % FCS oder ohne Protease-Zusatz mittels Western Blot bestimmt. Ohne zusätzliche Protease lag nur ein Teil des HAs in der gespaltenen Form vor, wogegen mit Trypsin und FCS in beiden Fällen vollständige HA-Spaltung beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt). Um auch einen möglichen Abbau von IFN durch Plasmin ausschließen zu können, wurde IFN-haltiges CM für 12 h mit 1 % FCS und WSN33 (2×10^6 infektiöse Viren pro mL CM, trypsinfrei hergestelltes WSN33-Saatvirus) inkubiert. Das Virus wurde durch Ultrafiltration abgetrennt und MDCK-Zellen mit dem virusfreien CM für 3 h stimuliert. Bei Messung der Mx1-Expression mittels qRT-PCR zeigten sich keine Unterschiede zu unbehandeltem CM (Abbildung 4-22a). Serum-Plasmin sollte also für WSN33 eine schnelle Ausbreitung der Infektion ermöglichen, ohne gleichzeitig sekretiertes IFN abzubauen.

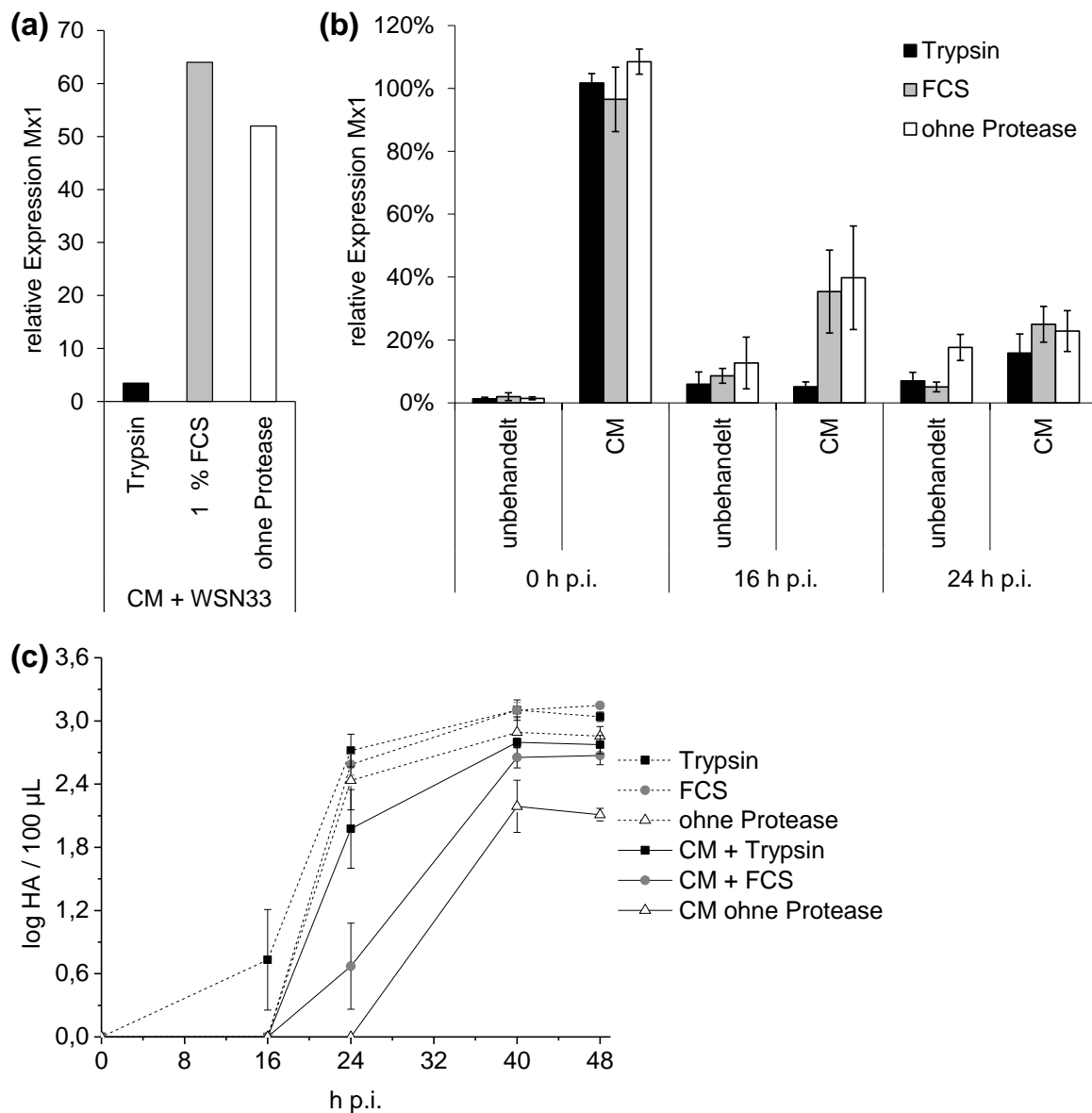


Abbildung 4-22: Einfluss von trypsinvermittelter, schneller Infektionsdynamik und IFN-Degradation auf die Überwindung des IFN-induzierten antiviralen Status. (a) Einfluss von Serum-Plasminogen auf die IFN-Aktivität. IFN-haltiges CM von delNS1-infizierten Zellen wurde mit 1 % FCS und WSN33, Trypsin oder ohne Protease für 12 h bei 37 °C inkubiert. Das Virus wurde mittels Ultrafiltration entfernt und das Medium anschließend zur Stimulation von MDCK-Zellen verwendet (3 h). Die Mx1-Expression wurde durch qRT-PCR relativ zu einer nicht-stimulierten Probe bestimmt. Das Experiment wurde einmal mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt. (b) CM-induzierter, antiviraler Status während der Infektion mit WSN33. MDCK-Zellen wurden für 5 h mit virus-freiem CM von delNS1-infizierten Zellen oder CM von nicht-infizierten Zellen stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit WSN33 (MOI 0,025) unter Zugabe von Trypsin, 1 % FCS oder ohne zusätzliche Protease infiziert. Die Mx1-Expression wurde durch qRT-PCR bestimmt und auf das durchschnittlich in CM-stimulierten Zellen zum Zeitpunkt der Infektion gemessene Level (auf 100 % gesetzt) normiert. (c) WSN33-Replikation in CM-stimulierten Zellen. Die Virustiter wurden mit dem HA-Assay bestimmt. Dargestellt ist der Median \pm dem Median der absoluten Abweichungen von 4 unabhängigen Experimenten.

Im Anschluss daran wurde der inhibierende Einfluss einer IFN-Stimulation auf die WSN33-Replikation in Gegenwart von Trypsin, FCS oder unter Protease-freien Bedingungen untersucht. Falls eine schnelle Ausbreitung der Infektion den inhibierenden Einfluss der IFN-Stimulation reduziert, sollte sowohl die Zugabe von Trypsin als auch von FCS zu einer Steigerung der Virustiter in stimulierten Zellen führen. Für Protease-freie Infektionen wäre dagegen infolge der langsameren Infektionsdynamik eine deutliche Inhibition der Virusreplikation durch die IFN-Stimulation zu

erwarten. MDCK-Zellen wurden also mit CM oder gleichbehandeltem Kulturüberstand von MOCK-infizierten Zellen für 5 h stimuliert. Anschließend wurde WSN33 (MOI 0,025) zusammen mit entweder Trypsin, 1% FCS oder ohne Protease zugegeben. Die IFN-Antwort wurde durch qRT-PCR-Messung von Mx1 und die Infektionsdynamik durch Aufnahme der HA-Verläufe erfasst. In den MOCK-stimulierten Zellen fiel die Aktivierung von Mx1 für alle drei Zustände nur schwach aus (Abbildung 4-22b). Im Gegensatz dazu wurde nach IFN-Stimulation bereits zum Zeitpunkt der Infektion eine sehr starke Mx1-Expression beobachtet. Bei Trypsinzugabe fiel diese starke Mx1-Aktivierung jedoch innerhalb der ersten 16 h nach Infektion deutlich ab und unterschied sich nicht mehr wesentlich von dem Level in nicht-stimulierten Zellen. Dies deutet auf einen fast vollständigen, proteolytischen Abbau des zur Stimulation verwendeten IFNs hin. Mit FCS bzw. ohne Protease-Zusatz blieb die CM-induzierte Mx1-Expression auf deutlich höherem Niveau, nahm jedoch trotzdem nach der Infektion ab.

Der HA-Titer stieg in MOCK-stimulierten Zellen mit Trypsin am schnellsten, mit FCS geringfügig langsamer und am langsamsten ohne Protease-Zusatz an (Abbildung 4-22c). Die finalen Ausbeuten waren mit Trypsin und FCS vergleichbar und ohne Protease-Zusatz geringer. CM-Stimulation verzögerte die Infektion unter allen drei Bedingungen. Ohne zusätzliche Protease dauerte es länger als 24 h, bis ein messbarer Anstieg des HA-Titers stattfand und der final erreichte Titer blieb der geringste in diesem Experiment. Im Vergleich dazu wurden mit Trypsin in stimulierten Zellen ein deutlich früherer Anstieg und ein höherer finaler HA-Titer erreicht. Bei Zugabe von FCS stieg der Titer in stimulierten Zellen etwas langsamer als mit Trypsin, jedoch war das finale Niveau nahezu vergleichbar. Relativ zu nicht-stimulierten Infektionen reduzierte die IFN-Stimulation den finalen Titer bei Zugabe von Trypsin um 0,3 log HA / 100 μ L (zweifache Reduktion der produzierten Viruspartikel), mit FCS um 0,4 log HA / 100 μ L (2,5-fach) und ohne Proteasezusatz um 0,7 log HA / 100 μ L (sechsfach). Der Unterschied im finalen Virustiter zwischen stimulierten und nicht-stimulierten Zellen war signifikant für FCS und in Abwesenheit einer Protease ($p < 0,05$, Friedman-Test für 4 unabhängige Experimente), bei Verwendung von Trypsin jedoch nicht. Der Verzicht auf Zusatz einer Protease steigerte den inhibitorischen Einfluss der IFN-Stimulation damit klar. Für stärker IFN-anfällige Stämme als WSN33 war dieser Effekt sogar noch eindeutiger. So hatte eine IFN-Stimulation für PR8-NIBSC bei Verwendung von Trypsin ebenfalls keinen Einfluss auf den finalen Virustiter. In Abwesenheit von Trypsin reduzierte eine IFN-Stimulation den finalen Titer für diesen Stamm jedoch um Faktor 30 (Daten nicht gezeigt). In dem hier vorgestellten Experiment verringerten Trypsin und FCS beide bezogen auf Protease-freie Infektionen den inhibitorischen Einfluss der Interferonstimulation. Mit FCS war die IFN-Antwort in stimulierten Zellen jedoch genauso stark wie in Protease-freien Infektionen. Demnach muss der geringere Einfluss der Stimulation bei Verwendung von FCS auf die schnellere Infektionsdynamik zurückzuführen sein. Bei Verwendung von Trypsin

förderte der proteolytische Abbau des IFNs die Virusreplikation in stimulierten Zellen zusätzlich, was den schnelleren Anstieg des Titers im Vergleich zu FCS erklärt. Der finale Titer fiel in stimulierten Zellen mit Trypsin jedoch nur unwesentlich höher aus als mit FCS. Die schnelle Ausbreitung der Infektion war somit entscheidend, um den antiviralen Zustand der Zellen zu überwinden, jedoch wirkte sich ein zusätzlicher, proteolytischer IFN-Abbau förderlich aus.

5 Diskussion

In diesem Abschnitt sollen die Ergebnisse dieser Arbeit zusammenhängend interpretiert und vor dem Hintergrund der Fachliteratur diskutiert werden. Inhaltlich zusammenhängende Einzelergebnisse werden teilweise zusammengefasst.

5.1 Methodenetablierung und Datenqualität

5.1.1 Etablierung einer effizienten Transfektionsmethode für MDCK-Zellen

MDCK-Zellen gelten allgemein als schwierig zu transfizieren (Lee *et al.*, 2008; Schuck *et al.*, 2004). So zeigten auch die Experimente dieser Arbeit, dass mit chemischen Transfektionsmethoden in MDCK-Zellen keine hohen Transfektionseffizienzen erreicht werden konnten (vgl. 4.1.1). Durch Elektroporation mit dem Microporator waren für diese Zelllinie jedoch Transfektionseffizienzen von über 80 % möglich. Diese hohe Transfektionseffizienz war für die Experimente dieser Arbeit eine entscheidende Voraussetzung. Nur so war es möglich, die IFN-Antwort in MDCK-Zellen durch transiente Überexpression viraler IFN-Antagonisten effektiv zu unterdrücken (vgl. 4.4). Auch die Überexpression von TMPRSS2 hätte bei schlechteren Transfektionseffizienzen vermutlich einen deutlich geringeren Effekt auf die Infektionsdynamik in Abwesenheit von Trypsin gehabt (vgl. 4.5.2.2.1). Die Verwendung des Microporators hatte aber noch einen weiteren Vorteil. Sind für einen Versuch mehrere unabhängige Wells mit transfizierten Zellen erforderlich, muss bei einer konventionellen, chemischen Transfektion jedes Well separat ausgesät und danach transfiziert werden. Dabei können sich leicht Inhomogenitäten zwischen den Wells ergeben. Bei Verwendung des Microporators wurden die Zellen dagegen in Suspension transfiziert. Die Zellen konnten folglich nach der Transfektion zunächst gepoolt und anschließend auf die notwendige Anzahl Wells verteilt werden. So konnten Inhomogenitäten zwischen den Wells bezüglich Zellzahl oder Transfektionseffizienz minimiert werden.

5.1.2 Reporter-Gen-Assays in MDCK-Zellen

Zu Beginn dieser Arbeit sollten luciferasebasierte Reporter-Gen-Assays als Methode etabliert werden, um die individuelle Aktivierung der drei an der Aktivierung von IFN- β beteiligten Signalwege bestimmen zu können. Dafür standen die drei Reporter-Vektoren pISRE-Luc, pAP1-Luc und pNF κ B-Luc aus dem Pathway-Profiling-System von Clontech, sowie Reporter-Vektoren mit den vollständigen, murinen IFN- β - und Mx1-Promotern zur Verfügung. Der IFN- β -Promoter wurde trotz der murinen Promoter-Sequenz in MDCK-Zellen durch Influenza-Virusinfektion induziert (vgl. 4.1.2). Für die drei Vektoren mit den ISRE-, AP1- und NF κ B-Enhancer-Elementen konnte dagegen trotz verschiedener Optimierungsversuche keine Aktivierung durch die Virusinfektion nachgewiesen

werden. Nur bei Verwendung bekannter, starker Aktivatoren der drei untersuchten Signalwege (TNF- α für pNF κ B-Luc, Poly(I:C)-Transfektion für pISRE-Luc) konnte eine schwache Induktion erreicht werden (Tabelle 4-1). Andere Arbeitsgruppen konnten mit vergleichbareren Assays die Aktivierung der ISRE-, AP1 und NF κ B-Elemente des IFN- β -Promoters in Influenza-virusinfizierten MDCK-Zellen bestimmen (Ehrhardt *et al.*, 2006; Ludwig *et al.*, 2001; Wurzer *et al.*, 2004). In diesen Arbeiten wurden allerdings andere Vektoren verwendet. Experimentelles Setup und Infektionsbedingungen waren hier und in diesen Arbeiten vergleichbar. Das hier verwendete Transfektionsprotokoll wurde sogar direkt von Dr. C. Ehrhardt übernommen. Vermutlich waren daher die Vektoren aus dem Pathway-Profiling-System von Clontech aus unbekanntem Gründen für den Einsatz in MDCK-Zellen ungeeignet. Durch Verwendung alternativer Vektoren hätte die hier interessierende Fragestellung damit sicherlich beantwortet werden können. Im Verlaufe dieser Arbeit wurde aber verhältnismäßig schnell deutlich, dass die IFN-Antwort in MDCK-Zellen keinen limitierenden Faktor für die Virusreplikation darstellt. Vor diesem Hintergrund war die individuelle Bedeutung der drei Signalwege, die zur Aktivierung von IFN- β führen, nicht mehr von Interesse, so dass dieses Projekt nicht weiter verfolgt wurde.

Unabhängig davon wurde auch angestrebt, luciferasebasierte Reporter-Gen-Assays als alternative Messmethode für IFN-Antwort in virusinfizierten MDCK-Zellen zu etablieren. Dieses Ziel wurde unter Verwendung der Reporter-Vektoren mit den murinen IFN- β - und Mx1-Promotern erreicht. Beide Reporter wurden in guter Übereinstimmung mit qRT-PCR-Daten durch Influenza-Virusinfektion in MDCK-Zellen induziert (Abbildung 4-3). Diese Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit allerdings nur selten verwendet, da sie verglichen mit qRT-PCR-Messung von IFN- β und Mx1 keinen zusätzlichen Informationsgewinn liefert. Bei qRT-PCR ist zudem keine Transfektion der Zellen notwendig, sodass qRT-PCR bei umfangreicheren Experimenten weniger aufwendig war. Außerdem wurden viele der hier mit qRT-PCR erzielten Ergebnisse im Rahmen der Doktorarbeit von B. Heynisch aus der gleichen Arbeitsgruppe mittels Western Blot bestätigt. Eine weitere Bestätigung mit Reporter-Gen-Assays war daher nicht erforderlich. Dennoch steht nach der Etablierung von luciferasebasierten Reporter-Gen-Assays in dieser Arbeit nun eine weitere Methode zur Untersuchung von Virus-Wirtszellinteraktionen im Kontext der Impfstoffproduktion zur Verfügung.

5.1.3 Datenqualität

In dieser Arbeit waren relative Unterschiede zwischen zwei experimentellen Zuständen (z.B. „ohne Trypsin wird die IFN-Antwort bei Virusinfektionen stärker als mit Trypsin aktiviert“ oder „Virusstamm A induziert die IFN-Antwort stärker als Virusstamm B“) stets über mehrere unabhängige Experimente reproduzierbar. Die Einzelerperimente dieser Versuchsreihen unterschieden sich jedoch teilweise deutlich in ihren dynamischen Verläufen und den absoluten Werten der jeweils gemessenen

Größen (vgl. Abbildung 4-4a). Bereits zuvor wurde innerhalb der Arbeitsgruppe beobachtet, dass sich Infektionsverläufe trotz gleicher MOI bei wiederholter Durchführung von Experiment zu Experiment unterscheiden können. Dies trifft insbesondere auf die Dauer der Lag-Phase, d.h. die Zeit zwischen Infektion und dem ersten messbaren Titeranstieg, zu. Die Ursache für diese Unterschiede ist nicht bekannt. In dem in Abbildung 4-4 dargestellten Beispiel konnten Messfehler jedoch ausgeschlossen werden. Beim HA-Assay lag der Fehler einer Einzelbestimmung bei $\pm 0,149 \log \text{HA}$ (Kalbfuss *et al.*, 2008). Für die zur Bestimmung der Genexpression verwendeten qPCR-Assays wurden im Vorfeld vergleichbare PCR-Effizienzen und ein ausreichend großer, linearer Messbereich sichergestellt (Tabelle 4-2). Zudem betragen die durch qPCR-Messung bedingten, relativen Fehler der Genexpressionswerte in Abbildung 4-4a nur zwischen 10 % und 30 % der absolut gemessenen Werte. Diese Fehler waren offensichtlich zu gering, um die Unterschiede zwischen den fünf Einzelerperimenten zu erklären. Vermutlich sind daher eher Inhomogenitäten in den experimentellen Bedingungen für diese Unterschiede verantwortlich. Grundsätzlich wurde die Versuchsdurchführung in dieser Arbeit innerhalb aller Versuchsreihen nach Möglichkeit konstant gehalten. Trotzdem gab es potentielle Quellen für Inhomogenitäten, die sich nicht vermeiden ließen. Zunächst sind hier Chargenwechsel bei den verwendeten Saatviren, Medien oder Trypsin zu nennen. Auch die Passagiergeschichte der verwendeten Zellen unterschied sich zwangsläufig zwischen den Einzelerperimenten. Ritter (2010) stellte einen erheblichen Einfluss der Passagiergeschichte auf die physiologischen Eigenschaften der Zellen fest. Zudem ist in der Literatur bekannt, dass selbst innerhalb einer Zellpopulation viele Prozesse bei der Virusinfektion von Zelle zu Zelle heterogen verlaufen (Snijder *et al.*, 2009).

Das wesentliche Problem dieser unvermeidbaren Unterschiede zwischen den Einzelerperimenten war, dass sich zwar Trends stets hervorragend reproduzieren ließen. Eine zusammenfassende Darstellung mehrerer Experimente, z.B. in Form von Mittelwerten, sowie die objektive Überprüfung der beobachteten Trends durch statistische Signifikanztests war jedoch aufgrund verletzter Voraussetzungen der Testverfahren häufig nicht sinnvoll. So konnte z.B. die Signifikanz des Unterschiedes in der Mx1-Expression in Gegenwart und Abwesenheit von Trypsin in Abbildung 4-4 nicht mit dem üblicherweise verwendeten t-Test überprüft werden. Die Daten waren überwiegend entweder nicht normalverteilt oder das Kriterium der Varianzhomogenität wurde nicht erfüllt (Tabelle 4-3). Ursache dafür waren die Schwankungen sowohl in den dynamischen Verläufen als auch in den absolut gemessenen Werten in den Einzelerperimenten. Das Problem stark variierender, absoluter Genexpressionswerte bei biologischen Replikaten wurde in der Literatur bereits beschrieben. Willems *et al.* (2008) standardisierten derartige Daten durch aufeinanderfolgende Anwendung von log-Transformation, Mittelwert-Zentrierung und Autoskalierung. So konnte die Varianz der Daten deutlich reduziert und der dort relevante Trend durch Anwendung des gepaarten

t-Tests verifiziert werden. Derartige Standardisierungsverfahren führten auch in dieser Arbeit für Datensätze zum Erfolg, bei denen die Einzelexperimente sich zwar in den absolut gemessenen Werten unterschieden, in ihren dynamischen Verläufen jedoch vergleichbar waren. Ein Beispiel dafür ist der für Abbildung 4-19 verwendete Datensatz. Hier konnte die Varianz der Daten durch Normierung der Einzelexperimente auf die jeweils maximal beobachteten Werte der gemessenen Größen reduziert werden. Danach war die Normalverteilung der Daten gegeben und die Anwendung des t-Tests möglich.

Häufig trugen jedoch unterschiedliche Infektionsdynamiken in hohem Maße zu der Varianz zwischen den Einzelexperimenten eines Datensatzes bei. In diesen Fällen führte die Anwendung von Standardisierungsverfahren nicht zu normalverteilten Daten (Daten nicht gezeigt), da Dynamikunterschiede auch nach Anwendung von Skalierungsverfahren unverändert bestehen blieben. Dies erschwerte die Anwendung parametrischer Verfahren zur Überprüfung der statistischen Signifikanz, wie z.B. dem t-Test. Unter 4.1.3.2 wurde dieses Problem der Signifikanzprüfung am Beispiel der unterschiedlichen Mx1-Expression in An- und Abwesenheit von Trypsin ausführlich erläutert. Infolge des großen Anteils der Infektionsdynamik an der Varianz dieser Daten wären für die korrekte Anwendung des t-Tests erheblich mehr Datensätze erforderlich gewesen. Grundsätzlich könnte der Einfluss der Infektionsdynamik auf die Datenauswertung

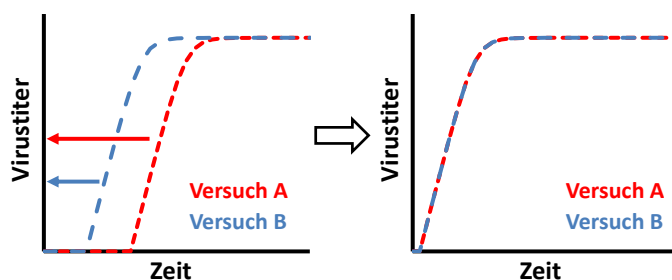


Abbildung 5-1: Zeitliche Normierung zweier unabhängiger Experimente auf den Zeitpunkt des ersten messbaren HA-Anstiegs. Schematische Darstellung.

wahrscheinlich durch individuelle zeitliche Verschiebung der betrachteten Datenreihen auf einen gemeinsamen Bezugspunkt, z.B. den Zeitpunkt des ersten detektierbaren HA-Anstiegs, deutlich reduziert werden (schematisch dargestellt in Abbildung 5-1). Um zeitliche Normierungsverfahren dieser Art objektiv

anwenden zu können, wäre jedoch eine höhere zeitliche Auflösung der Infektionsverläufe durch erheblich kürzere Probenahmeintervalle notwendig gewesen. Die Tatsache, dass Mx1 in Abwesenheit von Trypsin stärker induziert wird, war jedoch in allen unter 4.1.3.2 dargestellten Experimenten bereits klar erkennbar. Weitere Wiederholungen des Experiments oder die Verkürzung der Probenahmeintervalle hätten hier somit zu keinem zusätzlichen Informationsgewinn geführt und waren folglich nicht erstrebenswert.

Bei nicht normalverteilten Daten wurde die Signifikanz der beobachteten Unterschiede daher mit nicht-parametrischen Verfahren bestimmt. Nicht-parametrische Verfahren wurden bereits zuvor in qRT-PCR- (Yao *et al.*, 2007) oder microarraybasierten (Efron & Tibshirani, 2002) Genexpressionsstudien verwendet. Diese Verfahren stellen keine Anforderungen an die Verteilung der Daten, so

dass sich die Signifikanz beobachteter Effekte und Trends hier auch bei starken Abweichungen in einzelnen Datensätzen bereits aus wenigen Experimenten ermitteln ließ (vgl. Abbildung 4-4, Abbildung 4-13, Abbildung 4-20, Abbildung 4-22).

Um dem rangbasierten Charakter dieser Verfahren gerecht zu werden, wurden die Ergebnisse bei Verwendung nicht-parametrischer Signifikanztests in Form des Medians der Einzelexperimente unter Verwendung des Medians der absoluten Differenzen (MAD) als Streuungsmaß dargestellt. Bei Versuchsreihen mit Schwankungen in den dynamischen Verläufen und den absolut gemessenen Werten hatte diese Darstellung außerdem den Vorteil, dass sich Trends eindeutig herausarbeiten ließen (Abbildung 4-4c). Median und MAD werden, verglichen mit Mittelwert und Standardabweichung, weniger stark von Extremwerten in den ihnen zugrunde liegenden Daten beeinträchtigt. Daher sind sie bei kleinen Stichproben oder unbekannter Verteilung der untersuchten Daten häufig verlässlichere Lagemaße als Mittelwert und Standardabweichung (Iglewicz, 2000). Nachteil ist, dass bei der Darstellung von Median und MAD der Informationsgehalt bezüglich der jeweiligen Extremwerte geringer ist als bei Verwendung von Mittelwert und Standardabweichung. Eine Darstellung entsprechender Datensätze mit Mittelwert und Standardabweichung war aber ebenso nicht zielführend (Abbildung 4-4b). In dieser Darstellung ging der in den Einzelexperimenten klare Trend einer zu allen Zeitpunkten in Abwesenheit von Trypsin höheren Mx1-Expression verloren. Die einzige Alternative wäre in diesem Fall die Darstellung eines repräsentativen Verlaufs. Dabei würde allerdings jegliche Information über die Reproduzierbarkeit der dargestellten Daten und Trends fehlen. Verglichen damit war die Darstellung von Median und MAD in Kombination mit der objektiven Bewertung abgeleiteter Trends durch nichtparametrische Signifikanztests hier als angemessen anzusehen. Trends ließen sich aus den so ausgewerteten Daten eindeutig herausarbeiten und gleichzeitig vermittelte die MAD einen Eindruck von der mittleren Abweichung zwischen den Einzelexperimenten.

5.2 Aktivierung der IFN-Antwort in Influenza-virusinfizierten MDCK-Zellen

Ziel dieses Experiments war es, die IFN-Antwort in Influenza-virusinfizierten MDCK-Zellen zu charakterisieren und dabei stammspezifische Unterschiede herauszuarbeiten. Der delNS1-Stamm zeigte die stärkste Aktivierung des Interferonsystems, wogegen diese für die drei WT-Stämme deutlich schwächer ausfiel (Abbildung 4-5). Während die primäre IFN- β Induktion für delNS1 bis etwa 10 h p.i. kontinuierlich anstieg, konnte bei den WT-Stämmen bereits 5 h p.i. (PR8-NIBSC, WSN33) bzw. 7 h p.i. (PR8-RKI) ein stationäres Niveau beobachtet werden. Zur jeweils gleichen Zeit erreichte die NS1-Expression für die WT-Stämme ihr Maximum. Dies verdeutlicht die aus der Literatur bekannte Funktion von NS1 als IFN-Antagonist (Hale *et al.*, 2008; Wolff & Ludwig, 2009). Sobald NS1

in ausreichender Menge vorlag, wurde eine weitere Steigerung der IFN- β Expression effektiv unterbunden. Zwischen den WT-Stämmen ergaben sich aber auch Unterschiede bei der IFN-Induktion. PR8-NIBSC und PR8-RKI sind zwei Isolate desselben Virusstamms, die lediglich aus verschiedenen Quellen bezogen wurden. Trotzdem induzierte PR8-NIBSC IFN deutlich stärker als PR8-RKI. In der Literatur wird von einer eher schwachen Aktivierung des Interferonsystems durch PR8 berichtet (Hayman *et al.*, 2006; Kochs *et al.*, 2007a), was mit den Ergebnissen dieses Experiments für PR8-RKI im Einklang steht. Die stärkere Aktivierung des IFN-Systems durch PR8-NIBSC im Vergleich zu PR8-RKI wurde aber auch an einer stärkeren Phosphorylierung von IRF3, I κ B und STAT2 deutlich (Heynisch *et al.*, 2010). Diese Unterschiede lagen bei hoher und niedriger MOI, sowie in T-Flaschen und auch im Bioreaktor vor (Doktorarbeit B. Heynisch, Arbeitsgruppe Bioprozesstechnik, MPI Magdeburg, in Vorbereitung). Weiterhin äußerten sich PR8-NIBSC Infektionen in einer früheren Apoptose-Induktion (Schulze-Horsel *et al.*, 2009) und einer stärkeren Beeinflussung des Wirtszellproteoms (Vester *et al.*, 2009). Zum Teil geht die stärkere IFN-Induktion durch PR8-NIBSC wahrscheinlich auf den im Vergleich zu PR8-RKI höheren Anteil inaktiver Viruspartikel im Saatvirus zurück (vgl. 4.3, 5.3). Bei der Sequenzierung beider Stämme fielen zudem für alle Gensegmente Unterschiede in den Aminosäuresequenzen auf (nicht publizierte Daten der Arbeitsgruppe Bioprozesstechnik, MPI Magdeburg). Vor allem NS1 und PB2 werden in der Literatur im Zusammenhang mit der IFN-Induktion diskutiert (Graef *et al.*, 2010; Hale *et al.*, 2010a; Iwai *et al.*, 2010). PR8-RKI und PR8-NIBSC unterscheiden sich im PB2 an vier Aminosäureresten (Positionen 105, 259, 504, 702), für die nach Wissen des Autors bislang kein Zusammenhang zur IFN-Antwort bekannt ist. Beim NS1 hat PR8-NIBSC an Position 55 Lysin und an Position 101 Aspartat, wogegen bei PR8-RKI an beiden Stellen Glutaminsäure vorliegt. Glutaminsäure an Position 55 führt bei PR8-Stämmen zu einer verringerten IFN-Induktion (Murakami *et al.*, 2008). Für die Impfstoff-Produktion werden häufig PR8-basierte High Growth Reassortanten (HGR) von aktuell zirkulierenden Influenza-Stämmen verwendet (Wood & Robertson, 2007). Die in unserer Arbeitsgruppe verwendeten HGRs A/NYMC X-175C und A/NYMC X-161B haben beide das NS1 von PR8 und weisen analog zu PR8-RKI ebenfalls Glutaminsäure an Position 55 im NS1 auf (vgl. Sequenzen in der NCBI-Datenbank). Interessanterweise induzierten beide Stämme deutlich weniger IFN als PR8-NIBSC (Björn Heynisch, unpublizierte Daten). Wahrscheinlich zeichnet sich also der am New York Medical College (NYMC) zur Herstellung von High-Growth-Reassortanten verwendete PR8-Stamm durch eher schwache IFN-Induktion aus. Bei klassischer Herstellung von Reassortanten mit PR8 als Donor-Stamm tragen die reassortierten Stämme meistens (53 von 57 untersuchten Stämmen) NS1 und PB2 von PR8 (Fulvini *et al.*, 2011). Es ist daher zu erwarten, dass so erzeugte High-Growth-Reassortanten analog zum Donor-Stamm ebenfalls nur eine schwache IFN-Induktion auslösen. Für PR8-basierte HGRs ist entsprechend

davon auszugehen, dass die IFN-Antwort für die Prozessausbeute bei der Impfstoffherstellung keine limitierende Rolle spielt.

WSN33 verhielt sich im Vergleich zu den PR8-Stämmen deutlich anders. Während für PR8-NIBSC, PR8-RKI und delNS1 im späteren Verlauf der Infektion die IFN- β Expressionslevel relativ konstant blieben, konnte für WSN33 im gleichen Zeitraum eine deutliche Abnahme festgestellt werden. Auch in einer anderen Arbeit wurde für WSN33 eine schwächere IFN-Induktion als für PR8 beobachtet (Geiss *et al.*, 2002). WSN33-infizierte Zellen wiesen in Abbildung 4-5 das höchste NS1 mRNA-Level auf, was eventuell die außergewöhnlich effiziente Unterdrückung der IFN-Induktion erklärt. Der Abfall der IFN- β Expression im Verlauf der WSN33-Infektion könnte aber auch auf Bindung von CPSF30 durch NS1 zurückzuführen sein (vgl. 2.3.4.1). Dies inhibiert die zelluläre Genexpression allgemein und reduziert entsprechend auch die Expression von IFN und ISGs. PR8-NS1 trägt Defekte in der Proteindomäne, die CPSF30 bindet (Kochs *et al.*, 2007a). Hale *et al.* (2010b) zeigten für das pandemische Influenza-Virus A/California/04/09, dass CPSF30-Bindung einen wichtigen Beitrag zur Unterdrückung der IFN-Aktivierung leistet. A/California/04/09-NS1 kann CPSF30 nicht binden. Wurde die Bindung von CPSF30 aber durch Änderungen der Aminosäuresequenz im NS1 ermöglicht, fiel die IFN-Induktion deutlich geringer aus. Eine vergleichbare Korrektur des PR8-NS1 führte zu erhöhter Virulenz in Mäusen (Steidle *et al.*, 2010). Möglicherweise sind also die Defekte in der CPSF30-bindenden Domäne des PR8-NS1 für die Unterschiede im Verlauf der IFN-Induktion zwischen PR8-Stämmen und WSN33 in Abbildung 4-5 verantwortlich. Kochs *et al.* (2007a) führen allerdings an, dass nur wenige weitere Influenza A-Stämme vergleichbare Defekte im NS1 aufweisen.

5.3 Der Beitrag nicht-infektiöser Viruspartikel zu der IFN-Induktion

Bei der Untersuchung der IFN-Induktion durch verschiedene Influenza-Stämme bei hoher MOI (vgl. 4.2) fiel auf, dass PR8-NIBSC, PR8-delNS1 und WSN33 zu Beginn der Infektion (0 - 4 h p.i.) eine nahezu identische, sehr schnelle Induktion von IFN- β zeigten. PR8-RKI infizierte Zellen wiesen diese frühe starke IFN-Induktion nicht auf. Bei PR8-NIBSC, PR8-delNS1 und WSN33 lag gleichzeitig ein schlechteres Verhältnis von infektiösen zu nicht-infektiösen Viren vor (< 0,5 % infektiös) als bei PR8-RKI (2 % infektiös). Marcus *et al.* (2010; 2005) zeigten, dass ein großer Teil der nicht-infektiösen Influenza-Viruspartikel in der Lage ist, die IFN-Expression zu induzieren. Es wurde daher in zwei unterschiedlichen Ansätzen ermittelt, ob auch bei den hier verwendeten Virusstämmen ein höherer Anteil nicht-infektiöser Partikel zu stärkerer IFN-Induktion führt.

In einem ersten Schritt wurde die IFN-Induktion durch inaktivierte Influenza-Viren untersucht. Dabei wurde deutlich, dass inaktivierte Influenza-Viren, solange die virale RNA intakt bleibt, auch in Abwesenheit von Virusreplikation die IFN-Expression aktivieren können. Verglichen mit der IFN-Induktion während der Virusreplikation war die Aktivierung der IFN-Antwort durch inaktivierte

Influenza-Viren allein jedoch nur schwach. Die Virusreplikation war damit der treibende Faktor für die IFN-Induktion. Weitere Experimente zeigten jedoch, dass nicht-infektiöse Viruspartikel die IFN-Induktion während aktiver Virusreplikation durchaus stark beeinflussen. In einem zweiten Ansatz wurden vier unterschiedliche PR8-NIBSC Saatviren charakterisiert, die sich im Verhältnis infektiöser zu nicht-infektiöser Partikel klar unterschieden. Für PR8-NIBSC schien ein schlechtes Verhältnis von infektiösen zu nicht-infektiösen Viren (< 0,5 % infektiös) eindeutig zu einer starken Aktivierung der IFN-Antwort zu führen (vgl. 4.3.2, 4.3.3). Bei einem höherem Anteil infektiöser Viren (> 5 % infektiös) wurde das IFN-System dagegen deutlich schwächer aktiviert. Aus den zeitlichen Unterschieden bei der Aktivierung der IFN-Antwort durch diese PR8-NIBSC Varianten lässt sich eindeutig ein Beitrag nicht-infektiöser Viruspartikel zur IFN-Induktion ableiten. Die Neusynthese genomischer viraler RNA beginnt bei der Virusreplikation erst zwischen 2 und 4 h p.i. (Kawakami *et al.*, 2011). In Übereinstimmung damit zeigten NIBSC-Saatviren mit > 5 % infektiösen Viren (Abbildung 4-7), oder PR8-RKI (2 % infektiöse Viren, Abbildung 4-5) erst 2 – 3 h p.i. eine deutliche IFN- β -Induktion. Für diese Stämme ging die IFN-Induktion also scheinbar im Wesentlichen auf neu gebildete, genomische virale RNA zurück. Dagegen stieg die IFN- β Expression für PR8-NIBSC-Saatviren mit < 0,5 % infektiösen Viren (Abbildung 4-5, Abbildung 4-7) sofort nach der Infektion an. Dieser frühe Anstieg kann entsprechend nur auf den Eintrag großer Mengen viraler RNA in die Zellen, vermittelt von nicht-infektiösen Partikeln im Saatvirus, zurückgehen.

Zudem war für die PR8-NIBSC mit schlechtem TCID₅₀/HA-Verhältnis auffällig, dass bei Infektion mit hoher MOI der HA-Titer zwar anstieg, jedoch keine nennenswerte Zunahme des TCID₅₀ auftrat (Abbildung 4-8). Gleichzeitig zeichneten sich diese Stämme durch eine starke und schnelle Aktivierung der IFN-Antwort aus. Stämme mit gutem TCID₅₀/HA-Verhältnis zeigten dagegen auch bei hoher MOI einen Anstieg des TCID₅₀, erreichten höhere HA-Titer und induzierten IFN deutlich schwächer. Ein höherer Anteil DI-Partikel bei den PR8-NIBSC Stämmen mit schlechtem TCID₅₀/HA-Verhältnis (< 0,5% infektiös) könnte sowohl die schlechteren Virustiter als auch die stärkere Interferonantwort erklären. Im Anschluss an diese Arbeit wurden in der Arbeitsgruppe Bioprozesstechnik PCR-Analysen für diese Saatviren (< 0,5 % infektiös) durchgeführt. Tatsächlich traten dabei in großem Ausmaß die für DI-Partikel typischen verkürzten Varianten der drei für die viralen Polymerasen kodierenden RNA-Segmente auf (T. Frensing, unpublizierte Daten). Bei PR8-NIBSC Saatviren mit > 5 % infektiösen Partikeln war dies dagegen nur in geringem Maße der Fall. McLain *et al.* (1988) berichteten, dass bereits ein DI-Partikel pro Zelle ausreicht, um bei Influenza-Infektion in MDCK-Zellen einen zytopathischen Effekt zu verhindern. DI-Partikel liegen bei Influenza-Viruspräparationen zudem häufig in großem Überschuss gegenüber infektiösen Viren vor (Marcus *et al.*, 2009; Marcus *et al.*, 2005), sodass zu Beginn der Infektion große Mengen DI-RNA in die Zelle eingetragen werden. Dies erklärt wahrscheinlich die schnelle Aktivierung der IFN- β Expression zu

Beginn der Infektion. DI-RNA ist ein bevorzugter Agonist von RIG-I (Baum & García-Sastre, 2011). Außerdem akkumuliert DI-RNA aufgrund ihrer bevorzugten Transkription in den Zellen und vermittelt dadurch sicherlich auch im späteren Verlauf der Infektion eine starke Aktivierung von RIG-I und damit des IFN-Systems. Diese stärkere Aktivierung des IFN-Systems könnte zusätzlich auch zu den geringeren Virustitern beitragen, ist aber vor dem Hintergrund der weiteren Ergebnisse dieser Arbeit (vgl. 5.4, 5.5) sicherlich nicht die Hauptursache.

Vieles spricht dafür, dass DI-Partikel zusätzlich zu den zuvor diskutierten genetischen Unterschieden (vgl. 5.2) auch zu dem verschiedenen Verhalten von PR8-NIBSC und PR8-RKI bei IFN-Induktion und Virusreplikation beitragen. Isken *et al.* (2012) beobachteten große Unterschiede in den Titerverläufen (HA und TCID₅₀) von PR8-NIBSC (0,16 % infektiös) und PR8-RKI (1 % infektiös) bei hoher MOI (drei). So wurde unter diesen Bedingungen für PR8-RKI ein klarer Anstieg des TCID₅₀ während der Infektion beobachtet, wogegen bei PR8-NIBSC, analog zu Abbildung 4-8, keine Zunahme des TCID₅₀ auftrat. Entsprechend enthielt das verwendete PR8-RKI Saatvirus mit hoher Wahrscheinlichkeit nur einen geringen Anteil DI-Partikel. Bei sehr geringer MOI verschwanden die Wachstumsunterschiede zwischen PR8-RKI und PR8-NIBSC. Auf diese Weise wurde wahrscheinlich für PR8-NIBSC eine Co-Infektion von Zellen mit DI- und infektiösen Viruspartikel vermieden. So wurden die DI-Partikel des Saatvirus nicht mitamplifiziert und konnten damit die Virusreplikation nicht länger beeinträchtigen. Entsprechend konnte in der hier vorliegenden Arbeit durch einfaches Passagieren von PR8-NIBSC (0,26 % infektiös) bei MOI 0,00001 ein Saatvirus mit sehr hohem Anteil infektiöser Viren (20,3 %) gewonnen werden. Im Vergleich zu dem eingesetzten Saatvirus (0,26 % infektiös) zeigte das neue PR8-NIBSC Saatvirus mit verbessertem TCID₅₀/HA-Verhältnis eine erheblich geringere IFN-Induktion und erreichte höhere Virustiter. Durch Verbesserung des TCID₅₀/HA-Verhältnisses bzw. durch Ausverdünnen der DI-Partikel näherten sich die Eigenschaften von PR8-NIBSC also denen von PR8-RKI an.

Im Hinblick auf die Optimierung von Prozessen zur Impfstoffproduktion ist diese Senkung der IFN-Induktion durch einen Virusstamm infolge einer Änderung des TCID₅₀/HA-Verhältnisses durchaus interessant. Ursache dafür ist wahrscheinlich eine Verringerung des Anteils an DI-Partikeln, deren DI-RNAs scheinbar einen wesentlichen Beitrag zur IFN-Induktion leisten. DI-Partikel entstehen vor allem durch seriell Passagieren bei hoher MOI (Marcus *et al.*, 2009; von Magnus, 1951). Am MPI ist bekannt, dass ein großer Pharmakonzern Influenza-Saatviren für die Impfstoffproduktion durch mehrmaliges Passagieren bei sehr geringer MOI an optimales Wachstum im jeweils genutzten Zellsubstrat adaptiert. Das Auftreten von DI-Partikeln ist bei dieser Art der Saatvirus-Optimierung unwahrscheinlich. Zudem werden bei der industriellen Impfstoffproduktion meist sehr geringe MOIs (10^{-4} bis 10^{-6}) verwendet, da so die höchsten Ausbeuten erzielt werden (Aggarwal *et al.*, 2011). Diese Autoren spekulierten ebenfalls, dass die Verwendung geringer MOIs den negativen Einfluss von DI-

Partikeln auf die Virusreplikation verhindert. Durch Optimierung von MOI und Saatvirus-Zusammensetzung wird somit bei industriellen Prozessen einem negativen Einfluss von DI-Partikeln bereits vorgebeugt. Unsere Daten zeigen aber darüber hinaus, dass die Optimierung des $TCID_{50}/HA$ -Verhältnisses bei Saatviren auch mit einer deutlichen Reduktion der IFN-Induktion einhergeht. Ein limitierender Einfluss der IFN-Antwort auf die Virusausbeute im Impfstoffprozess wird durch diese Maßnahmen damit ebenfalls reduziert oder sogar verhindert.

5.4 Unterdrückung der Interferonantwort

In diesem Kapitel sollte der Einfluss der IFN-Antwort auf die Virusreplikation untersucht werden. Zuvor wurde bereits für andere Viren gezeigt, dass die Überexpression viraler IFN-Antagonisten einen einfachen, aber effektiven Weg darstellt, die IFN-Induktion zu reduzieren und die Virusausbeute zu verbessern (de Vries *et al.*, 2008; Sherwood *et al.*, 2007; Young *et al.*, 2003). Entsprechend wurde hier untersucht, ob eine Unterdrückung der IFN-Antwort durch transiente Überexpression der viralen IFN-Antagonisten Influenza-Virus NS1, Tollwut-Virus P oder Ebola-Virus VP35 zu höheren Titern in MDCK-Zellen führt. An diesen Experimenten waren zwei Aspekte auffällig, die hier nacheinander diskutiert werden sollen. **(1)** Die drei IFN-Antagonisten unterschieden sich in ihrem Einfluss auf die Virusreplikation. So reduzierte die Transfektion von NS1 oder P die Aktivierung des IFN-Systems in beiden Fällen sehr effektiv, jedoch hatte NS1 einen viel stärkeren Einfluss auf die Virusreplikation. Transfektion des IFN-Antagonisten VP35 reduzierte die IFN-Antwort dagegen kaum und hatte keinen Einfluss auf den Titerverlauf. **(2)** Nur für delNS1, nicht jedoch für WT-Stämme, konnte durch Unterdrückung der IFN-Induktion eine Titersteigerung erreicht werden. Der inhibierende Einfluss der IFN-Antwort auf die Replikation von WT-Stämmen, wie sie bei der Impfstoffproduktion verwendet werden, schien damit gering.

(1) In Abbildung 4-12 fiel auf, dass die Transfektion von NS1 die Replikation von delNS1 erheblich stärker förderte als die Transfektion von P. Gleichzeitig trat für PR8-NIBSC nur in Zellen, die mit NS1 transfiziert wurden, ein schnellerer HA-Anstieg als in der Kontrolle auf. Transfektionen von NS1 und P reduzierten die IFN-Induktion jedoch vergleichbar effektiv (Abbildung 4-11). Damit konnte die bessere Replikation von PR8-delNS1 und PR8-NIBSC in NS1-transfizierten Zellen nicht ausschließlich auf NS1-vermittelte Unterdrückung der IFN-Induktion zurückgeführt werden. NS1 hat neben seiner Rolle als IFN-Antagonist weitere unterstützende Funktionen im viralen Replikationszyklus (Hale *et al.*, 2008). So scheint NS1 einen regulierenden Einfluss auf den Ablauf der viralen RNA-Replikation und -Transkription zu haben (Falcón *et al.*, 2004). Weiterhin vermittelt NS1 eine bevorzugte Translation viraler mRNAs (Burgui *et al.*, 2003). delNS1 verfügt über kein eigenes NS1 und für PR8-NIBSC wurden Mutationen im NS1 gefunden, die dessen Funktion beeinträchtigen könnten (vgl. 5.2). Für diese zwei Stämme führte die Transfektion eines intakten NS1 wahrscheinlich zu einem

effektiveren Ablauf der Virusreplikation und damit auch zu einem schnelleren HA-Anstieg (Abbildung 4-9 b+c, Abbildung 4-11c). Im Gegensatz dazu waren die Titerverläufe für WSN33 in NS1- und Leervektor-transfizierten Zellen identisch (Abbildung 4-9 d). Stämme, die wie WSN33 selbst über ein voll funktionsfähiges NS1 verfügen, sind daher offensichtlich auf die Funktionen des transfizierten NS1 nicht angewiesen.

Unabhängig davon könnte die Überexpression von NS1 aber auch eine frühe Aktivierung von PKR verhindert haben. PKR wird durch virale RNA aktiviert und verringert durch Phosphorylierung von eIF2 α die Protein-Translationsleistung der Zelle (García *et al.*, 2007). NS1 bindet an PKR und verhindert damit dessen Aktivierung (Min *et al.*, 2007). Für Rabies-Virus P ist dagegen keine direkte Wechselwirkung mit PKR bekannt (Rieder & Conzelmann, 2009). Inhibition oder Knock-Out von PKR fördert die Replikation von delNS1 in IFN-kompetenten Wirten (Bergmann *et al.*, 2000; Bergmann *et al.*, 2001). delNS1 könnte also auch hier von der PKR-Inhibition durch das transfizierte NS1 profitiert haben. PR8-NIBSC verfügt zwar über NS1, zeigte aber aus unbekanntem Gründen trotzdem eine starke PKR-Aktivierung (Heynisch *et al.*, 2010). Die Überexpression von NS1 vor der Infektion könnte diese PKR-Aktivierung inhibiert und dadurch den schnelleren HA-Anstieg in NS1-transfizierten Zellen ermöglicht haben.

Im Gegensatz zu NS1 und P reduzierte die Transfektion von VP35 die IFN-Antwort nur geringfügig und hatte keinen Einfluss auf die Replikation des WT-Stamms PR8-NIBSC. Basler *et al.* (2000) beobachteten jedoch ein verbessertes Wachstum von PR8-delNS1 in VP35-exprimierenden MDCK-Zellen. Für PR8-delNS1 wurde auch hier eine Verbesserung der Replikation in VP35-transfizierten MDCK-Zellen festgestellt (Daten nicht gezeigt). delNS1 ist allerdings aufgrund des fehlenden eigenen IFN-Antagonisten NS1 sehr IFN-anfällig (Egorov *et al.*, 1998; García-Sastre *et al.*, 1998) und profitiert daher möglicherweise selbst von einer geringfügigen Reduktion der IFN-Induktion durch VP35. Der in Abbildung 4-11 verwendete WT-Stamm PR8-NIBSC ist dagegen aufgrund des eigenen IFN-Antagonisten NS1 vermutlich nicht IFN-anfällig genug, um von dem geringen Effekt der VP35-Expression einen Replikationsvorteil zu haben.

(2) Durch Transfektion von PR8-NS1 oder P konnte die Aktivierung der IFN-Antwort bei der Influenza-Virusreplikation in MDCK-Zellen effektiv reduziert werden (Abbildung 4-10, Abbildung 4-11). NS1 hat jedoch neben seiner Funktion als IFN-Antagonist im Gegensatz zu P noch weitere Funktionen bei der Influenza-Virusreplikation. Der Einfluss einer Unterdrückung der IFN-Antwort auf die Virusproduktion in MDCK-Zellen konnte daher nur mit P eindeutig herausgearbeitet werden. Für den stark IFN-anfälligen PR8-delNS1 führte eine Verringerung der IFN-Induktion durch P zwar zu einer signifikanten, jedoch verhältnismäßig geringen Steigerung (um ca. 0,15 log HA / 100 μ L bzw. 40 % der HA-Aktivität, Abbildung 4-12) der Virusausbeute. Deutlich größere Titersteigerungen wären auf Grundlage der Literatur für diesen Stamm zu erwarten gewesen (Basler *et al.*, 2000; Egorov *et al.*,

1998; García-Sastre *et al.*, 1998; Kochs *et al.*, 2007b; Talon *et al.*, 2000b). Gleichzeitig erreichte PR8-delNS1 selbst in Leervektor-transfizierten MDCK-Zellen trotz starker Aktivierung des IFN-Systems noch akzeptable HA-Titer ($> 2,4 \log \text{ HA} / 100 \mu\text{L}$, Abbildung 4-9, Abbildung 4-21). Die IFN-Antwort scheint damit unter den hier verwendeten Infektionsbedingungen in MDCK-Zellen selbst für IFN-anfällige Influenza-Virusstämme nur einen geringen limitierenden Einfluss auf die Virusausbeute zu haben. Für die getesteten WT-Stämme führte die IFN-Unterdrückung durch P entsprechend zu keiner Verbesserung der Virusausbeute (Abbildung 4-11, Abbildung 4-12). Dieser geringe Einfluss der IFN-Antwort war zunächst unerwartet. In der Literatur finden sich diverse Arbeiten, in denen selbst für WT-Influenza-Stämme eine Verbesserung der Virusproduktivität durch Unterdrückung der IFN-Antwort demonstriert wird. In A549-Zellen konnte das Wachstum von PR8 durch Blockierung des IFNAR-Rezeptors deutlich gesteigert werden (Ehrhardt *et al.*, 2004). Hayman *et al.* (2007) erzielten in derselben Zelllinie für verschiedene humane und aviäre WT-Stämme vergleichbare Erfolge durch Expression des viralen IFN-Antagonisten NPro (vom Bovine-Virusdiarrhoe-Virus, BVDV). Der H7N7-Stamm SC35M replizierte deutlich besser in IFNAR- oder IFN- β -negativen embryonalen Mäusefibroblasten (Koerner *et al.*, 2007). Van Wielink *et al.* (2011) beobachteten allerdings in Übereinstimmung mit den hier erzielten Ergebnissen, dass in MDCK-Zellen die Überexpression von NS1 zwar zu einer gesteigerten Virusausbeute bei delNS1-Stämmen führt, jedoch auf WT-Stämme keinen positiven Effekt hat. Zudem bestätigten weitere Ergebnisse der Arbeitsgruppe den hier beobachteten, vergleichsweise vernachlässigbaren Einfluss der IFN-Antwort auf die Influenza-Virusreplikation in MDCK-Zellen. So wurden das Wachstum von PR8-NIBSC, PR8-RKI, WSN33 und B/Malaysia in IFN-stimulierten MDCK-Zellen untersucht (Frensing *et al.*, 2011; Seitz *et al.*, 2010). Unabhängig von MOI und Virusstamm führte eine starke IFN-Stimulation nur zu einer Verlangsamung der Virusproduktion zu Beginn der Infektion. Die finalen Virustiter unterschieden sich jedoch nicht zwischen stimulierten und nicht-stimulierten Zellen. Ein vergleichbares Ergebnis erzielten Zeng *et al.* (2007) für verschiedene H5N1 und H3N2-Stämme in IFN-stimulierten humanen Calu-3-Zellen. Dagegen wurde aber für PR8 auch von geringeren Virustitern in IFN-stimulierten A549- (Hayman *et al.*, 2006) und SJPL-Zellen (Seo *et al.*, 2002) berichtet. Das inhibitorische Potential des IFN-induzierten, antiviralen Status gegenüber Influenza-Virusinfektionen ist also scheinbar Zelltyp-abhängig. Für die hier verwendeten MDCK-Zellen wurde von unserer Arbeitsgruppe ein wesentlicher Faktor für den verhältnismäßig geringen Einfluss der IFN-Aktivierung auf die Influenza-Virusreplikation identifiziert. Sowohl in Influenza A- als auch Influenza B-Minireplicon-Systemen konnte für Mx1 und Mx2 aus MDCK-Zellen kein inhibierender Einfluss auf die virale Polymerase-Aktivität festgestellt werden (Frensing *et al.*, 2011; Seitz *et al.*, 2010). Mx-Proteine werden durch IFN induziert (Holzinger *et al.*, 2007). Für viele Spezies, z.B. Mensch, Maus, und Schwein sind diese Proteine der entscheidende, die Influenza-Virusreplikation inhibierende Bestandteil des IFN-

induzierten antiviralen Status (Haller *et al.*, 2009). Die fehlende anti-Influenza-Aktivität der MDCK Mx-Proteine schwächt den antiviralen Status dieser Zellen damit vermutlich erheblich. Das trägt sicherlich auch zu der außerordentlich hohen Permissivität von MDCK-Zellen für Influenza-Viren bei (Li *et al.*, 2009). Zwar verfügen MDCK-Zellen offenbar noch über weitere IFN-induzierte, antivirale Proteine. Schließlich ließ sich der finale Titer für delNS1 durch Unterdrückung der IFN-Antwort noch verbessern. Doch scheint deren Einfluss auf die Virusreplikation in Anbetracht der vergleichsweise niedrigen Titersteigerung selbst für delNS1 eher gering zu sein. Entsprechend berichten Arnheiter und Haller (1983), dass in Zellen ohne funktionales Mx der Aufbau eines effektiven, Influenza-Virusreplikation inhibierenden antiviralen Status erheblich länger dauert und größere IFN-Mengen erfordert als in Mx-positiven Zellen. Wie bereits diskutiert (vgl. 5.2, 5.3) ist bei der industriellen Impfstoffproduktion vermutlich nur eine schwache Aktivierung der IFN-Antwort zu erwarten. Hier werden entweder WT-Stämme oder HGRs mit funktionalem NS1 verwendet. Diese Stämme induzieren IFN sicherlich nicht ausreichend stark, um einen inhibitorisch wirksamen antiviralen Status in Mx-negativen MDCK-Zellen zu erzeugen. Dies wird auch von den hier für WT-Stämme diskutierten Daten bestätigt (Abbildung 4-9, Abbildung 4-12). Mit MDCK-Zellen hat sich für die Impfstoffproduktion demnach unwissentlich eine Zelllinie durchgesetzt, in der die IFN-Antwort aufgrund eines fehlenden funktionalen Mx-Proteins keinen negativen Einfluss auf die Virusausbeute hat.

5.5 Der Einfluss von Trypsin auf die IFN-Antwort

5.5.1 IFN-Signaltransduktion in Gegenwart und Abwesenheit von Trypsin

Um den Einfluss der Trypsinzugabe auf die IFN-Antwort und deren Wechselwirkung mit der Virusinfektion zu ermitteln, wurden zunächst IFN-Induktion und Virusreplikation in Gegenwart und Abwesenheit von Trypsin charakterisiert. In Abwesenheit von Trypsin wurden für PR8-NIBSC infizierte MDCK-Zellen bei qRT-PCR-Messung deutlich höhere Expressionslevel von IFN- β und Mx1 ermittelt (Abbildung 4-13c+d). Diese Verringerung der IFN-Antwort durch Trypsin konnte für diesen und andere Virusstämme im Western Blot bestätigt werden (vgl. 4.5.1.3). Die in unserer Arbeitsgruppe verwendete Trypsin Konzentration von 5 U/mL reduzierte die IFN-Antwort somit deutlich. Dieser Effekt war zuvor nicht bekannt. So wurden in den eingangs genannten Proteom-Studien, bei denen eine starke Mx1-Induktion in Influenza-virusinfizierten MDCK-Zellen auffiel und die eine Motivation für diese Arbeit darstellten (vgl. 1), auf die Verwendung von Trypsin verzichtet (Vester *et al.*, 2009; Vester *et al.*, 2010b). In anderen Arbeiten zur zellkulturbasierten Influenza-Impfstoffproduktion variieren die Angaben zur verwendeten Trypsinkonzentration in einem Bereich von 0,5 – 5 U/mL bzw. 0,45 – 4,5 μ g/mL (Genzel *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2008; Makizumi *et al.*, 2008; Pau *et al.*, 2001; Tree *et al.*, 2001). In weiteren Experimenten konnte hier gezeigt werden, dass selbst eine 10-fach

geringere Trypsinkonzentration (0,5 U/mL) die IFN-Antwort bei Infektionen mit PR8-NIBSC ebenso effektiv verringert wie 5 U/mL (Abbildung 4-14c-e). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass auch geringere, in der Literatur genannte Trypsinkonzentrationen die IFN-Signaltransduktion beeinträchtigen. Außerdem reduzierten alle Trypsinkonzentrationen, die eine effektive HA-Spaltung gewährleisten, auch die IFN-Antwort (Abbildung 4-14). In unserer Arbeitsgruppe wurde beobachtet, dass die Trypsinkonzentration für jede Zelllinie und jedes verwendete Medium individuell optimiert werden muss. Dies ist vermutlich auch die Ursache für die variierenden Angaben zur Trypsinkonzentration in der Literatur. Ziel der Optimierung der Trypsinkonzentration ist aber immer, eine effektive HA-Spaltung und dadurch schnelles Viruswachstum und hohe Virustiter zu erreichen. Damit ist es sehr wahrscheinlich, dass auch für andere Systeme optimierte Trypsinkonzentrationen die IFN-Antwort reduzieren.

In Abwesenheit von Trypsin wurden geringere Virusausbeuten beobachtet (Abbildung 4-13b, Abbildung 4-14b). Fehlende HA-Spaltung in Abwesenheit von Trypsin konnte nicht die Ursache dafür sein. In Übereinstimmung mit vorangegangenen Arbeiten wurde in der hier verwendeten MDCK-Zelllinie eine moderate, zellassozierte HA-Spaltung beobachtet (Noma *et al.*, 1998). Dementsprechend wurde bei Messung des Infektionsgrades mittels Durchflusszytometrie auch ohne Trypsinzugabe eine zwar zeitlich verzögerte, aber dennoch vollständige Infektion aller Zellen beobachtet (Abbildung 4-13e). Die geringeren Virustiter in trypsinfreien Infektionen gehen damit eventuell eher auf die stärkere IFN-Aktivierung zurück. Eine langsamere Ausbreitung der Virusinfektion in Kombination mit einer stärkeren IFN-Antwort könnte das inhibitorische Potential des antiviralen Status vergrößert haben (Grimm *et al.*, 2007; Young *et al.*, 2009). Zudem korrelierte die stärkere IFN-Aktivierung mit schnellerer Apoptose-Induktion (Abbildung 4-13e). Schnellere Apoptose-Induktion bei gleichzeitig langsamer Ausbreitung der Infektion reduziert die Zeit, die für effiziente Replikation der Influenza-Viren zur Verfügung steht (Schulze-Horsel *et al.*, 2009). Dies könnte ebenfalls für die geringeren Virusausbeuten in Abwesenheit von Trypsin verantwortlich sein. Neben seiner Rolle für die HA-Aktivierung senkt Trypsin bei der Influenza-Impfstoffherstellung also auch die IFN-Induktion und reduziert die negativen Folgen der antiviralen Antwort der Zellen für die Virusreplikation.

5.5.2 Die Ursache für die Reduktion der IFN-Antwort in Gegenwart von Trypsin

Als erste, auf der Hand liegende Ursache für die geringere IFN-Antwort in Gegenwart von Trypsin wurde überprüft, ob Trypsin IFN proteolytisch degradiert. Es war bereits bekannt, dass Mensch-, Maus- und Hühner-IFN durch Inkubation mit Trypsin seine antivirale Aktivität verliert (Buckler & Baron, 1966; Isaacs & Burke, 1959; Ramon *et al.*, 2005). In dieser Arbeit konnte mittels Western Blot nachgewiesen werden, dass die Inkubation von delNS1-CM mit 5 U/mL Trypsin zu einer effizienten

Degradation von IFN- β führt. Entsprechend konnte in so behandeltem CM keine nennenswerte IFN-Aktivität mehr nachgewiesen werden. Selbst mit deutlich geringeren Trypsinkonzentrationen (bis zu 0,625 U/mL) konnte noch ein vergleichbarer Effekt erzielt werden. Trypsin degradiert also selbst in den geringen, bei der Impfstoff-Herstellung verwendeten Konzentrationen effektiv Virus-induziertes MDCK-IFN. Darüber hinaus zeigte sich bei der Analyse von trypsinbehandeltem delNS1-CM in der SDS-PAGE, dass auch weitere Proteine im Medium durch Trypsin abgebaut werden. Möglicherweise sind darunter weitere Cytokine, so dass Trypsin neben der IFN-Antwort auch andere parakrine Signaltransduktions-Prozesse während der Virusinfektion beeinträchtigt.

Neben proteolytischem IFN-Abbau vermittelt Trypsin aber auch eine schnelle Ausbreitung der Virusinfektion. Durch schnellen Fortschritt der Infektion werden die Induktion der IFN-Antwort sowie die Aktivierung positiver Feedback-Mechanismen des IFN-Systems möglicherweise frühzeitig durch virales NS1 unterbunden. Trypsinvermittelte, schnelle Ausbreitung der Virusinfektion könnte demnach ebenfalls die IFN-Antwort reduzieren. Um dies zu prüfen, wurde Trypsin durch die Transmembran-Protease Serine 2 (TMPRSS2) ersetzt. TMPRSS2 ermöglichte eine trypsinunabhängige Spaltung des HAs (Abbildung 4-18a; Böttcher *et al.*, 2006), ohne gleichzeitig IFN proteolytisch zu degradieren (Abbildung 4-18b). In Abwesenheit von Trypsin verbesserte die Transfektion von TMPRSS2 die HA-Spaltung und führte zu einem schnelleren Anstieg des HA-Titers (Abbildung 4-19a). Diese TMPRSS2-vermittelte, schnellere Infektionsdynamik reduzierte zwar die primäre Induktion von IFN- β in Abwesenheit von Trypsin (Abbildung 4-19b), senkte aber die Expression von ISGs nur unwesentlich (Abbildung 4-19c). Um die IFN-Signaltransduktion zu unterdrücken, blockieren Influenza-Viren fast ausschließlich die primäre Aktivierung der IFN-Expression. Daher reduziert die TMPRSS2-vermittelte, schnelle Ausbreitung der Virusinfektion und die damit verbundene Expression viraler IFN-Antagonisten in den Zellen scheinbar nur die IFN-Induktion, aber nicht die anschließende Aktivierung des antiviralen Status (Mx1) durch das produzierte IFN. Trypsin ermöglicht ebenfalls eine schnelle Ausbreitung der Infektion, kann aber durch proteolytischen Abbau des sekretierten IFNs auch mit der Aktivierung des antiviralen Status interferieren. Zudem verhinderte der IFN-Abbau wahrscheinlich die Aktivierung positiver Feedback-Mechanismen im IFN-System, was zu dem geringeren Expressionslevel von IFN- β in Anwesenheit von Trypsin beitragen könnte (Abbildung 4-19b). Der proteolytische Abbau von IFN ist also entscheidend für die geringere IFN-Aktivierung in Gegenwart von Trypsin.

Um dies zu bestätigen, wurde in einem entgegengesetzten Ansatz untersucht, ob eine Verlangsamung der Infektionsdynamik in Gegenwart von Trypsin zu einer stärkeren IFN-Aktivierung führt. Durch Einsatz des Neuraminidase-Inhibitors Zanamivir konnte der Anstieg des HA-Titers in Anwesenheit von Trypsin in vergleichbarer Weise verzögert werden, wie es in Abwesenheit von Trypsin beobachtet wurde. In Gegenwart von Trypsin führte die durch Zanamivir verlangsamte

Infektionsdynamik zu einer stärkeren IFN- β -Induktion (Abbildung 15b). Die Mx1-Expression war gleichzeitig ebenfalls geringfügig erhöht. Mit Zanamivir wurden die positiven Feedback-Mechanismen des IFN-Systems also tatsächlich etwas stärker aktiviert. Dieser Effekt wird beim IFN- β deutlicher als beim Mx1. Positive Feedback-Mechanismen, wie z.B. gesteigerte Expression von IRF7 (Honda *et al.*, 2005) und RIG-I (Yoneyama *et al.*, 2004) wirken sich direkt auf die Expression von IFN- β aus, wogegen die Expression von Mx1 nur indirekt durch höhere IFN-Level von diesen Mechanismen betroffen ist. In Abwesenheit von Trypsin war die IFN-Antwort trotz vergleichbarer Infektionsdynamik aber immer noch stärker als bei Verwendung von Zanamivir und Trypsin. Der proteolytische IFN-Abbau durch Trypsin hält also auch bei Verlangsamung der Infektionsdynamik die Aktivierung des IFN-Systems auf einem verhältnismäßig niedrigen Level. In Übereinstimmung mit den zuvor mit TMPRSS2 erzielten Ergebnissen verdeutlicht dieses Experiment damit erneut, dass der proteolytische Abbau von IFN der bestimmende Faktor für die Verringerung der IFN-Antwort durch Trypsin ist. Der Einfluss der Infektionsdynamik ist im Vergleich dazu gering.

5.5.3 Bedeutung von trypsinvermittelter, schneller Infektionsdynamik und IFN-Abbau für die Virusproduktion

5.5.3.1 Die Bedeutung von Trypsin für die Replikation von delNS1 in MDCK-Zellen

Um zu ermitteln, ob Trypsin das inhibitorische Potential des antiviralen Status der Zellen für die Virusreplikation reduziert, wurde zunächst das Wachstum von PR8-delNS1 in MDCK-Zellen in Gegenwart und Abwesenheit von Trypsin untersucht. Da diesem Stamm der IFN-Antagonist NS1 fehlt, sollte sich die Rolle von Trypsin in diesem Kontext eindeutig zuordnen lassen.

Obwohl dieser Stamm zuvor als stark anfällig gegenüber IFN beschrieben wurde (Egorov *et al.*, 1998; García-Sastre *et al.*, 1998), erreichte er hier in IFN-kompetenten MDCK-Zellen in Gegenwart von Trypsin akzeptable Titer (2,8 log HA / 100 μ L, Abbildung 4-21). Diese ließen sich in Anwesenheit von Trypsin durch Transfektion der viralen IFN-Antagonisten P und NS1 nur noch geringfügig steigern. Wie bereits diskutiert (vgl. 5.4) hatte IFN also in Anwesenheit von Trypsin nur einen geringen inhibitorischen Einfluss auf die Replikation von delNS1. In Abwesenheit von Trypsin wurde dagegen nur ein finaler Titer von 0,6 log HA / 100 μ L erreicht. Der Verzicht auf Trypsin beeinträchtigte das Wachstum dieses Stammes damit deutlich stärker als zuvor für PR8-WT-Stämme beobachtet wurde (Abbildung 4-13b, Abbildung 4-19a). Der virale IFN-Antagonist NS1 scheint also für das Viruswachstum in Abwesenheit von Trypsin eine entscheidende Rolle zu spielen. Wurde die IFN-Antwort unter diesen Bedingungen durch Transfektion von P unterdrückt, konnte dementsprechend eine moderate Titerverbesserung für delNS1 beobachtet werden. IFN war damit eindeutig für die Beeinträchtigung der Replikation dieses Stammes in Abwesenheit von Trypsin verantwortlich.

Transfektion von NS1 verbesserte das Virus-Wachstum von delNS1 in Abwesenheit von Trypsin aber noch deutlich stärker als die Transfektion von P. Gleichzeitig wurde aber in NS1-transfizierten Zellen eine stärkere maximale Aktivierung von IFN- β als in der zugehörigen Kontrolle beobachtet. Weiterhin war die maximale Expression von Mx1 in NS1-transfizierten Zellen und der Kontrolle vergleichbar hoch. Diese ähnlich starke Aktivierung des antiviralen Status in NS1-transfizierten Zellen und der Kontrolle scheint im Widerspruch zu den höheren Virustitern in NS1-transfizierten Zellen zu stehen. Derselbe Widerspruch trat auch beim Vergleich der Kontrollen mit und ohne Trypsin auf. Mit Trypsin wurden deutlich höhere Virustiter bei gleichzeitig stärkerer maximaler Induktion von IFN- β und vergleichbarer Aktivierung von Mx1 beobachtet. Wie bereits diskutiert (vgl. 5.3) ist die Virusreplikation die treibende Kraft für die IFN- β -Induktion. Da delNS1 keinen eigenen IFN-Antagonisten exprimiert, führte die Verbesserung der Virusreplikation durch Trypsin oder NS1 somit gleichzeitig zu einer stärkeren IFN- β -Aktivierung. Eine Steigerung der Mx1-Expression trat infolge dessen aber nicht ein, da wahrscheinlich bereits in der Kontrolle ohne Trypsin die maximal mögliche Mx1-Aktivierung erreicht worden war.

Das Level der IFN-Antwort korrelierte damit nicht uneingeschränkt mit dem inhibitorischen Potential für die Virusreplikation. Vielmehr schien das zeitliche Zusammenspiel von Virusreplikation und IFN-Induktion den Einfluss des antiviralen Status der Zellen auf die Virusinfektion zu bestimmen. In der Kontrolle ohne Trypsin wurde das Maximum der Mx1-Expression bereits 16 h p.i. erreicht. Sowohl bei Transfektion von NS1 als auch bei Zusatz von Trypsin trat die maximale Mx1-Expression dagegen erst 24 h p.i. ein. Der antivirale Status wurde damit trotz der geringeren Induktion von IFN- β in der Kontrolle ohne Trypsin am frühesten aktiviert. Trypsin verzögerte diese Aktivierung wahrscheinlich durch proteolytischen IFN-Abbau, wogegen NS1 vermutlich die initiale Aktivierung von IFN- β nach der Infektion verlangsamte. Gleichzeitig zeigten die HA-Verläufe, dass Trypsin und NS1 beide die Infektionsdynamik beschleunigten. Im Fall von Trypsin ist effektivere HA-Spaltung dafür verantwortlich. Die Anwesenheit von NS1 fördert, wie bereits diskutiert (vgl. 5.4), auch unabhängig von der Unterdrückung der IFN-Antwort die Virusreplikation. So steigerte die Transfektion NS1 das mRNA-Level für virales M1 verglichen mit P oder der Kontrolle erheblich. Erst vor kurzem wurde eine regulatorische Rolle von NS1 beim Splicing viraler mRNAs von Segment 7 beschrieben (Robb & Fodor, 2012). Hier bewirkte diese effektivere Replikation von delNS1 in NS1-transfizierten Zellen offenbar auch eine Beschleunigung der Virusproduktion und damit der Ausbreitung der Infektion. Schnelle Virusreplikation wurde in der Literatur bereits als eine Möglichkeit für Viren beschrieben, die antivirale IFN-Antwort zu umgehen (Grimm *et al.*, 2007; Young *et al.*, 2009). Im Fall von Trypsin oder NS1 wird wahrscheinlich durch die schnelle Ausbreitung der Virusinfektion bei gleichzeitiger verzögerter Aktivierung der antiviralen Abwehr das Zeitfenster maximiert, in dem das Virus ungehemmt replizieren kann. Im Gegensatz dazu verkürzt sich diese Zeit in der Kontrolle ohne

Trypsin durch die Kombination von langsamerer Ausbreitung der Infektion und schnellerer Aktivierung der Pathogenabwehr drastisch.

Zusammenfassend hatte die alleinige Unterdrückung der IFN-Antwort durch P einen viel geringeren replikationsfördernden Effekt als die durch NS1 vermittelte Kombination aus IFN-Unterdrückung und beschleunigter Replikationsdynamik. Trypsin stellt sowohl eine schnelle Ausbreitung der Virusreplikation durch effiziente HA-Spaltung als auch eine Hemmung der antiviralen Antwort der Zellen durch proteolytischen IFN-Abbau sicher. Dadurch ermöglicht Trypsin das robuste Wachstum von delNS1 in IFN-kompetenten MDCK-Zellen.

5.5.3.2 Trypsinvermittelte Überwindung des IFN-induzierten, antiviralen Status in Influenza-virusinfizierten MDCK-Zellen

Die zuvor diskutierten Daten belegen, dass Trypsin den negativen Einfluss der IFN-Antwort auf die Virusreplikation in MDCK-Zellen reduziert. Dies konnte in einem weiteren Experiment bestätigt werden. Darin wurde der Einfluss einer starken IFN-Stimulation der Zellen vor und während der Infektion auf die Virusreplikation von WSN33 in Gegenwart von Trypsin, FCS oder bei Verzicht auf Proteasezusatz untersucht. Plasmin aus FCS ermöglicht trypsinunabhängige HA-Spaltung für WSN33 und zeigte in dieser Arbeit keinen proteolytischen Abbau von extrazellulärem IFN. Stimulation der Zellen mit IFN-haltigem CM bewirkte eine bei weitem stärkere Aktivierung von Mx1 als sonst bei Infektionen mit WSN33 beobachtet wurde. Wurde bei der Infektion Trypsin verwendet, nahm diese starke Mx1-Aktivierung infolge des IFN-Abbaus schnell ab. Basierend auf Frensing *et al.* (2011) war jedoch davon auszugehen, dass die Mx1-Proteinlevel in den ersten 24 h p.i. deutlich höher blieben als bei nicht-stimulierten Infektionen. Der CM-induzierte antivirale Status blieb also trotz proteolytischen Abbaus des zur Stimulation verwendeten IFNs durch Trypsin in Teilen erhalten. Wurde FCS oder keine Protease bei der Infektion verwendet, blieb die CM-induzierte Mx1-Expression auf deutlich höherem Niveau als mit Trypsin, nahm jedoch auch im Verlauf der Infektion ab. Zelluläre Mechanismen zur Abschaltung der IFN-Aktivität (z.B. Aktivierung von SOCs) oder virusvermittelte Reduktion der zellulären Gen- und ISG-Expression könnten für diese Abnahme verantwortlich sein (Jia *et al.*, 2010; Kochs *et al.*, 2007a; Pauli *et al.*, 2008).

Der inhibitorische Einfluss der IFN-Stimulation war am stärksten, wenn bei der Infektion keine Protease zugesetzt wurde. Im Vergleich dazu verbesserte FCS und in noch stärkerem Maße Trypsin die Virusreplikation in IFN-stimulierten Zellen. Eine schnelle Ausbreitung der Virusinfektion förderte also auch unabhängig von proteolytischer IFN-Degradation die Virusreplikation in IFN-stimulierten Zellen. Der Mechanismus dafür ist nicht bekannt, könnte aber mit der Dauer der IFN-Stimulation vor der Infektion zusammenhängen. Während der Impfstoffproduktion steht den Zellen durch die sehr schnelle Virusreplikation in MDCK-Zellen (Ueda *et al.*, 2008) nur wenig Zeit zum Aufbau des antiviralen Status zur Verfügung. Um dem Rechnung zu tragen, wurden die Zellen vor der Infektion

nur für 5 h stimuliert, was für eine starke Aktivierung von Mx1 auf Proteinebene ausreichte (Frensing *et al.*, 2011). In vorangegangenen Arbeiten wurde aber von einer zeit- und dosisabhängigen Aktivierung des IFN-induzierten antiviralen Status berichtet (Qiao *et al.*, 2010), und dessen inhibitorisches Potential für die Influenza-Virusreplikation nahm mit der Dauer der Stimulation (bis zu 18 h; Arnheiter & Haller, 1983) zu. Daher könnte der antivirale Status hier zum Zeitpunkt der Infektion sein volles Potential noch nicht erreicht gehabt haben. Eine langsame Ausbreitung der Virusinfektion würde in diesem Fall mehr Zeit für den weiteren Aufbau des antiviralen Status zur Verfügung stellen. Daraus konnte gefolgert werden, dass Trypsin durch das Ermöglichen einer schnellen Ausbreitung der Virusinfektion den inhibitorischen Einfluss der IFN-Antwort reduziert. Durch proteolytischen Abbau von IFN wird dieser Effekt weiter verstärkt. Dieses Ergebnis stimmt mit den zuvor diskutierten Daten überein. Die Überexpression von NS1 förderte die Replikation von delNS1 in MDCK-Zellen in Abwesenheit von Trypsin sowohl durch Unterdrückung der IFN-Antwort als auch durch Beschleunigung der Infektionsdynamik.

5.5.4 Bedeutung der Ergebnisse für die Impfstoffproduktion in MDCK-Zellen

Um die wesentlichen Schlussfolgerungen dieses Kapitels zum Einfluss von Trypsin auf die IFN-Antwort und deren inhibitorisches Potential für die Virusreplikation anschaulich zusammenzufassen, sind in Abbildung 5-2 die Verläufe der IFN- β - und Mx1-Expression, der Ausbreitung der Virusinfektion, der Apoptose-Induktion und des HA-Titers bei einer PR8-NIBSC Infektion (MOI 0,025) in Gegenwart von Trypsin vergleichend dargestellt. Diese Daten sind zum Teil bereits in Abbildung 4-13 eingeflossen und wurden hier lediglich zum besseren Vergleich in anderer Form nochmal separat dargestellt. Infolge der Trypsinzugabe schritten die Ausbreitung der Virusinfektion und die IFN-Induktion nach der Infektion vergleichbar schnell voran. 16 h p.i. (MOI 0,025) waren alle Zellen infiziert und gleichzeitig wurde die maximale Aktivierung von IFN- β und Mx1 beobachtet. Das verdeutlicht, dass den Zellen nur sehr wenig Zeit zur Verfügung steht, um auf sekretiertes IFN zu reagieren, bevor sie infiziert werden. In infizierten Zellen können Influenza-Viren auf verschiedene Weise den Aufbau des antiviralen Status behindern (vgl. 2.3.4). Weiterhin begannen die Zellen bereits 24 h p.i. in Apoptose zu gehen. Die Apoptose-Induktion begrenzt die Lebensdauer infizierter Zellen und damit sowohl die Zeit, in der die Zellen Viren produzieren als auch die Zeit, in der IFN die Virusreplikation inhibieren kann. Arnheiter und Haller (1983) berichten, dass in Mx-positiven, murinen Zellen zwar bereits eine 6-stündige Stimulation mit 1000 U/mL IFN den Influenza-Virustiter um Faktor 1000 verringerte. Dieselbe IFN-Menge konnte den Virustiter in Mx-negativen Zellen aber selbst nach 18 h Stimulation nur um Faktor 10 reduzieren. Unsere MDCK-Zellen besitzen kein funktionales Mx (Frensing *et al.*, 2011; Seitz *et al.*, 2010). Damit wäre in unserem System nur unter zwei Voraussetzungen ein inhibitorischer Einfluss der IFN-Antwort zu erwarten: (1) Es müssen große

Mengen IFN produziert werden. (2) Es muss eine lange Zeit für die Zellen zur Verfügung stehen, um auf IFN zu reagieren. Die Daten in Abbildung 5-2 belegen eindeutig, dass vergleichbar lange Zeiträume, wie sie bei Arnheiter und Haller (1983) zur Aktivierung des antiviralen Status beschrieben wurden, hier während der Virusinfektion nicht zur Verfügung standen. Zusätzlich wurde sicherlich auch die von Arnheiter und Haller (1983) verwendete hohe IFN-Menge (1000 U/mL) hier mit Abstand nicht erreicht. Zwar wurden im Rahmen dieser Arbeit keine IFN-Konzentrationen in U/mL bestimmt. Jedoch wurde in Abbildung 5-2 nur eine relativ geringe maximale Mx1-Aktivierung beobachtet (16 h p.i., etwa 9-fach stärker als zu Beginn der Infektion). Diese war bereits 24 h p.i. wieder auf das Niveau zu Beginn der Infektion gefallen. Das zeigt, dass während der Infektion nur geringe Mengen IFN im Medium vorlagen. Proteolytischer Abbau von IFN durch Trypsin war dafür sicherlich verantwortlich.

MDCK-Zellen vertragen höhere Trypsinkonzentrationen als andere Zelllinien. Bis zu 160 µg/mL Trypsin wurden bereits bei Influenza-Virusinfektionen in MDCK-Zellen eingesetzt (Yamaoka *et al.*, 1995). Diese hohe Trypsintoleranz ermöglicht es, bei der Impfstoffproduktion durch stammspezifische

Optimierung der Trypsinkonzentration schnelles Viruswachstum und hohe Prozessausbeuten zu erzielen (Genzel & Reichl, 2009; Le Ru *et al.*, 2010; Pau *et al.*, 2001). Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass derartige, häufig auf Erfahrung beruhende Optimierungsmaßnahmen zur Verkürzung der Prozesszeiten (z.B. Adaptation der Viren an schnelle Replikation, Anpassung der MOI) gleichzeitig einem negativen Einfluss der zellulären Pathogenabwehr auf die Prozessausbeuten vorbeugen. Mit der hier verwendeten Trypsinkonzentration von 5 BAEE U/ml Trypsin konnte sogar ein robustes Wachstum von delNS1 in IFN-kompetenten MDCK-Zellen erzielt werden. Wegen seiner hohen Anfälligkeit gegen IFN stellt dieser Stamm ein vielversprechendes Backbone für attenuierte Lebendimpfstoffe dar und wird meist in Vero-Zellen produziert (Romanova *et al.*, 2009). Vero-Zellen

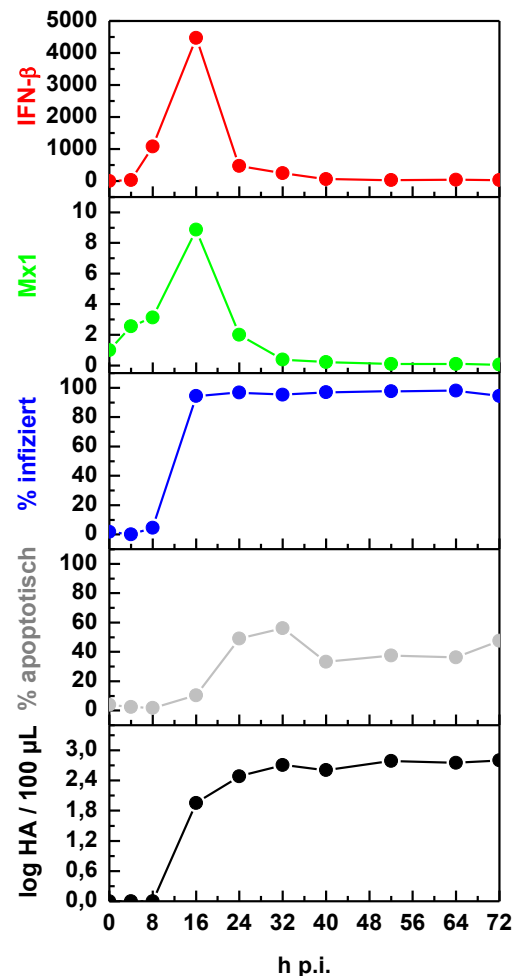


Abbildung 5-2: Zeitlicher Verlauf der IFN-Induktion, Virusinfektion, Apoptose-Induktion und Virusproduktion bei Verwendung von Trypsin. MDCK-Zellen wurden mit PR8-NIBSC (MOI 0,025) unter Zugabe von Trypsin infiziert. Die Expression von IFN- β und Mx1 wurde mittels qRT-PCR relativ zum Zeitpunkt $t = 0$ bestimmt. Die Ausbreitung der Virusinfektion und die Apoptose-Induktion wurden mit Durchflusszytometrie analysiert. Die Unterscheidung zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen erfolgte anhand einer NP-Färbung und zwischen normalen und apoptotischen Zellen mit dem TUNEL-Assay.

produzieren kein IFN (Desmyter *et al.*, 1968; Diaz *et al.*, 1988). Aber auch WT-Influenza-Virusstämme variieren sowohl in ihrer Anfälligkeit gegenüber IFN, als auch in IFN-Induktion und IFN-Unterdrückung bei der Infektion. Hier induzierte WSN33 IFN nur schwach (Abbildung 4-5) und war gleichzeitig verhältnismäßig unanfällig selbst für hohe IFN-Level (vgl. Abbildung 4-22). In Abwesenheit von Trypsin war das Wachstum dieses Stammes nur wenig beeinträchtigt und selbst in IFN-stimulierten MDCK-Zellen wurde unter diesen Bedingungen noch ein HA-Titer von 2,1 log HA / 100 µL erreicht. Der stärker IFN-induzierende PR8-NIBSC-Stamm (Abbildung 4-5 c+d) zeigte dagegen in Abwesenheit von Trypsin deutlich reduzierte Virusaussbeuten (Abbildung 4-13b). Wurde Trypsin verwendet, waren die finalen Virustiter für WSN33 und PR8-NIBSC vergleichbar. Bei der Impfstoffherstellung kann eine optimierte Trypsinkonzentration damit wahrscheinlich durch proteolytischen IFN-Abbau wechselnde IFN-Level kompensieren und so stammunabhängig gutes Viruswachstum ermöglichen. Dieser Effekt könnte auch zu den hervorragenden Eigenschaften von MDCK-Zellen bei der Primärisolation von Influenza-Viren in Gegenwart von Trypsin beitragen (Tobita *et al.*, 1975). Trotzdem wird die Verwendung von Trypsin bei der Influenza-Impfstoffproduktion kontrovers diskutiert. Die Verwendung von Produkten tierischen Ursprungs wird allgemein bei der Impfstoffproduktion als Sicherheitsrisiko angesehen (Audsley & Tannock, 2008; Merten, 2000). So stellt aus tierischen Bauchspeicheldrüsen aufgereinigtes Trypsin eine potentielle Quelle für die Kontamination des Influenza-Impfstoffs mit Fremderregern (adventitious agents) dar. In porcinem Trypsin wurden bereits Torque-Teno-Viren nachgewiesen (Kekarainen *et al.*, 2009). Daher gibt es Bestrebungen, tierisches Trypsin durch Proteasen mit vergleichbarer proteolytischer Aktivität aus anderen Quellen als Säugetieren zu ersetzen (Uytdehaag *et al.*, 2007). Bei der Auswahl alternativer Proteasen sollte jedoch nicht nur die Effizienz der HA-Spaltung, sondern auch der Einfluss dieser Proteasen auf die IFN-Antwort der Zellen als Entscheidungskriterium experimentell überprüft werden. Die Daten dieser Arbeit legen schließlich nahe, dass Trypsin auf einfache Weise einem negativen Einfluss der IFN-Antwort bei der Influenza-Impfstoffproduktion in MDCK-Zellen vorbeugt. Durch trypsinvermittelte, schnelle Infektionsdynamik und proteolytischen IFN-Abbau bleibt der inhibitorische Einfluss Wirtszell-Pathogenabwehr gering. Dadurch stellt Trypsin optimale Bedingungen für hohe Virusaussbeuten bei der Impfstoffproduktion sicher.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte ermittelt werden, ob die antivirale IFN-Antwort einen limitierenden Einfluss auf die Influenza-Impfstoffproduktion in MDCK-Zellen hat. Zunächst wurde die Aktivierung der IFN-Antwort durch PR8-delNS1 sowie die WT-Stämme PR8-NIBSC, PR8-RKI und WSN33 in MDCK-Zellen charakterisiert. A/PR/8/34 wird bei der Impfstoffproduktion als Backbone für die Herstellung von HGRs verwendet und war daher von besonderem Interesse. PR8-delNS1 zeigte infolge des fehlenden viralen IFN-Antagonisten NS1 eine starke Aktivierung der IFN-Antwort. Bei der Impfstoffproduktion werden jedoch NS1-kompetente Stämme eingesetzt. Von den hier verwendeten WT-Stämmen wurde nur bei PR8-NIBSC eine deutlich messbare Induktion des IFN-Systems beobachtet, jedoch blieb diese bereits wesentlich geringer als bei PR8-delNS1. Verglichen mit PR8-NIBSC fiel die Aktivierung der antiviralen Antwort bei PR8-RKI und WSN33 noch erheblich schwächer aus.

Auffällig war bei diesem Experiment, dass die beiden PR8-Stämme PR8-NIBSC und PR8-RKI sich bei der Induktion der IFN-Antwort unterschieden. Sequenzvergleiche zwischen PR8-NIBSC und PR8-RKI zeigten, dass PR8-NIBSC einen Aminosäure-Austausch im NS1 aufweist, der gemäß der Literatur zu stärkerer IFN-Induktion führt. Daneben war aber auch auffällig, dass PR8-NIBSC ein deutlich schlechteres Verhältnis von infektiösen zu nicht-infektiösen Viruspartikeln aufwies als PR8-RKI. PR8-NIBSC Infektionen bei hoher MOI (MOI 1) lieferten Hinweise auf die Identität dieser nicht-infektiösen Partikel. Unter diesen Bedingungen fand zwar ein Anstieg des HA-Titers, nicht jedoch des TCID₅₀ statt. Die fehlende Produktion infektiöser Viren bei hoher MOI deutete klar auf die Anwesenheit von DI-Partikeln hin. DI-Partikel können in Zellen nur bei gleichzeitiger Ko-Infektion mit einem infektiösen Partikel replizieren. Durch Passagieren des Virus bei sehr geringer MOI können DI-Partikel daher „ausverdünnt“ werden. Auf diese Weise konnte durch einfaches Passagieren von PR8-NIBSC bei sehr geringer MOI (MOI 0,000025) der Anteil nicht-infektiöser Partikel erheblich verringert werden. Infektionen mit diesem neuem PR8-NIBSC Saatvirus wiesen auch bei MOI 1 einen klareren Anstieg sowohl des TCID₅₀ als auch des HA-Titers auf. Außerdem zeigte dieses neue NIBSC-Saatvirus im Gegensatz zu dem Ausgangsvirus nur noch eine schwache Induktion der IFN-Antwort. Die Verringerung des Anteils von DI-Partikel im Saatvirus war wahrscheinlich dafür verantwortlich. Für DI-Partikel wurde vor kurzem ein wesentlicher Beitrag zur IFN-Induktion beschrieben (Baum & García-Sastre, 2011). Die Ergebnisse zeigen damit eindeutig, dass der höhere Anteil nicht-infektiöser Viruspartikel bei PR8-NIBSC zu der, verglichen mit PR8-RKI, stärkeren Aktivierung des IFN-Systems wesentlich beigetragen hat. Wurden hohe Anteile nicht-infektiöser Partikel, insbesondere von DI-Partikeln, im Saatvirus vermieden, induzierten beide PR8-Stämme das IFN-System nur schwach. Entsprechend ist auch bei Verwendung von PR8-basierten Reassortanten in der Impfstoffproduktion nur mit einer geringen Aktivierung der antiviralen Antwort der Wirtszelle zu rechnen.

Als nächstes wurde untersucht, ob eine Unterdrückung der IFN-Antwort durch Transfektion der viralen IFN-Antagonisten Influenza A-Virus NS1, Tollwut-Virus P und Ebola-Virus VP35 in MDCK-Zellen zu höheren Virusausbeuten führt. qRT-PCR Messung der Expression von IFN- β und Mx1 zeigte, dass die Transfektion von NS1 und P, nicht jedoch von VP35 die Aktivierung der IFN-Antwort in Influenza-virusinfizierten MDCK-Zellen effektiv reduzierte. Bei PR8-delNS1 führte die Unterdrückung der IFN-Induktion durch Transfektion von NS1 oder P zu signifikant höheren HA-Titern. Für verschiedene WT-Stämme (PR8-NIBSC, PR8-RKI, WSN33, B-Malaysia) trat jedoch keine Titerverbesserung durch Antagonisten-Transfektion ein. Dieses Ergebnis war unabhängig von der verwendeten MOI. WT-Stämme scheinen die IFN-Expression nicht stark genug zu induzieren bzw. über ihr NS1 ausreichend effektiv zu unterdrücken, so dass die IFN-Antwort keinen limitierenden Einfluss auf ihre Replikation hat.

Eine Ursache für diesen geringen Einfluss der IFN-Antwort auf die Replikation von Influenza-Viren in MDCK-Zellen wurde in dieser Arbeit identifiziert. Um die effektive Spaltung des viralen HAs und damit die Ausbreitung der Virusinfektion bei geringer MOI zu ermöglichen, enthält das bei der Virusinfektion verwendete Medium in geringen Konzentrationen porkines Trypsin. Bei Verzicht auf Trypsin wird HA zwar in den hier verwendeten MDCK-Zellen noch zellassoziiert gespalten. Diese Form der HA-Spaltung ist aber weniger effektiv als durch Trypsin, so dass der Verzicht auf Trypsin den Fortschritt der Virusinfektion verlangsamt. Interessanterweise traten in Abwesenheit von Trypsin eine deutlich stärkere IFN- und Apoptoseinduktion sowie deutlich geringere Virusausbeuten auf. Proteolytischer Abbau von IFN wurde als Ursache für diese schwächere IFN-Induktion in Gegenwart von Trypsin identifiziert. So konnte nach Inkubation von IFN-haltigem Medium mit der bei der Virusinfektion verwendeten Trypsinkonzentration (5 BAEE U/mL) eine erhebliche Abnahme der IFN-Aktivität beobachtet werden und IFN- β war im Western Blot nicht mehr detektierbar. Selbst 10-fach geringere Trypsinkonzentrationen waren ausreichend, um IFN effektiv zu degradieren.

Dieser trypsinvermittelte proteolytische IFN-Abbau verringerte den inhibitorischen Einfluss der IFN-Antwort auf die Virusreplikation. So wurden in Gegenwart von Trypsin selbst mit dem IFN-sensitiven delNS1 akzeptable HA-Titer erreicht. In Abwesenheit von Trypsin war dieser Stamm dagegen stark attenuiert. Transfektion des viralen IFN-Antagonisten P verbesserte die Replikation von delNS1 unter trypsinfreien Bedingungen erheblich, hatte aber in Anwesenheit von Trypsin nur einen geringen Effekt. Noch effektiver konnte die delNS1-Replikation in Abwesenheit von Trypsin allerdings durch Transfektion von Influenza A-Virus NS1 verbessert werden. Die Daten zeigen, dass NS1 die Aktivierung der IFN-Antwort zwar nicht besser als P unterdrückt. Anders als P beschleunigte die Transfektion von NS1 jedoch zusätzlich, vermutlich durch weitere Funktionen von NS1 im viralen Replikationszyklus, die Infektionsdynamik. Eine schnelle Replikations- und Infektionsdynamik maximiert den Zeitraum, indem Influenza-Viren ungehemmt replizieren können, da die antivirale

Wirtsantwort noch nicht etabliert ist. Trypsin ermöglicht ebenfalls durch effektive HA-Spaltung einen schnellen Verlauf der Virusinfektion.

Um zu prüfen, ob auch diese trypsinvermittelte schnelle Infektionsdynamik zu dem geringen inhibitorischen Einfluss der IFN-Antwort in MDCK-Zellen beiträgt, wurde die Replikation von WSN33 in IFN-stimulierten Zellen in Gegenwart von Trypsin, FCS oder ohne zusätzliche Protease untersucht. WSN33-HA kann in Gegenwart von FCS durch Serum-Plasmin effektiv gespalten werden, so dass FCS für diesen Stamm eine trypsinunabhängige, schnelle Ausbreitung der Virusinfektion ermöglichte. Zum Zeitpunkt der Infektion wurde in IFN-stimulierten Zellen eine starke Aktivierung der ISGs beobachtet. Durch Trypsinzugabe fiel diese starke Aktivierung infolge proteolytischen IFN-Abbaus nach der Infektion schnell ab. Entsprechend wurden mit Trypsin in stimulierten und nicht-stimulierten Zellen nahezu dieselben finalen Virustiter beobachtet. Mit FCS bzw. ohne Protease-Zusatz fand kein proteolytischer IFN-Abbau statt, so dass die ISG-Induktion während der Infektion auf deutlich höherem Niveau blieb. Trotzdem wurden mit FCS in stimulierten und nicht-stimulierten Zellen ebenfalls nahezu identische finale Virustiter erreicht. Lediglich in Abwesenheit von Trypsin und FCS verringerte die IFN-Stimulation die Virusausbeute. Das zeigt, dass auch unabhängig von proteolytischem IFN-Abbau eine schnelle Ausbreitung der Virusinfektion, ermöglicht durch effektive HA-Spaltung, das inhibitorische Potential der IFN-Antwort für die Influenza-Virusreplikation in MDCK-Zellen verringert.

Zusammenfassend konnte damit in dieser Arbeit kein limitierender Einfluss der IFN-Antwort auf die Influenza-Impfstoffproduktion in MDCK-Zellen festgestellt werden. Durch Verwendung von WT-Stämmen oder NS1-kompetenten Reassortanten wird die IFN-Antwort bei der Virusreplikation nur schwach induziert. Gleichzeitig bleibt der inhibitorische Einfluss der Wirtszell-Pathogenabwehr infolge trypsinvermittelter schneller Infektionsdynamik und proteolytischem IFN-Abbau gering. Zusätzlich zeigen weitere Experimente unserer Arbeitsgruppe, dass die Mx-Proteine von MDCK-Zellen keine antivirale Aktivität gegen Influenza-Viren haben. Damit fehlt diesen Zellen ein Kernstück der IFN-induzierten, antiviralen Abwehr. Durch die Wahl der Prozessparameter (Verwendung von Trypsin und NS1-kompetenter Viren) und einer Wirtszelle mit beeinträchtigter antiviraler Antwort (fehlende Mx-Aktivität) wurde demnach, bislang unbewusst, bereits einem inhibitorischen Einfluss der IFN-Antwort auf die Virusreplikation in MDCK-Zellen vorgebeugt.

7 Ausblick

Weder in dieser Arbeit, noch in weiteren Experimenten unserer Arbeitsgruppe konnte ein limitierender Einfluss der IFN-Antwort auf die Influenza-Impfstoffproduktion in MDCK-Zellen identifiziert werden. Durch Verwendung von WT-Stämmen oder NS1-kompetenten Reassortanten bleibt die Induktion der IFN-Antwort bei der Impfstoffproduktion gering. Gleichzeitig beugt Trypsin einem inhibitorischen Einfluss der antiviralen Antwort durch Vermittlung von schneller Infektionsdynamik und proteolytischem IFN-Abbau vor. Außerdem fehlt MDCK-Zellen ein Mx-Protein mit antiviraler Aktivität gegen Influenza-Viren (Frensing *et al.*, 2011; Seitz *et al.*, 2010). Weitere Untersuchungen zu diesem Thema scheinen in MDCK-Zellen daher nicht sinnvoll. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Zelllinien ist allerdings fraglich. Bei Vero-Zellen, der wichtigsten kommerziell genutzten Alternative zu MDCK-Zellen (Lee & Hu, 2012; Patriarca, 2007), hat die IFN-Antwort aufgrund fehlender funktionaler IFN-Gene (Desmyter *et al.*, 1968) ebenfalls keine Bedeutung. Jedoch werden zurzeit verschiedene Designer-Zelllinien aus unterschiedlichen Spezies als Wirtszellen für die Influenza-Impfstoffproduktion getestet (Genzel & Reichl, 2009). Zum Teil sind diese Designer-Zelllinien wie z.B. Per.C6 (Pau *et al.*, 2001) humanen Ursprungs und verfügen daher wahrscheinlich mit MxA über ein Mx-Protein mit starker anti-Influenza-Aktivität (Haller & Kochs, 2011). In Mx-kompetenten Zellen können auch geringe Mengen IFN bereits ausreichen, um einen wirksamen, antiviralen Zustand zu induzieren (Arnheiter & Haller, 1983). Zudem weisen viele Zelllinien eine geringere Trypsintoleranz als MDCK-Zellen auf, so dass sekretiertes IFN bei anderen Zelllinien möglicherweise weniger effizient proteolytisch degradiert wird. In solchen Zelllinien könnte die stabile Expression eines viralen IFN-Antagonisten eine einfache Möglichkeit darstellen, die Prozessausbeuten bei der Influenza-Impfstoffproduktion zu verbessern.

Um die Virusproduktion in MDCK-Zellen zu verbessern, sind dagegen andere Wege einzuschlagen. Aus der virologischen Literatur lassen sich dazu viele potentielle Ansatzpunkte ableiten. So wurden zum Beispiel vor kurzem in genomweiten siRNA-Screens im humanen System viele Gene identifiziert, die an verschiedenen Stellen pro- oder antiviral in den viralen Replikationszyklus eingreifen (Brass *et al.*, 2009; Karlas *et al.*, 2010; König *et al.*, 2010). Um hier jedoch zielgerichtet vielversprechende Kandidaten identifizieren zu können, sollte zuerst genauer untersucht werden, wodurch die Virusreplikation in MDCK-Zellen limitiert wird. Die Vorgehensweise dabei könnte sich an der Arbeit von Mead *et al.* (2009) orientieren. Diese Autoren suchten limitierende Faktoren für die Expression rekombinanter Proteine in Säugerzellen. Als Modellsystem nutzten sie stabil Luciferase-exprimierende CHO-Zellen. Die Transkription des Luciferasegens, das zelluläre Luciferaseproteinlevel und die Luciferaseaktivität wurden individuell gemessen. Die zusammenhängende Auswertung der Daten zeigt, dass der limitierende Schritt für die Produktion aktiver Luciferase wahrscheinlich im

post-translationalen Bereich liegt, da hohe Luciferaseproteinlevel nur bedingt mit hoher Luciferaseaktivität korrelierten. Virusreplikation ist zwar ein komplexerer Prozess als der von Mead *et al.* (2009) untersuchte. Die Arbeitsgruppe Bioprozesstechnik verfügt jedoch bereits über Assays zur Quantifizierung der viralen RNA-Replikation- und Transkription (Vester *et al.*, 2010a), sowie zur Bestimmung viralen Proteinkonzentration in der Wirtszelle (Schulze-Horsel, 2011). Verschiedene Methoden zur quantitativen Erfassung der produzierten Viren sind außerdem etabliert. Entsprechend sollte es bereits möglich sein, den viralen Replikationszyklus in Teilen zu bilanzieren. Methoden zur Beurteilung der Effizienz weiterer Schritte, z.B. für den Viruseintritt in die Zelle (Feeley *et al.*, 2011) und die Virusfreisetzung (Ma *et al.*, 2012), sind in der Literatur beschrieben. Eine mathematische Modellierung so gewonnener Daten zu den Einzelschritten der Virusreplikation könnte die Identifikation limitierender Schritte unterstützen (Sidorenko & Reichl, 2004).

8 Verzeichnisse

8.1 Literaturverzeichnis

- Aggarwal, K., Jing, F., Maranga, L. & Liu, J. (2011).** Bioprocess optimization for cell culture based influenza vaccine production. *Vaccine* **29**, 3320-3328.
- Ambrose, C. S., Levin, M. J. & Belshe, R. B. (2011).** The relative efficacy of trivalent live attenuated and inactivated influenza vaccines in children and adults. *Influenza Other Respi Viruses* **5**, 67-75.
- Arnheiter, H. & Haller, O. (1983).** Mx gene control of interferon action: different kinetics of the antiviral state against influenza virus and vesicular stomatitis virus. *J Virol* **47**, 626-630.
- Audsley, J. M. & Tannock, G. A. (2005).** The growth of attenuated influenza vaccine donor strains in continuous cell lines. *J Virol Methods* **123**, 187-193.
- Audsley, J. M. & Tannock, G. A. (2008).** Cell-based influenza vaccines: progress to date. *Drugs* **68**, 1483-1491.
- Balachandran, S., Roberts, P. C., Kipperman, T., Bhalla, K. N., Compans, R. W., Archer, D. R. & Barber, G. N. (2000).** Alpha/beta interferons potentiate virus-induced apoptosis through activation of the FADD/Caspase-8 death signaling pathway. *J Virol* **74**, 1513-1523.
- Bardiya, N. & Bae, J. H. (2005).** Influenza vaccines: recent advances in production technologies. *Appl Microbiol Biotechnol* **67**, 299-305.
- Barman, S. & Nayak, D. P. (2007).** Lipid raft disruption by cholesterol depletion enhances influenza A virus budding from MDCK cells. *J Virol* **81**, 12169-12178.
- Barrett, P. N., Mundt, W., Kistner, O. & Howard, M. K. (2009).** Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines. *Expert Rev Vaccines* **8**, 607-618.
- Barrett, P. N., Portsmouth, D. & Ehrlich, H. J. (2010).** Developing cell culture-derived pandemic vaccines. *Curr Opin Mol Ther* **12**, 21-30.
- Basler, C. F. (2007).** Influenza viruses: basic biology and potential drug targets. *Infect Disord Drug Targets* **7**, 282-293.
- Basler, C. F. & Amarasinghe, G. K. (2009).** Evasion of interferon responses by Ebola and Marburg viruses. *J Interferon Cytokine Res* **29**, 511-520.
- 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**, 12289-12294.
- Baum, A. & García-Sastre, A. (2011).** Differential recognition of viral RNA by RIG-I. *Virulence* **2**, 166-169.
- Baum, A., Sachidanandam, R. & García-Sastre, A. (2010).** Preference of RIG-I for short viral RNA molecules in infected cells revealed by next-generation sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 16303-16308.
- 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**, 6203-6206.
- Bergmann, M., Romirer, I., Sachet, M., Fleischhacker, R., García-Sastre, A., Palese, P., Wolff, K., Pehamberger, H., Jakesz, R. & Muster, T. (2001).** A genetically engineered influenza A virus with ras-dependent oncolytic properties. *Cancer Res* **61**, 8188-8193.
- Bertram, S., Glowacka, I., Steffen, I., Köhl, A. & Pöhlmann, S. (2010).** Novel insights into proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinin. *Rev Med Virol* **20**, 298-310.
- Bock, A., Schulze-Horsel, J., Schwarzer, J., Rapp, E., Genzel, Y. & Reichl, U. (2011).** High-density microcarrier cell cultures for influenza virus production. *Biotechnol Prog*. **27(1)**, 241-50.
- Boivin, S., Cusack, S., Ruigrok, R. W. & Hart, D. J. (2010).** Influenza A virus polymerase: structural insights into replication and host adaptation mechanisms. *J Biol Chem* **285**, 28411-28417.

- Bouvier, N. M. & Palese, P. (2008).** The biology of influenza viruses. *Vaccine* **26 Suppl 4**, D49-53.
- Brass, A. L., Huang, I. C., Benita, Y., John, S. P., Krishnan, M. N., Feeley, E. M., Ryan, B. J., Weyer, J. L., van der Weyden, L., Fikrig, E., Adams, D. J., Xavier, R. J., Farzan, M. & Elledge, S. J. (2009).** The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. *Cell* **139**, 1243-1254.
- Brosius, F. (2006).** *SPSS 14*. Heidelberg, Germany: mitp.
- Buckler, C. E. & Baron, S. (1966).** Antiviral action of mouse interferon in heterologous cells. *J Bacteriol* **91**, 231-235.
- Burgui, I., Aragón, T., Ortín, J. & Nieto, A. (2003).** PABP1 and eIF4GI associate with influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. *J Gen Virol* **84**, 3263-3274.
- Burke, D. C. & Isaacs, A. (1958).** Some factors affecting the production of interferon. *Br J Exp Pathol* **39**, 452-458.
- Burleson, F. G., Chambers, T. M. & Wiedbrauk, D. L. (1992).** *Virology: A Laboratory Manual*: Academic Press.
- Böttcher, E., Matrosovich, T., Beyerle, M., Klenk, H. D., Garten, W. & Matrosovich, M. (2006).** Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium. *J Virol* **80**, 9896-9898.
- Böttcher-Friebertshäuser, E., Freuer, C., Sielaff, F., Schmidt, S., Eickmann, M., Uhlenndorff, J., Steinmetzer, T., Klenk, H. D. & Garten, W. (2010).** Cleavage of influenza virus hemagglutinin by airway proteases TMPRSS2 and HAT differs in subcellular localization and susceptibility to protease inhibitors. *J Virol* **84**, 5605-5614.
- Castelli, J. C., Hassel, B. A., Maran, A., Paranjape, J., Hewitt, J. A., Li, X. L., Hsu, Y. T., Silverman, R. H. & Youle, R. J. (1998).** The role of 2'-5' oligoadenylate-activated ribonuclease L in apoptosis. *Cell Death Differ* **5**, 313-320.
- Castrucci, M. R. & Kawaoka, Y. (1993).** Biologic importance of neuraminidase stalk length in influenza A virus. *J Virol* **67**, 759-764.
- Cheung, T. K. W. & Poon, L. L. M. (2007).** Biology of influenza a virus. *Ann N Y Acad Sci* **1102**, 1-25.
- Colburn, N. H., Richardson, R. G. & Boutwell, R. K. (1965).** Studies of the reaction of beta-propiolactone with deoxyguanosine and related compounds. *Biochem Pharmacol* **14**, 1113-1118.
- Colonna, R. J. & Pang, R. H. (1982).** Induction of unique mRNAs by human interferons. *J Biol Chem* **257**, 9234-9237.
- Couch, R. B. (2008).** Seasonal inactivated influenza virus vaccines. *Vaccine* **26 Suppl 4**, D5-9.
- Cox, N. J. (2011).** Pandemic Influenza Vaccines: Lessons Learned from the H1N1 Influenza Pandemic. Source: WHO, http://www.who.int/influenza_vaccines_plan/resources/cox.pdf (21.01.2012)
- Cros, J. F. & Palese, P. (2003).** Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses. *Virus Res* **95**, 3-12.
- de Vries, W., Haasnoot, J., van der Velden, J., van Montfort, T., Zorgdrager, F., Paxton, W., Cornelissen, M., van Kuppeveld, F., de Haan, P. & Berkhout, B. (2008).** Increased virus replication in mammalian cells by blocking intracellular innate defense responses. *Gene Ther* **15**, 545-552.
- 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**, 15623-15628.
- Desmyter, J., Melnick, J. L. & Rawls, W. E. (1968).** Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero). *J Virol* **2**, 955-961.
- Di Trani, L., Bedini, B., Donatelli, I., Campitelli, L., Chiappini, B., De Marco, M. A., Delogu, M., Buonavoglia, C. & Vaccari, G. (2006).** A sensitive one-step real-time PCR for detection of avian influenza viruses using a MGB probe and an internal positive control. *BMC Infect Dis* **6**, 87.

- Dias, A., Bouvier, D., Crépin, T., McCarthy, A. A., Hart, D. J., Baudin, F., Cusack, S. & Ruigrok, R. W. (2009).** The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature* **458**, 914-918.
- Diaz, M. O., Ziemins, S., Beau, M. M. L., 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**, 5259-5263.
- Dimmock, N. J., Rainsford, E. W., Scott, P. D. & Marriott, A. C. (2008).** Influenza virus protecting RNA: an effective prophylactic and therapeutic antiviral. *J Virol* **82**, 8570-8578.
- Dittmann, J., Stertz, S., Grimm, D., Steel, J., García-Sastre, A., Haller, O. & Kochs, G. (2008).** Influenza A virus strains differ in sensitivity to the antiviral action of Mx-GTPase. *J Virol* **82**, 3624-3631.
- Donald, H. B. & Isaacs, A. (1954).** Counts of influenza virus particles. *J Gen Microbiol* **10**, 457-464.
- Donelan, N. R., Basler, C. F. & García-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**, 13257-13266.
- Doroshenko, A. & Halperin, S. A. (2009).** Trivalent MDCK cell culture-derived influenza vaccine Optaflu (Novartis Vaccines). *Expert Rev Vaccines* **8**, 679-688.
- Drake, J. W. (1993).** Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 4171-4175.
- Dudek, S. E., Wixler, L., Nordhoff, C., Nordmann, A., Anhlan, D., Wixler, V. & Ludwig, S. (2011).** The influenza virus PB1-F2 protein has interferon antagonistic activity. *Biol Chem* **392**, 1135-1144.
- Duhaut, S. D. & McCauley, J. W. (1996).** Defective RNAs inhibit the assembly of influenza virus genome segments in a segment-specific manner. *Virology* **216**, 326-337.
- Dupuis, S., Jouanguy, E., Al-Hajjar, S., Fieschi, C., Al-Mohsen, I. Z., Al-Jumaah, S., Yang, K., Chappier, A., Eidenschenk, C., Eid, P., Al Ghonaim, 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**, 388-391.
- Dyer, B. W., Ferrer, F. A., Klinedinst, D. K. & Rodriguez, R. (2000).** A noncommercial dual luciferase enzyme assay system for reporter gene analysis. *Anal Biochem* **282**, 158-161.
- Díaz, M. O., Pomykala, H. M., Bohlander, S. K., Maltepe, E., Malik, K., Brownstein, B. & Olopade, O. I. (1994).** Structure of the human type-I interferon gene cluster determined from a YAC clone contig. *Genomics* **22**, 540-552.
- Efron, B. & Tibshirani, R. (2002).** Empirical bayes methods and false discovery rates for microarrays. *Genet Epidemiol* **23**, 70-86.
- 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**, 6437-6441.
- 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**, 230-238.
- Ehrhardt, C., Marjuki, H., Wolff, T., Nürnberg, B., Planz, O., Pleschka, S. & Ludwig, S. (2006).** Bivalent role of the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) during influenza virus infection and host cell defence. *Cell Microbiol* **8**, 1336-1348.
- Ehrhardt, C., Seyer, R., Hrinčius, E. R., Eierhoff, T., Wolff, T. & Ludwig, S. (2010).** Interplay between influenza A virus and the innate immune signaling. *Microbes Infect* **12**, 81-87.
- Ehrhardt, C., Wolff, T., Pleschka, S., Planz, O., Beermann, W., Bode, J. G., Schmolke, M. & Ludwig, S. (2007).** Influenza A virus NS1 protein activates the PI3K/Akt pathway to mediate antiapoptotic signaling responses. *J Virol* **81**, 3058-3067.
- Eichelberger, M., Golding, H., Hess, M., Weir, J., Subbarao, K., Luke, C. J., Friede, M. & Wood, D. (2008).** FDA/NIH/WHO public workshop on immune correlates of protection against influenza A viruses in support of pandemic vaccine development, Bethesda, Maryland, US, December 10-11, 2007. *Vaccine* **26**, 4299-4303.

- Falcón, A. M., Fernandez-Sesma, A., Nakaya, Y., Moran, T. M., Ortín, J. & García-Sastre, A. (2005).** Attenuation and immunogenicity in mice of temperature-sensitive influenza viruses expressing truncated NS1 proteins. *J Gen Virol* **86**, 2817-2821.
- Falcón, A. M., Marión, R. M., Zürcher, T., Gómez, P., Portela, A., Nieto, A. & Ortín, J. (2004).** Defective RNA replication and late gene expression in temperature-sensitive influenza viruses expressing deleted forms of the NS1 protein. *J Virol* **78**, 3880-3888.
- Feeley, E. M., Sims, J. S., John, S. P., Chin, C. R., Pertel, T., Chen, L. M., Gaiha, G. D., Ryan, B. J., Donis, R. O., Elledge, S. J. & Brass, A. L. (2011).** IFITM3 inhibits influenza A virus infection by preventing cytosolic entry. *PLoS Pathog* **7**, e1002337.
- Ferguson, N. M., Cummings, D. A., Fraser, C., Cajka, J. C., Cooley, P. C. & Burke, D. S. (2006).** Strategies for mitigating an influenza pandemic. *Nature* **442**, 448-452.
- Fiore, A. E., Bridges, C. B. & Cox, N. J. (2009).** Seasonal influenza vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol* **333**, 43-82.
- Fiore, A. E., Fry, A., Shay, D., Gubareva, L., Bresee, J. S., Uyeki, T. M. & (CDC), C. f. D. C. a. P. (2011).** Antiviral agents for the treatment and chemoprophylaxis of influenza -- recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* **60**, 1-24.
- Fislova, T. & Kostolansky, F. (2005).** The factors of virulence of influenza a virus. *Acta Virol* **49**, 147-157.
- Flohr, F., Schneider-Schaulies, S., Haller, O. & Kochs, G. (1999).** The central interactive region of human MxA GTPase is involved in GTPase activation and interaction with viral target structures. *FEBS Lett* **463**, 24-28.
- Fodor, E., Mingay, L. J., Crow, M., Deng, T. & Brownlee, G. G. (2003).** A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase promotes the generation of defective interfering RNAs. *J Virol* **77**, 5017-5020.
- Fortes, P., Beloso, A. & Ortín, J. (1994).** Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks mRNA nucleocytoplasmic transport. *EMBO J* **13**, 704-712.
- Fray, M. D., Mann, G. E. & Charleston, B. (2001).** Validation of an Mx/CAT reporter gene assay for the quantification of bovine type-I interferon. *J Immunol Methods* **249**, 235-244.
- Frensing, T., Seitz, C., Heynisch, B., Patzina, C., Kochs, G. & Reichl, U. (2011).** Efficient influenza B virus propagation due to deficient interferon-induced antiviral activity in MDCK cells. *Vaccine* **29**, 7125-7129.
- Friede, M., Palkonyay, L., Alfonso, C., Pervikov, Y., Torelli, G., Wood, D. & Kieny, M. P. (2011).** WHO initiative to increase global and equitable access to influenza vaccine in the event of a pandemic: supporting developing country production capacity through technology transfer. *Vaccine* **29 Suppl 1**, A2-7.
- Fujita, T. (2006).** Sensing viral RNA amid your own. *Science* **314**, 935-936.
- Fulvini, A. A., Ramanunnair, M., Le, J., Pokorny, B. A., Arroyo, J. M., Silverman, J., Devis, R. & Bucher, D. (2011).** Gene constellation of influenza A virus reassortants with high growth phenotype prepared as seed candidates for vaccine production. *PLoS One* **6**, e20823.
- Gack, M. U., Albrecht, R. A., Urano, T., Inn, K. S., Huang, I. C., Carnero, E., Farzan, M., Inoue, S., Jung, J. U. & García-Sastre, A. (2009).** Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I. *Cell Host Microbe* **5**, 439-449.
- Gao, S., von der Malsburg, A., Paeschke, S., Behlke, J., Haller, O., Kochs, G. & Daumke, O. (2010).** Structural basis of oligomerization in the stalk region of dynamin-like MxA. *Nature* **465**, 502-506.
- Garaigorta, U. & Ortín, J. (2007).** Mutation analysis of a recombinant NS replicon shows that influenza virus NS1 protein blocks the splicing and nucleo-cytoplasmic transport of its own viral mRNA. *Nucleic Acids Res* **35**, 4573-4582.
- Garcia, M. A., Gil, J., Ventoso, I., Guerra, S., Domingo, E., Rivas, C. & Esteban, M. (2006).** Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 1032-1060.

- García, M. A., Meurs, E. F. & Esteban, M. (2007).** The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control. *Biochimie* **89**, 799-811.
- García-Sastre, A. (2011).** Induction and evasion of type I interferon responses by influenza viruses. *Virus Res* **162**, 12-18.
- García-Sastre, A., Egorov, A., Matassov, D., Brandt, S., Levy, D. E., Durbin, J. E., Palese, P. & Muster, T. (1998).** Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology* **252**, 324-330.
- Garten, R. J., Davis, C. T., Russell, C. A., Shu, B., Lindstrom, S., Balish, A., Sessions, W. M., Xu, X., Skepner, E., Deyde, V., Okomo-Adhiambo, M., Gubareva, L., Barnes, J., Smith, C. B., Emery, S. L., Hillman, M. J., Rivailler, P., Smagala, J., de Graaf, M., Burke, D. F., Fouchier, R. A., Pappas, C., Alpuche-Aranda, C. M., López-Gatell, H., Olivera, H., López, I., Myers, C. A., Faix, D., Blair, P. J., Yu, C., Keene, K. M., Dotson, P. D., Boxrud, D., Sambol, A. R., Abid, S. H., St George, K., Bannerman, T., Moore, A. L., Stringer, D. J., Blevins, P., Demmler-Harrison, G. J., Ginsberg, M., Kriner, P., Waterman, S., Smole, S., Guevara, H. F., Belongia, E. A., Clark, P. A., Beatrice, S. T., Donis, R., Katz, J., Finelli, L., Bridges, C. B., Shaw, M., Jernigan, D. B., Uyeki, T. M., Smith, D. J., Klimov, A. I. & Cox, N. J. (2009).** Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* **325**, 197-201.
- Gaush, C. R. & Smith, T. F. (1968).** Replication and plaque assay of influenza virus in an established line of canine kidney cells. *Appl Microbiol* **16**, 588-594.
- 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. & García-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**, 10736-10741.
- Genzel, Y., Dietzsch, C., Rapp, E., Schwarzer, J. & Reichl, U. (2010).** MDCK and Vero cells for influenza virus vaccine production: a one-to-one comparison up to lab-scale bioreactor cultivation. *Appl Microbiol Biotechnol* **88**, 461-475.
- Genzel, Y., Fischer, M. & Reichl, U. (2006).** Serum-free influenza virus production avoiding washing steps and medium exchange in large-scale microcarrier culture. *Vaccine* **24**, 3261-3272.
- Genzel, Y. & Reichl, U. (2009).** Continuous cell lines as a production system for influenza vaccines. *Expert Rev Vaccines* **8**, 1681-1692.
- Girard, M. P., Tam, J. S., Assossou, O. M. & Kieny, M. P. (2010).** The 2009 A (H1N1) influenza virus pandemic: A review. *Vaccine* **28**, 4895-4902.
- Goto, H. & Kawaoka, Y. (1998).** A novel mechanism for the acquisition of virulence by a human influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10224-10228.
- Goto, H., Wells, K., Takada, A. & Kawaoka, Y. (2001).** Plasminogen-binding activity of neuraminidase determines the pathogenicity of influenza A virus. *J Virol* **75**, 9297-9301.
- Govorkova, E. A., Kodihalli, S., Alymova, I. V., Fanget, B. & Webster, R. G. (1999).** Growth and immunogenicity of influenza viruses cultivated in Vero or MDCK cells and in embryonated chicken eggs. *Dev Biol Stand* **98**, 39-51; discussion 73-34.
- Graef, K. M., Vreede, F. T., Lau, Y. F., McCall, A. W., Carr, S. M., Subbarao, K. & Fodor, E. (2010).** The PB2 subunit of the influenza virus RNA polymerase affects virulence by interacting with the mitochondrial antiviral signaling protein and inhibiting expression of beta interferon. *J Virol* **84**, 8433-8445.
- Greenspan, D., Palese, P. & Krystal, M. (1988).** Two nuclear location signals in the influenza virus NS1 nonstructural protein. *J Virol* **62**, 3020-3026.
- Grimm, D., Staeheli, P., Hufbauer, M., Koerner, I., Martínez-Sobrido, L., Solórzano, A., García-Sastre, A., Haller, O. & Kochs, G. (2007).** Replication fitness determines high virulence of influenza A virus in mice carrying functional Mx1 resistance gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 6806-6811.

- Gropp, F. N., Greger, D. L., Morel, C., Sauter, S. & Blum, J. W. (2006).** Nuclear receptor and nuclear receptor target gene messenger ribonucleic acid levels at different sites of the gastrointestinal tract and in liver of healthy dogs. *J Anim Sci* **84**, 2684-2691.
- Haasbach, E., Droebner, K., Vogel, A. B. & Planz, O. (2011).** Low-dose interferon Type I treatment is effective against H5N1 and swine-origin H1N1 influenza A viruses in vitro and in vivo. *J Interferon Cytokine Res* **31**, 515-525.
- Hale, B. G., Albrecht, R. A. & García-Sastre, A. (2010a).** Innate immune evasion strategies of influenza viruses. *Future Microbiol* **5**, 23-41.
- Hale, B. G., Randall, R. E., Ortin, J. & Jackson, D. (2008).** The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J Gen Virol* **89**, 2359-2376.
- Hale, B. G., Steel, J., Medina, R. A., Manicassamy, B., Ye, J., Hickman, D., Hai, R., Schmolke, M., Lowen, A. C., Perez, D. R. & García-Sastre, A. (2010b).** Inefficient control of host gene expression by the 2009 pandemic H1N1 influenza A virus NS1 protein. *J Virol* **84**, 6909-6922.
- Haller, O. & Kochs, G. (2011).** Human MxA Protein: An Interferon-Induced Dynamin-Like GTPase with Broad Antiviral Activity. *J Interferon Cytokine Res* **31**, 79-87.
- Haller, O., Kochs, G. & Weber, F. (2006).** The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology* **344**, 119-130.
- Haller, O., Kochs, G. & Weber, F. (2007).** Interferon, Mx, and viral countermeasures. *Cytokine Growth Factor Rev* **18**, 425-433.
- Haller, O., Staeheli, P. & Kochs, G. (2009).** Protective role of interferon-induced Mx GTPases against influenza viruses. *Rev Sci Tech* **28**, 219-231.
- Halperin, S. A., Smith, B., Mabrouk, T., Germain, M., Trépanier, P., Hassell, T., Treanor, J., Gauthier, R. & Mills, E. L. (2002).** Safety and immunogenicity of a trivalent, inactivated, mammalian cell culture-derived influenza vaccine in healthy adults, seniors, and children. *Vaccine* **20**, 1240-1247.
- Harrison, S. C. (2008).** Viral membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 690-698.
- Hayman, A., Comely, S., Lackenby, A., Hartgroves, L. C. S., Goodbourn, S., McCauley, J. W. & Barclay, W. S. (2007).** NS1 proteins of avian influenza A viruses can act as antagonists of the human alpha_beta interferon response. *J Virol* **81**, 2318-2327.
- Hayman, A., Comely, S., Lackenby, A., Murphy, S., McCauley, J., Goodbourn, S. & Barclay, W. (2006).** Variation in the ability of human influenza A viruses to induce and inhibit the IFN-beta pathway. *Virology* **347**, 52-64.
- Henle, W., Henle, G., Deinhardt, F. & Bergs, V. V. (1959).** Studies on persistent infections of tissue cultures. IV. Evidence for the production of an interferon in MCN cells by myxoviruses. *J Exp Med* **110**, 525-541.
- Heynisch, B., Frensing, T., Heinze, K., Seitz, C., Genzel, Y. & Reichl, U. (2010).** Differential activation of host cell signalling pathways through infection with two variants of influenza A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) in MDCK cells. *Vaccine* **28**, 8210-8218.
- Hickling, J. & D'Hondt, E. (2006).** A review of production technologies for influenza virus vaccines, and their suitability for deployment in developing countries for influenza pandemic preparedness. Geneva: WHO, http://who.int/vaccine_research/diseases/influenza/Flu_vacc_manuf_tech_report.pdf (22.01.2012).
- Hoffmann, E., Stech, J., Guan, Y., Webster, R. G. & Perez, D. R. (2001).** Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol* **146**, 2275-2289.
- Holzinger, D., Jorns, C., Stertz, S., Boisson-Dupuis, S., Thimme, R., Weidmann, M., Casanova, J. L., Haller, O. & Kochs, G. (2007).** Induction of MxA gene expression by influenza A virus requires type I or type III interferon signaling. *J Virol* **81**, 7776-7785.
- Honda, K. & Taniguchi, T. (2006).** IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* **6**, 644-658.
- 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**, 772-777.

- Hsiang, T. Y., Zhao, C. & Krug, R. M. (2009). Interferon-induced ISG15 conjugation inhibits influenza A virus gene expression and replication in human cells. *J Virol* **83**, 5971-5977.
- Hu, A. Y., Weng, T. C., Tseng, Y. F., Chen, Y. S., Wu, C. H., Hsiao, S., Chou, A. H., Chao, H. J., Gu, A., Wu, S. C., Chong, P. & Lee, M. S. (2008). Microcarrier-based MDCK cell culture system for the production of influenza H5N1 vaccines. *Vaccine* **26**, 5736-5740.
- Huang, I. C., Bailey, C. C., Weyer, J. L., Radoshitzky, S. R., Becker, M. M., Chiang, J. J., Brass, A. L., Ahmed, A. A., Chi, X., Dong, L., Longobardi, L. E., Boltz, D., Kuhn, J. H., Elledge, S. J., Bavari, S., Denison, M. R., Choe, H. & Farzan, M. (2011). Distinct patterns of IFITM-mediated restriction of filoviruses, SARS coronavirus, and influenza A virus. *PLoS Pathog* **7**, e1001258.
- Hussain, A. I., Cordeiro, M., Sevilla, E. & Liu, J. (2010). Comparison of egg and high yielding MDCK cell-derived live attenuated influenza virus for commercial production of trivalent influenza vaccine: in vitro cell susceptibility and influenza virus replication kinetics in permissive and semi-permissive cells. *Vaccine* **28**, 3848-3855.
- Iglewicz, B. (2000). Robust scale estimators and confidence intervals for location. In *Understanding robust and exploratory data analysis*, pp. 404-432. Edited by D. C. Hoaglin. New York: Wiley.
- Isaacs, A. & Burke, D. C. (1959). Viral interference and interferon. *Br Med Bull* **15**, 185-188.
- Isaacs, A. & Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **147**, 258-267.
- Isken, B., Genzel, Y. & Reichl, U. (2012). Productivity, apoptosis, and infection dynamics of influenza A/PR/8 strains and A/PR/8-based reassortants. *Vaccine* **30(35)**, 5253-61
- Iwai, A., Shiozaki, T., Kawai, T., Akira, S., Kawaoka, Y., Takada, A., Kida, H. & Miyazaki, T. (2010). Influenza A virus polymerase inhibits type I interferon induction by binding to interferon beta promoter stimulator 1. *J Biol Chem* **285**, 32064-32074.
- Jefferson, T., Del Mar, C. B., Dooley, L., Ferroni, E., Al-Ansary, L. A., Bawazeer, G. A., van Driel, M. L., Nair, S., Jones, M. A., Thorning, S. & Conly, J. M. (2011). Physical interventions to interrupt or reduce the spread of respiratory viruses. *Cochrane Database Syst Rev*, CD006207.
- Jefferson, T., Jones, M., Doshi, P. & Del Mar, C. (2009). Neuraminidase inhibitors for preventing and treating influenza in healthy adults: systematic review and meta-analysis. *BMJ* **339**, b5106.
- Jennings, P. A., Finch, J. T., Winter, G. & Robertson, J. S. (1983). Does the higher order structure of the influenza virus ribonucleoprotein guide sequence rearrangements in influenza viral RNA? *Cell* **34**, 619-627.
- Jia, D., Rahbar, R., Chan, R. W., Lee, S. M., Chan, M. C., Wang, B. X., Baker, D. P., Sun, B., Peiris, J. S., Nicholls, J. M. & Fish, E. N. (2010). Influenza virus non-structural protein 1 (NS1) disrupts interferon signaling. *PLoS One* **5**, e13927.
- Johnson, N. P. & Mueller, J. (2002). Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic. *Bull Hist Med* **76**, 105-115.
- Julkunen, I., Melén, K., Nyqvist, M., Pirhonen, J., Sareneva, T. & Matikainen, S. (2000). Inflammatory responses in influenza A virus infection. *Vaccine* **19 Suppl 1**, S32-S37.
- Kalbfuss, B., Genzel, Y., Wolff, M., Zimmermann, A., Morenweiser, R. & Reichl, U. (2007). Harvesting and concentration of human influenza A virus produced in serum-free mammalian cell culture for the production of vaccines. *Biotechnol Bioeng* **97**, 73-85.
- Kalbfuss, B., Knochlein, A., Kröber, T. & Reichl, U. (2008). Monitoring influenza virus content in vaccine production: precise assays for the quantitation of hemagglutination and neuraminidase activity. *Biologicals* **36**, 145-161.
- Karlas, A., Machuy, N., Shin, Y., Pleissner, K. P., Artarini, A., Heuer, D., Becker, D., Khalil, H., Ogilvie, L. A., Hess, S., Mäurer, A. P., Müller, E., Wolff, T., Rudel, T. & Meyer, T. F. (2010). Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature* **463**, 818-822.
- Kato, H., Takahashi, K. & Fujita, T. (2011). RIG-I-like receptors: cytoplasmic sensors for non-self RNA. *Immunol Rev* **243**, 91-98.
- Kaverin, N. V. & Webster, R. G. (1995). Impairment of multicycle influenza virus growth in Vero (WHO) cells by loss of trypsin activity. *J Virol* **69**, 2700-2703.

- Kawakami, E., Watanabe, T., Fujii, K., Goto, H., Watanabe, S., Noda, T. & Kawaoka, Y. (2011).** Strand-specific real-time RT-PCR for distinguishing influenza vRNA, cRNA, and mRNA. *J Virol Methods* **173**, 1-6.
- Keech, M. & Beardsworth, P. (2008).** The impact of influenza on working days lost: a review of the literature. *Pharmacoeconomics* **26**, 911-924.
- Kekarainen, T., Martinez-Guino, L. & Segales, J. (2009).** Swine torque teno virus detection in pig commercial vaccines, enzymes for laboratory use and human drugs containing components of porcine origin. *J Gen Virol* **90**, 648-653.
- Khazeni, N., Bravata, D. M., Holty, J. E., Uyeki, T. M., Stave, C. D. & Gould, M. K. (2009).** Systematic review: safety and efficacy of extended-duration antiviral chemoprophylaxis against pandemic and seasonal influenza. *Ann Intern Med* **151**, 464-473.
- Kido, H., Okumura, Y., Yamada, H., Le, T. Q. & Yano, M. (2007).** Proteases essential for human influenza virus entry into cells and their inhibitors as potential therapeutic agents. *Curr Pharm Des* **13**, 405-414.
- Klenk, H. D., Rott, R., Orlich, M. & Blodorn, J. (1975).** Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology* **68**, 426-439.
- Kochs, G., García-Sastre, A. & Martínez-Sobrido, L. (2007a).** Multiple anti-interferon actions of the Influenza A virus NS1 protein. *J Virol*.
- Kochs, G., Koerner, I., Thiel, L., Kothlow, S., Kaspers, B., Ruggli, N., Summerfield, A., Pavlovic, J., Stech, J. & Staeheli, P. (2007b).** Properties of H7N7 influenza A virus strain SC35M lacking interferon antagonist NS1 in mice and chickens. *J Gen Virol* **88**, 1403-1409.
- Koerner, I., Kochs, G., Kalinke, U., Weiss, S. & Staeheli, P. (2007).** Protective role of beta interferon in host defense against influenza A virus. *J Virol* **81**, 2025-2030.
- Krumbholz, A., Philipps, A., Oehring, H., Schwarzer, K., Eitner, A., Wutzler, P. & Zell, R. (2011).** Current knowledge on PB1-F2 of influenza A viruses. *Med Microbiol Immunol* **200**, 69-75.
- Kuiken, T. & Taubenberger, J. K. (2008).** Pathology of human influenza revisited. *Vaccine* **26 Suppl 4**, D59-66.
- König, R., Stertz, S., Zhou, Y., Inoue, A., Hoffmann, H. H., Bhattacharyya, S., Alamares, J. G., Tscherne, D. M., Ortigoza, M. B., Liang, Y., Gao, Q., Andrews, S. E., Bandyopadhyay, S., De Jesus, P., Tu, B. P., Pache, L., Shih, C., Orth, A., Bonamy, G., Miraglia, L., Ideker, T., García-Sastre, A., Young, J. A., Palese, P., Shaw, M. L. & Chanda, S. K. (2010).** Human host factors required for influenza virus replication. *Nature* **463**, 813-817.
- Lai, C., Struckhoff, J. J., Schneider, J., Martinez-Sobrido, L., Wolff, T., García-Sastre, A., Zhang, D. E. & Lenschow, D. J. (2009).** Mice lacking the ISG15 E1 enzyme UBE1L demonstrate increased susceptibility to both mouse-adapted and non-mouse-adapted influenza B virus infection. *J Virol* **83**, 1147-1151.
- Lazarowitz, S. G. & Choppin, P. W. (1975).** Enhancement of the infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide. *Virology* **68**, 440-454.
- Lazarowitz, S. G., Goldberg, A. R. & Choppin, P. W. (1973).** Proteolytic cleavage by plasmin of the HA polypeptide of influenza virus: host cell activation of serum plasminogen. *Virology* **56**, 172-180.
- Le Ru, A., Jacob, D., Transfiguracion, J., Ansorge, S., Henry, O. & Kamen, A. A. (2010).** Scalable production of influenza virus in HEK-293 cells for efficient vaccine manufacturing. *Vaccine* **28**, 3661-3671.
- LeBouder, F., Morello, E., Rimmelzwaan, G. F., Bosse, F., Pechoux, C., Delmas, B. & Riteau, B. (2008).** Annexin II incorporated into influenza virus particles supports virus replication by converting plasminogen into plasmin. *J Virol* **82**, 6820-6828.
- Lee, C. W., Jung, K., Jadhao, S. J. & Suarez, D. L. (2008).** Evaluation of chicken-origin (DF-1) and quail-origin (QT-6) fibroblast cell lines for replication of avian influenza viruses. *J Virol Methods* **153**, 22-28.
- Lee, M. S. & Hu, A. Y. (2012).** A cell-based backup to speed up pandemic influenza vaccine production. *Trends Microbiol.* **20(3)**, 103-5.

- Lee, V. J., Yap, J., Tay, J. K., Barr, I., Gao, Q., Ho, H. J., Tan, B. H., Kelly, P. M., Tambyah, P. A., Kelso, A. & Chen, M. I. (2010). Seroconversion and asymptomatic infections during oseltamivir prophylaxis against Influenza A H1N1 2009. *BMC Infect Dis* **10**, 164.
- Lenschow, D. J., Lai, C., Frias-Staheli, N., Giannakopoulos, N. V., Lutz, A., Wolff, T., Osiak, A., Levine, B., Schmidt, R. E., García-Sastre, A., Leib, D. A., Pekosz, A., Knobeloch, K.-P., Horak, I. & Virgin, H. W. (2007). IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 1371-1376.
- Leroux-Roels, I. & Leroux-Roels, G. (2009). Current status and progress of pre-pandemic and pandemic influenza vaccine development. *Expert Rev Vaccines* **8**, 401-423.
- Leyssen, P., De Clercq, E. & Neyts, J. (2008). Molecular strategies to inhibit the replication of RNA viruses. *Antiviral Res* **78**, 9-25.
- Li, I. W., Chan, K. H., To, K. W., Wong, S. S., Ho, P. L., Lau, S. K., Woo, P. C., Tsoi, H. W., Chan, J. F., Cheng, V. C., Zheng, B. J., Chen, H. & Yuen, K. Y. (2009). Differential susceptibility of different cell lines to swine-origin influenza A H1N1, seasonal human influenza A H1N1, and avian influenza A H5N1 viruses. *J Clin Virol* **46**, 325-330.
- Li, S., Min, J. Y., Krug, R. M. & Sen, G. C. (2006). Binding of the influenza A virus NS1 protein to PKR mediates the inhibition of its activation by either PACT or double-stranded RNA. *Virology* **349**, 13-21.
- Li, Y., Chen, Z. Y., Wang, W., Baker, C. C. & Krug, R. M. (2001). The 3'-end-processing factor CPSF is required for the splicing of single-intron pre-mRNAs in vivo. *RNA* **7**, 920-931.
- Lindenmann, J., Burke, D. C. & Isaacs, A. (1957). Studies on the production, mode of action and properties of interferon. *Br J Exp Pathol* **38**, 551-562.
- Liu, J., Shi, X., Schwartz, R. & Kemble, G. (2009). Use of MDCK cells for production of live attenuated influenza vaccine. *Vaccine* **27**, 6460-6463.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408.
- Ludwig, S., Ehrhardt, C., Neumeier, E. R., Kracht, M., Rapp, U. R. & Pleschka, S. (2001). Influenza virus-induced AP-1-dependent gene expression requires activation of the JNK signaling pathway. *J Biol Chem* **276**, 10990-10998.
- Ludwig, S., Pleschka, S. & Wolff, T. (1999). A fatal relationship - influenza virus interactions with the host cell. *Viral Immunol* **12**, 175-196.
- Ludwig, S., Wang, X., Ehrhardt, C., Zheng, H., Donelan, N., Planz, O., Pleschka, S., García-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**, 11166-11171.
- Ma, H., Kien, F., Manière, M., Zhang, Y., Lagarde, N., Tse, K. S., Poon, L. L. & Nal, B. (2012). Human annexin a6 interacts with influenza A virus protein M2 and negatively modulates infection. *J Virol* **86**, 1789-1801.
- MacQuillan, G. C., de Boer, W. B., Allan, J. E., Platten, M. A., Reed, W. D. & Jeffrey, G. P. (2010). Hepatocellular MxA protein expression supports the differentiation of recurrent hepatitis C disease from acute cellular rejection after liver transplantation. *Clin Transplant* **24**, 252-258.
- Maher, S. G., Romero-Weaver, A. L., Scarzello, A. J. & Gamero, A. M. (2007). Interferon: cellular executioner or white knight? *Curr Med Chem* **14**, 1279-1289.
- Mahy, B. & Kangro, H. (1996). *Virology Methods Manual*: Academic Press.
- Makizumi, K., Kimachi, K., Fukada, K., Nishimura, T., Kudo, Y., Goto, S., Odagiri, T., Tashiro, M. & Kino, Y. (2008). Timely production of A/Fujian-like influenza vaccine matching the 2003-2004 epidemic strain may have been possible using Madin-Darby canine kidney cells. *Vaccine* **26**, 6852-6858.
- Malathi, K., Dong, B., Gale, M. & Silverman, R. H. (2007). Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature* **448**, 816-819.
- Marcus, P. I., Ngunjiri, J. M. & Sekellick, M. J. (2009). Dynamics of biologically active subpopulations of influenza virus: plaque-forming, noninfectious cell-killing, and defective interfering particles. *J Virol* **83**, 8122-8130.

- Marcus, P. I., Ngunjiri, J. M., Sekellick, M. J., Wang, L. & Lee, C. W. (2010).** In vitro analysis of virus particle subpopulations in candidate live-attenuated influenza vaccines distinguishes effective from ineffective vaccines. *J Virol* **84**, 10974-10981.
- Marcus, P. I., Rojek, J. M. & Sekellick, M. J. (2005).** Interferon induction and/or production and its suppression by influenza A viruses. *J Virol* **79**, 2880-2890.
- Marriott, A. C. & Dimmock, N. J. (2010).** Defective interfering viruses and their potential as antiviral agents. *Rev Med Virol* **20**, 51-62.
- McLain, L., Armstrong, S. J. & Dimmock, N. J. (1988).** One defective interfering particle per cell prevents influenza virus-mediated cytopathology: an efficient assay system. *J Gen Virol* **69** (Pt 6), 1415-1419.
- Mead, E. J., Chiverton, L. M., Smales, C. M. & von der Haar, T. (2009).** Identification of the limitations on recombinant gene expression in CHO cell lines with varying luciferase production rates. *Biotechnol Bioeng* **102**, 1593-1602.
- Medina, R. A. & García-Sastre, A. (2011).** Influenza A viruses: new research developments. *Nat Rev Microbiol* **9**, 590-603.
- Merten, O. W. (2000).** Safety for vaccine(e)s. *Cytotechnology* **34**, 181-183.
- Millonig, A., Dressel, A., Bahner, D., Bitsch, A., Bogumil, T., Elitok, E., Kitzte, B., Tumani, H., Weber, F., Gneiss, C. & Deisenhammer, F. (2008).** MxA protein - an interferon beta biomarker in primary progressive multiple sclerosis patients. *Eur J Neurol* **15**, 822-826.
- Min, J.-Y. & Krug, R. M. (2006).** The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 7100-7105.
- Min, J. Y., Li, S., Sen, G. C. & Krug, R. M. (2007).** A site on the influenza A virus NS1 protein mediates both inhibition of PKR activation and temporal regulation of viral RNA synthesis. *Virology* **363**, 236-243.
- Molledo, B., López, C. B., Pazos, M., Becker, M. I., Hermesh, T. & Moran, T. M. (2009).** Cutting edge: stealth influenza virus replication precedes the initiation of adaptive immunity. *J Immunol* **183**, 3569-3573.
- Montagnon, B. J. (1989).** Polio and rabies vaccines produced in continuous cell lines: a reality for Vero cell line. *Dev Biol Stand* **70**, 27-47.
- Moresco, K. A., Stallknecht, D. E. & Swayne, D. E. (2010).** Evaluation and attempted optimization of avian embryos and cell culture methods for efficient isolation and propagation of low pathogenicity avian influenza viruses. *Avian Dis* **54**, 622-626.
- Morozumi, T., Naito, T., Pham, D. L., Nakajima, E., Mitsuhashi, T., Mikawa, S., Hayashi, T., Awata, T., Uenishi, H., Nagata, K., Watanabe, T. & Hamasima, N. (2009).** Molecular cloning and characterization of porcine Mx2 gene. *Molecular Immunology* **46**, 858-865.
- Murakami, S., Horimoto, T., Maile, Q., Nidom, C. A., Chen, H., Muramoto, Y., Yamada, S., Iwasa, A., Iwatsuki-Horimoto, K., Shimojima, M., Iwata, A. & Kawaoka, Y. (2008).** Growth determinants for H5N1 influenza vaccine seed viruses in MDCK cells. *J Virol* **82**, 10502-10509.
- Müller, 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**, 1918-1921.
- Nakamura, T., Asano, A., Okano, S., Ko, J.-H., Kon, Y., Watanabe, T. & Agui, T. (2005).** Intracellular localization and antiviral property of canine Mx proteins. *J Interferon Cytokine Res* **25**, 169-173.
- Nallagatla, S. R., Hwang, J., Toroney, R., Zheng, X., Cameron, C. E. & Bevilacqua, P. C. (2007).** 5'-triphosphate-dependent activation of PKR by RNAs with short stem-loops. *Science* **318**, 1455-1458.
- Nayak, D. P., Balogun, R. A., Yamada, H., Zhou, Z. H. & Barman, S. (2009).** Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Res* **143**, 147-161.
- 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.

- Neumann, G., Brownlee, G. G., Fodor, E. & Kawaoka, Y. (2004).** Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation. *Curr Top Microbiol Immunol* **283**, 121-143.
- Nicolson, C., Major, D., Wood, J. M. & Robertson, J. S. (2005).** Generation of influenza vaccine viruses on Vero cells by reverse genetics: an H5N1 candidate vaccine strain produced under a quality system. *Vaccine* **23**, 2943-2952.
- Nishikawa, Y., Iwata, A., Xuan, X., Nagasawa, H., Fujisaki, K., Otsuka, H. & Mikami, T. (2000).** Expression of canine interferon-beta by a recombinant vaccinia virus. *FEBS Lett* **466**, 179-182.
- 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**, 386-395.
- Noma, K., Kiyotani, K., Kouchi, H., Fujii, Y., Egi, Y., Tanaka, K. & Yoshida, T. (1998).** Endogenous protease-dependent replication of human influenza viruses in two MDCK cell lines. *Arch Virol* **143**, 1893-1909.
- Nordgård, O., Kvaløy, J. T., Farmen, R. K. & Heikkilä, R. (2006).** Error propagation in relative real-time reverse transcription polymerase chain reaction quantification models: the balance between accuracy and precision. *Anal Biochem* **356**, 182-193.
- Odagiri, T. & Tashiro, M. (1997).** Segment-specific noncoding sequences of the influenza virus genome RNA are involved in the specific competition between defective interfering RNA and its progenitor RNA segment at the virion assembly step. *J Virol* **71**, 2138-2145.
- Onions, D., Egan, W., Jarrett, R., Novicki, D. & Gregersen, J. P. (2010).** Validation of the safety of MDCK cells as a substrate for the production of a cell-derived influenza vaccine. *Biologicals* **38**, 544-551.
- Onoguchi, K., Yoneyama, M., Takemura, A., Akira, S., Taniguchi, T., Namiki, H. & Fujita, T. (2007).** Viral infections activate types I and III interferon genes through a common mechanism. *J Biol Chem* **282**, 7576-7581.
- Paillet, C., Forno, G., Soldano, N., Kratje, R. & Etcheverrigaray, M. (2011).** Statistical optimization of influenza H1N1 production from batch cultures of suspension Vero cells (sVero). *Vaccine* **29**, 7212-7217.
- Palache, A. M., Brands, R. & van Scharrenburg, G. J. (1997).** Immunogenicity and reactogenicity of influenza subunit vaccines produced in MDCK cells or fertilized chicken eggs. *J Infect Dis* **176** Suppl 1, S20-23.
- Palese, P., Schulman, J. L., Bodo, G. & Meindl, P. (1974).** Inhibition of influenza and parainfluenza virus replication in tissue culture by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA). *Virology* **59**, 490-498.
- Pandey, A., Singh, N., Sambhara, S. & Mittal, S. K. (2010).** Egg-independent vaccine strategies for highly pathogenic H5N1 influenza viruses. *Hum Vaccin* **6**, 178-188.
- Patriarca, P. A. (2007).** Use of Cell Lines for the Production of Influenza Virus Vaccines: An Appraisal of Technical, Manufacturing, and Regulatory Considerations Geneva: WHO, http://www.who.int/vaccine_research/diseases/influenza/WHO_Flu_Cell_Substrate_Version3.pdf (23.01.2012).
- Pau, M. G., Ophorst, C., Koldijk, M. H., Schouten, G., Mehtali, M. & Uytdehaag, F. (2001).** The human cell line PER.C6 provides a new manufacturing system for the production of influenza vaccines. *Vaccine* **19**, 2716-2721.
- Pauli, E. K., Schmolke, M., Wolff, T., Viemann, D., Roth, J., Bode, J. G. & Ludwig, S. (2008).** Influenza A virus inhibits type I IFN signaling via NF-kappaB-dependent induction of SOCS-3 expression. *PLoS Pathog* **4**, e1000196.
- Penski, N., Härtle, S., Rubbenstroth, D., Krohmann, C., Ruggli, N., Schusser, B., Pfann, M., Reuter, A., Gohrbandt, S., Hundt, J., Veits, J., Breithaupt, A., Kochs, G., Stech, J., Summerfield, A., Vahlenkamp, T., Kaspers, B. & Staeheli, P. (2011).** Highly pathogenic avian influenza viruses do not inhibit interferon synthesis in infected chickens but can override the interferon-induced antiviral state. *J Virol* **85**, 7730-7741.

- Perez, J. T., Varble, A., Sachidanandam, R., Zlatev, I., Manoharan, M., García-Sastre, A. & tenOever, B. R. (2010).** Influenza A virus-generated small RNAs regulate the switch from transcription to replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 11525-11530.
- 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.
- Qiao, L., Phipps-Yonas, H., Hartmann, B., Moran, T. M., Sealfon, S. C. & Hayot, F. (2010).** Immune response modeling of interferon beta-pretreated influenza virus-infected human dendritic cells. *Biophys J* **98**, 505-514.
- Ramon, J., Saez, V., Baez, R., Aldana, R. & Hardy, E. (2005).** PEGylated interferon-alpha2b: a branched 40K polyethylene glycol derivative. *Pharm Res* **22**, 1374-1386.
- Randall, R. E. & Goodbourn, S. (2008).** Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *Journal of General Virology* **89**, 1-47.
- Rappuoli, R. & Dormitzer, P. R. (2012).** Influenza: options to improve pandemic preparation. *Science* **336**, 1531-1533.
- Rehwinkel, J., Tan, C. P., Goubau, D., Schulz, O., Pichlmair, A., Bier, K., Robb, N., Vreede, F., Barclay, W., Fodor, E. & Reis e Sousa, C. (2010).** RIG-I detects viral genomic RNA during negative-strand RNA virus infection. *Cell* **140**, 397-408.
- Resa-Infante, P., Jorba, N., Coloma, R. & Ortin, J. (2011).** The influenza virus RNA synthesis machine: advances in its structure and function. *RNA Biol* **8**, 207-215.
- Rieder, M. & Conzelmann, K. K. (2009).** Rhabdovirus evasion of the interferon system. *J Interferon Cytokine Res* **29**, 499-509.
- Ritter, J. (2010).** Charakterisierung tierischer Zellkulturen anhand einer Quantifizierung intrazellulärer Metaboliten aus dem Zentralstoffwechsel. In *Forschungsberichte aus dem Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme*. Aachen, Germany: Shaker Verlag.
- RKI (2011).** Ratgeber für Ärzte – Influenza.
Source:
http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Influenza.html
(10.01.2012).
- Robb, N. C. & Fodor, E. (2012).** The accumulation of influenza A virus segment 7 spliced mRNAs is regulated by the NS1 protein. *J Gen Virol.* **93(Pt 1)**, 113-8
- Roberts, J. J. & Warwick, G. P. (1963).** The reaction of beta-propiolactone with guanosine, deoxyguanylic acid and RNA. *Biochem Pharmacol* **12**, 1441-1442.
- Rockman, S. & Brown, L. (2010).** Pre-pandemic and pandemic influenza vaccines. *Hum Vaccin* **6**, 792-801.
- Roers, A., Hochkeppel, H. K., Horisberger, M. A., Hovanessian, A. & Haller, O. (1994).** MxA gene expression after live virus vaccination: a sensitive marker for endogenous type I interferon. *J Infect Dis* **169**, 807-813.
- Romanova, J., Krenn, B. M., Wolschek, M., Ferko, B., Romanovskaja-Romanko, E., Morokutti, A., Shurygina, A. P., Nakowitsch, S., Ruthsatz, T., Kiefmann, B., König, U., Bergmann, M., Sachet, M., Balasingam, S., Mann, A., Oxford, J., Slais, M., Kiselev, O., Muster, T. & Egorov, A. (2009).** Preclinical Evaluation of a Replication-Deficient Intranasal Delta NS1 H5N1 Influenza Vaccine. *PLoS One* **4(6)**, e5984.
- Rutledge, R. G. & Côté, C. (2003).** Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res* **31**, e93.
- Sadler, A. J. & Williams, B. R. (2008).** Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol* **8**, 559-568.
- Samuel, C. E. (2001).** Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* **14**, 778-809.

- Scheuner, D., Patel, R., Wang, F., Lee, K., Kumar, K., Wu, J., Nilsson, A., Karin, M. & Kaufman, R. J. (2006).** Double-stranded RNA-dependent protein kinase phosphorylation of the alpha-subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis. *J Biol Chem* **281**, 21458-21468.
- Schmolke, M. & García-Sastre, A. (2010).** Evasion of innate and adaptive immune responses by influenza A virus. *Cell Microbiol* **12**, 873-880.
- Schuck, S., Manninen, A., Honsho, M., Füllekrug, J. & Simons, K. (2004).** Generation of single and double knockdowns in polarized epithelial cells by retrovirus-mediated RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4912-4917.
- Schulze-Horsel, J. (2011).** *Zellphysiologische Charakterisierung von Zellkulturen in der Influenza-Impfstoffproduktion*. Aachen: Shaker Verlag.
- Schulze-Horsel, J., Schulze, M., Agalaridis, G., Genzel, Y. & Reichl, U. (2009).** Infection dynamics and virus-induced apoptosis in cell culture-based influenza vaccine production-Flow cytometry and mathematical modeling. *Vaccine* **27**, 2712-2722.
- Seitz, C., Frensing, T., Höper, D., Kochs, G. & Reichl, U. (2010).** High yields of influenza A virus in Madin-Darby canine kidney cells are promoted by an insufficient interferon-induced antiviral state. *J Gen Virol* **91**, 1754-1763.
- Seo, S. H., Hoffmann, E. & Webster, R. G. (2002).** Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. *Nat Med* **8**, 950-954.
- Seth, R. B., Sun, L., Ea, C.-K. & Chen, Z. J. (2005).** Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* **122**, 669-682.
- Sherf, A., Wood, V. & Schenborn, T. (2002).** Dämpfungsgreagenzien und Tests für Enzym-vermittelte Lumineszenz (Patent DE 696 20 403 T 2).
- Sherwood, V., Burgert, H. G., Chen, Y. H., Sanghera, S., Katafigiotis, S., Randall, R. E., Connerton, I. & Mellits, K. H. (2007).** Improved growth of enteric adenovirus type 40 in a modified cell line that can no longer respond to interferon stimulation. *J Gen Virol* **88**, 71-76.
- Shun-Shin, M., Thompson, M., Heneghan, C., Perera, R., Harnden, A. & Mant, D. (2009).** Neuraminidase inhibitors for treatment and prophylaxis of influenza in children: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* **339**, b3172.
- Sidorenko, Y. & Reichl, U. (2004).** Structured model of influenza virus replication in MDCK cells. *Biotechnol Bioeng* **88**, 1-14.
- Sieczkarski, S. B. & Whittaker, G. R. (2002).** Dissecting virus entry via endocytosis. *J Gen Virol* **83**, 1535-1545.
- Smith, G. J., Vijaykrishna, D., Bahl, J., Lycett, S. J., Worobey, M., Pybus, O. G., Ma, S. K., Cheung, C. L., Raghvani, J., Bhatt, S., Peiris, J. S., Guan, Y. & Rambaut, A. (2009).** Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* **459**, 1122-1125.
- Snijder, B., Sacher, R., Rämö, P., Damm, E. M., Liberali, P. & Pelkmans, L. (2009).** Population context determines cell-to-cell variability in endocytosis and virus infection. *Nature* **461**, 520-523.
- Solórzano, A., Webby, R. J., Lager, K. M., Janke, B. H., García-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**, 7535-7543.
- Steidle, S., Martínez-Sobrido, L., Mordstein, M., Lienenklaus, S., García-Sastre, A., Stäheli, P. & Kochs, G. (2010).** Glycine 184 in nonstructural protein NS1 determines the virulence of influenza A virus strain PR8 without affecting the host interferon response. *J Virol* **84**, 12761-12770.
- Stieneke-Gröber, 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**, 2407-2414.
- Stuart-Harris, C. H. (1939).** A NEUROTROPIC STRAIN OF HUMAN INFLUENZA VIRUS. *The Lancet* **233**, 497-499.

- Stöhr, K., Kieny, M. P. & Wood, D. (2006).** Influenza pandemic vaccines: how to ensure a low-cost, low-dose option. *Nat Rev Microbiol* **4**, 565-566.
- Takaoka, A., Hayakawa, S., Yanai, H., Stoiber, D., Negishi, H., Kikuchi, H., Sasaki, S., Imai, K., Shibue, T., Honda, K. & Taniguchi, T. (2003).** Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature* **424**, 516-523.
- Takaoka, A. & Yanai, H. (2006).** Interferon signalling network in innate defence. *Cell Microbiol* **8**, 907-922.
- Talon, J., Horvath, C. M., Polley, R., Basler, C. F., Muster, T., Palese, P. & García-Sastre, A. (2000a).** Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein. *J Virol* **74**, 7989-7996.
- Talon, J., Salvatore, M., O'Neill, R. E., Nakaya, Y., Zheng, H., Muster, T., García-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**, 4309-4314.
- Tenoever, B. R. & Maniatis, T. (2006).** Parallel pathways of virus recognition. *Immunity* **24**, 510-512.
- Tobita, K., Sugiura, A., Enomote, C. & Furuyama, M. (1975).** Plaque assay and primary isolation of influenza A viruses in an established line of canine kidney cells (MDCK) in the presence of trypsin. *Med Microbiol Immunol* **162**, 9-14.
- Tree, J. A., Richardson, C., Fooks, A. R., Clegg, J. C. & Looby, D. (2001).** Comparison of large-scale mammalian cell culture systems with egg culture for the production of influenza virus A vaccine strains. *Vaccine* **19**, 3444-3450.
- Trent, J. M., Olson, S. & Lawn, R. M. (1982).** Chromosomal localization of human leukocyte, fibroblast, and immune interferon genes by means of in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 7809-7813.
- Trinchieri, G. (2010).** Type I interferon: friend or foe? *J Exp Med* **207**, 2053-2063.
- Ueda, M., Yamate, M., Du, A., Daidoji, T., Okuno, Y., Ikuta, K. & Nakaya, T. (2008).** Maturation efficiency of viral glycoproteins in the ER impacts the production of influenza A virus. *Virus Res* **136**, 91-97.
- Uytdehaag, A., Pau, M. G. & Schouten, G. (2007).** Production influenza virus vaccines: Patent WO 2007/045674 A1, CRUCCELL HOLLAND B.V.
- van Wielink, R., Harmsen, M. M., Martens, D. E., Peeters, B. P., Wijffels, R. H. & Moormann, R. J. (2011).** MDCK cell line with inducible allele B NS1 expression propagates delNS1 influenza virus to high titres. *Vaccine* **29**, 6976-6985.
- Varga, Z. T., Ramos, I., Hai, R., Schmolke, M., García-Sastre, A., Fernandez-Sesma, A. & Palese, P. (2011).** The influenza virus protein PB1-F2 inhibits the induction of type I interferon at the level of the MAVS adaptor protein. *PLoS Pathog* **7**, e1002067.
- Vester, D., Lagoda, A., Hoffmann, D., Seitz, C., Heldt, S., Bettenbrock, K., Genzel, Y. & Reichl, U. (2010a).** Real-time RT-qPCR assay for the analysis of human influenza A virus transcription and replication dynamics. *J Virol Methods* **168**, 63-71.
- Vester, D., Rapp, E., Gade, D., Genzel, Y. & Reichl, U. (2009).** Quantitative analysis of cellular proteome alterations in human influenza A virus-infected mammalian cell lines. *Proteomics* **9**, 3316-3327.
- Vester, D., Rapp, E., Kluge, S., Genzel, Y. & Reichl, U. (2010b).** Virus-host cell interactions in vaccine production cell lines infected with different human influenza A virus variants: a proteomic approach. *J Proteomics* **73**, 1656-1669.
- von der Malsburg, A., Abutbul-Ionita, I., Haller, O., Kochs, G. & Danino, D. (2011).** Stalk domain of the dynamin-like MxA GTPase protein mediates membrane binding and liposome tubulation via the unstructured L4 loop. *J Biol Chem* **286**, 37858-37865.
- von Itzstein, M. (2007).** The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* **6**, 967-974.
- von Magnus, P. (1951).** Propagation of the PR8 strain of influenza A virus in chick embryos. II. The formation of incomplete virus following inoculation of large doses of seed virus. *Acta Pathol Microbiol Scand* **28**, 278-293.

- Wacheck, V., Egorov, A., Groiss, F., Pfeiffer, A., Fuereder, T., Hoeflmayer, D., Kundi, M., Popow-Kraupp, T., Redlberger-Fritz, M., Mueller, C. A., Cinatl, J., Michaelis, M., Geiler, J., Bergmann, M., Romanova, J., Roethl, E., Morokutti, A., Wolschek, M., Ferko, B., Seipelt, J., Dick-Gudenus, R. & Muster, T. (2010). A novel type of influenza vaccine: safety and immunogenicity of replication-deficient influenza virus created by deletion of the interferon antagonist NS1. *J Infect Dis* **201**, 354-362.
- Walkiewicz, M. P., Basu, D., Jablonski, J. J., Geysen, H. M. & Engel, D. A. (2011). Novel inhibitor of influenza non-structural protein 1 blocks multi-cycle replication in an RNase L-dependent manner. *J Gen Virol* **92**, 60-70.
- Wang, X., Hinson, E. R. & Cresswell, P. (2007). The interferon-inducible protein viperin inhibits influenza virus release by perturbing lipid rafts. *Cell Host Microbe* **2**, 96-105.
- Wang, X., Li, M., Zheng, H., Muster, T., Palese, P., Beg, A. A. & García-Sastre, A. (2000). Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappaB and induction of alpha/beta interferon. *J Virol* **74**, 11566-11573.
- Wang, Z., Robb, N. C., Lenz, E., Wolff, T., Fodor, E. & Pleschka, S. (2010). NS reassortment of an H7-type highly pathogenic avian influenza virus affects its propagation by altering the regulation of viral RNA production and antiviral host response. *J Virol* **84**, 11323-11335.
- Wenzel, J., Wörenkämper, E., Freutel, S., Henze, S., Haller, O., Bieber, T. & Tüting, T. (2005). Enhanced type I interferon signalling promotes Th1-biased inflammation in cutaneous lupus erythematosus. *J Pathol* **205**, 435-442.
- Whittaker, G. R. & Digard, P. (2006). Entry and intracellular transport of influenza virus. In *Influenza Virology: Current Topics*. Edited by Y. Kawaoka. Wymondham: Caister Academic Press.
- WHO (2009). Fact sheet N°211 - Seasonal Influenza.
source: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/> (04.01.2012)
- Willems, E., Leyns, L. & Vandesomepele, J. (2008). Standardization of real-time PCR gene expression data from independent biological replicates. *Anal Biochem* **379**, 127-129.
- Wilschut, J. & McElhaney, J. E. (2005). *Influenza*. London: Mosby.
- Wise, H. M., Foeglein, A., Sun, J., Dalton, R. M., Patel, S., Howard, W., Anderson, E. C., Barclay, W. S. & Digard, P. (2009). A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *J Virol* **83**, 8021-8031.
- Wolff, T. & Ludwig, S. (2009). Influenza Viruses Control the Vertebrate Type I Interferon System: Factors, Mechanisms, and Consequences. *Journal of Interferon and Cytokine Research* **29**, 549-557.
- Wood, J. S. & Robertson, J. S. (2007). Reference viruses for seasonal and pandemic influenza vaccine preparation. *Influenza Other Respi Viruses* **1**, 5-9.
- Wurzer, W. J., Ehrhardt, C., Pleschka, S., Berberich-Siebelt, F., Wolff, T., Walczak, H., Planz, O. & Ludwig, S. (2004). NF-kappaB-dependent induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and Fas/FasL is crucial for efficient influenza virus propagation. *J Biol Chem* **279**, 30931-30937.
- Wurzer, W. J., Planz, O., Ehrhardt, C., Giner, M., Silberzahn, T., Pleschka, S. & Ludwig, S. (2003). Caspase 3 activation is essential for efficient influenza virus propagation. *EMBO J* **22**, 2717-2728.
- Yamaoka, M., Homma, M. & Hotta, H. (1995). MDCK cell cultures supplemented with high concentrations of trypsin exhibit remarkable susceptibility to influenza C virus. *Arch Virol* **140**, 937-944.
- Yao, Z., Jaeger, J. C., Ruzzo, W. L., Morale, C. Z., Emond, M., Francke, U., Milewicz, D. M., Schwartz, S. M. & Mulvihill, E. R. (2007). A Marfan syndrome gene expression phenotype in cultured skin fibroblasts. *BMC Genomics* **8**, 319.
- 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**, 730-737.

- Youil, R., Su, Q., Toner, T. J., Szymkowiak, C., Kwan, W. S., Rubin, B., Petrukhin, L., Kiseleva, I., Shaw, A. R. & DiStefano, D. (2004).** Comparative study of influenza virus replication in Vero and MDCK cell lines. *J Virol Methods* **120**, 23-31.
- Young, D. F., Andrejeva, L., Livingstone, A., Goodbourn, S., Lamb, R. A., Collins, P. L., Elliott, R. M. & Randall, R. E. (2003).** Virus replication in engineered human cells that do not respond to interferons. *J Virol* **77**, 2174-2181.
- Young, D. F., Galiano, M. C., Lemon, K., Chen, Y. H., Andrejeva, J., Duprex, W. P., Rima, B. K. & Randall, R. E. (2009).** Mumps virus Enders strain is sensitive to interferon (IFN) despite encoding a functional IFN antagonist. *J Gen Virol* **90**, 2731-2738.
- Zeng, H., Goldsmith, C., Thawatsupha, P., Chittaganpitch, M., Waicharoen, S., Zaki, S., Tumpey, T. M. & Katz, J. M. (2007).** Highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses elicit an attenuated type I interferon response in polarized human bronchial epithelial cells. *J Virol* **81**, 12439-12449.
- Zhang, P. & Samuel, C. E. (2007).** Protein kinase PKR plays a stimulus- and virus-dependent role in apoptotic death and virus multiplication in human cells. *J Virol* **81**, 8192-8200.
- Zhirnov, O. P., Konakova, T. E., Wolff, T. & Klenk, H.-D. (2002).** NS1 protein of influenza A virus down-regulates apoptosis. *J Virol* **76**, 1617-1625.

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Aufbau von Influenza A Viren	3
Abbildung 2-2: Schematische Darstellung der Influenza A-Virusreplikation	5
Abbildung 2-3: Induktion der Typ I IFN-Antwort und des IFN-induzierten, antiviralen Status bei der Influenza-Virusinfektion.	13
Abbildung 4-1: Test verschiedener Transfektionsmethoden für MDCK-Zellen.	43
Abbildung 4-2: Effizienz verschiedener chemischer Transfektionsmethoden für frisch ausgesäte MDCK-Zellen.	44
Abbildung 4-3: Bestimmung der IFN-Aktivierung mit luciferasebasierten Reportergeräten-Assays.	45
Abbildung 4-4: Reproduzierbarkeit der höheren Mx1-Expression in Abwesenheit von Trypsin in fünf unabhängigen Experimenten.	50
Abbildung 4-5: Stammabhängige Induktion der IFN-Antwort in Influenza-virusinfizierten MDCK-Zellen.	54
Abbildung 4-6: Aktivierung des IFN-Systems durch inaktivierte Influenza-Viren.	56
Abbildung 4-7: Einfluss nicht-infektiöser Viruspartikel im Saatvirus auf die Induktion der IFN-Antwort.	58
Abbildung 4-8: Einfluss nicht-infektiöser Viruspartikel auf die Virusreplikation.	60
Abbildung 4-9: Effekt der IFN-Unterdrückung durch transiente Überexpression von PR8-NS1 auf die Replikation verschiedener Influenza-Virusstämme	62
Abbildung 4-10: Effekt der IFN-Unterdrückung durch transiente Expression von PR8-NS1 auf die Virusreplikation bei verschiedenen MOIs.	63
Abbildung 4-11: Unterdrückung der IFN-Antwort durch verschiedene virale IFN-Antagonisten in MDCK-Zellen.	64
Abbildung 4-12: Einfluss der IFN-Unterdrückung durch Überexpression von NS1 und P für verschiedene Influenza-Virusstämme.	65
Abbildung 4-13: IFN-Antwort und Virusreplikation in An- und Abwesenheit von Trypsin.	67
Abbildung 4-14: Einfluss unterschiedlicher Trypsinkonzentrationen auf die HA-Spaltung und die IFN-Antwort.	69
Abbildung 4-15: Aktivierung von STAT2 und Mx1 bei Virusinfektion in Anwesenheit und Abwesenheit von Trypsin.	71
Abbildung 4-16: Proteolytischer Abbau von MDCK-IFN durch Trypsin.	73
Abbildung 4-17: Potentieller Einfluss der Infektionsdynamik auf die Stärke der IFN-Antwort.	74
Abbildung 4-18: Einfluss von TMPRSS2 auf die HA-Spaltung und extrazelluläres IFN- β .	75
Abbildung 4-19: Trypsinunabhängige Beschleunigung der Infektionsausbreitung durch TMPRSS2.	77
Abbildung 4-20: IFN-Aktivierung bei Verzögerung der Infektionsdynamik in Gegenwart von Trypsin durch Zanamivir.	78
Abbildung 4-21: Der Effekt von Trypsin auf das Wachstum von PR8-deINS1 in MDCK-Zellen.	79
Abbildung 4-22: Einfluss von trypsinvermittelter, schneller Infektionsdynamik und IFN-Degradation auf die Überwindung des IFN-induzierten antiviralen Status.	82
Abbildung 5-1: Zeitlichen Normierung zweier unabhängiger Experimente auf den Zeitpunkt des ersten messbaren HA-Anstiegs.	88
Abbildung 5-2: Zeitlicher Verlauf der IFN-Induktion, Virusinfektion, Apoptose-Induktion und Virusproduktion bei Verwendung von Trypsin.	104

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Virale Proteine von Influenza A-Viren und deren Funktionen (Cheung & Poon, 2007; Ludwig <i>et al.</i> , 1999)	4
Tabelle 3-1: Zusammensetzung von Z- und V-Medium	23
Tabelle 3-2: Zusammensetzung von PBS.....	23
Tabelle 3-3: Zusammensetzung der 10-fach Trypsinlösung zum Passagieren von Zellen.....	24
Tabelle 3-4: Sequenzen der Primer für qPCR- und reverse Transkriptase-Reaktionen	24
Tabelle 3-5: Übersicht über die verwendeten Plasmide	25
Tabelle 3-6: Verwendete Mengen PBS, Trypsin und Z-Medium beim Umsetzen von MDCK-Zellen	26
Tabelle 3-7: Übersicht über die hier verwendeten Influenza-Virusstämme	29
Tabelle 3-8: Zellzahlen, Medien-, Trypsin- und Virusvolumina bei der Zellaussaat und Virusinfektion in 6- und 24-Wellplatten	30
Tabelle 3-9: Zusammensetzung des Firefly-Luciferase-Puffers, übernommen aus Dyer <i>et al.</i> (2000).....	36
Tabelle 3-10: Zusammensetzung des Renilla-Luciferasepuffers, übernommen aus Sherf <i>et al.</i> (2002)	37
Tabelle 3-11: Zusammensetzung des RIPA-Stocks	37
Tabelle 3-12: Zusammensetzung RIPA-Lysepuffer	37
Tabelle 3-13: Übersicht über die verwendeten Antikörper	39
Tabelle 4-1: Zusammenfassung der Optimierungsversuche für luciferasebasierte Reporter-Gen-Assays mit pSRE-Luc, pAP1-Luc und pNF κ B-Luc	46
Tabelle 4-2: Linearer Messbereich und PCR-Effizienzen der qPCR-Assays für 18s rRNA, IFN- β , Mx1 und virales M1	47
Tabelle 4-3: p-Werte des Shapiro-Wilk-Tests und des Leven's Tests für die in Abbildung 4-4 dargestellten Daten	51
Tabelle 4-4: p-Werte des t-Tests, des Wilcoxon-Tests und des Friedman-Tests für den paarweisen Vergleich der Expressionswerte von Mx1 und der HA-Titer in Gegenwart und Abwesenheit von Trypsin (Abbildung 4-4)	52
Tabelle 4-5: Übersicht über die in 4.3.2 verwendeten Saatviren.....	57
Tabelle 4-6: Übersicht über die in 4.3.3 verwendeten Saatviren.....	59
Tabelle 9-1 Verwendete Geräte	129
Tabelle 9-2 Verwendete Chemikalien und Kits	131

9 Anhang

9.1 Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9-1 Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller	Modell
Brutschrank	Heraeus	HERAcell® 240
DNA/RNA-Elektrophorese		
- Kammer	biomed. Analytik GmbH	Agagel Maxi Biometra
- Netzgerät	VWR	Power Source 300V
- UV-Lampe	Gibco	BRL UV Transluminator
- Kamera	Herolab	Easy 429K
Elektroporation	Digital Bio	Microporator
	Life Technologies	Neon 100 µL Kit (Elektroporationsspitzen)
Feinwaage	Sartorius	TE 1502S
Fluoreszenz-Scanner	GE Healthcare	Typhoon Variable Mode Imager 9400
Handdispenser	Eppendorf	Multipette stream
Heizblock/ Magnetrührer	Heidolph	MR Hei-Standard
Luminometer	Berthold	Centro L960
Mikropipetten	Gilson / Eppendorf	2, 10, 20, 200, 1000 µL
Mikropipettenspitzen	Gilson	Diamond® TIPACK 2, 10, 20, 200, 1000 µL
Mikroskopie		
- Mikroskope	Zeiss	Axioskop 2; Axiovert 25; Axiovert S100
- Kamera	Sony	AVT Horn 3 CCD
- Software	Mecha Cybernetics	Optimas 6.2
Mikrotiterplatten	Greiner bio-one	96-Well Platten, flacher und U-Boden
Mikrotiterplattenreader/ Spektrometer	Tecan	Infinite® 200 PRO NanoQuant
Mehrkanalpipette	Eppendorf	100, 300, 1000 µL
Nucleofector	Amaxa / Lonza	Nucleofector II device
	Amaxa / Lonza	Amaxa Cell Line Nucleofector Kit L
PCR-Platten	ABGene	ThermoFast 96 Semiscirted PCR-Plate
	ABGene	Ultra-Clear Cap Stripes
PCR-Tubes	Sarstedt	Multiply® Pro 200 µL
qPCR-Disks	Qiagen	Rotor-Disc™100
qPCR-Disk-Siegelfolie	Qiagen	Rotor-Disc™ Heat Sealing Film
qPCR-Disk-Versiegler	Qiagen	Rotor-Disc™ Heat Sealer
Einwegpipetten	Greiner bio-one	Cellstar® 1, 2, 5, 10, 25, 50 mL
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte	pipetus®
Pipettierroboter	Qiagen	QIAgility™, Software-Version 4.14.2 Build 2

9.1 Anhang - Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät	Hersteller	Modell
Protein-Elektrophorese	Biorad	Mini-PROTEAN Electrophoresis System
Reaktionsgefäße	Sarstedt	Safe Seal 1,5 und 2 mL
Real-Time-PCR Cycler	Qiagen	Rotor-Gene® Q, Software-Version 2.0.2 Build 2
	Biorad	iCycler , Software-Version 3.1.7050
Reinstwasseranlage	Millipore	Milli-Q® Advantage A10
Sterilbank	Heraeus	HERAsafe®
T-Flaschen	Greiner bio-one	Cellstar® 25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²
Thermocycler	Biometra	T3000
Thermomixer	Eppendorf	Thermomixer Comfort
Vortex	Scientific Industries, Inc.	Vortex-Genie® 2
Zellzählung	Beckman Coulter	Vi-Cell™ XR
Zentrifugen	Thermo Electron Corp.	Heraeus® Fresco™ 17
	Beckman Coulter	Avanti J 20, Optima LE 80K
Spin-Filter (Ultrazentrifugation)	Sartorius	Vivaspin 20 100 kDa cutoff-Tubes
Western-Blot Equipment	Biorad	Mini Trans-Blot System
Chemoluminiszenz-Imager	Intas	Intas ChemoCam HR 16 3200
Zellkultur-Einweggefäße	Greiner bio-one	Cellstar 25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ² , 6-, 24- und 96-Well-Platten, Cellmaster 850 cm ² Rollerflasche

9.2 Verwendete Chemikalien und Kits

Tabelle 9-2 Verwendete Chemikalien und Kits

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
1,2-Cyclohexandinitrilotetraessigsäure (CDTA)	Sigma-Aldrich	35103
2-Phosphoglycerate (2-PG)	Sigma-Aldrich	79470-50MG
Acrylamid 30% (Mix 37, 5:1)	Applichem	A3626,1000
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich	A2383-1G
Agarose	AppliChem	A2114,1000
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Merck	2300
APMBT (2-(4-Aminophenyl)-6-methylbenzothiazol)	AppliChem	A7507,0010
Bacto Trypton	BD	211705
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific	23227
Bovine Serum Albumine (BSA)	AppliChem	A1391,0100
Coelenterazin	AppliChem	A2817,0001
Coenzym A	Sigma-Aldrich	C3144-10MG
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Merk	105109
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck	106566
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merk	106566
Dinatriumsulfat	Sigma-Aldrich	S9627-500G
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich	43817-1G
DNA Ladepuffer (6x)	Fermentas	R0611
dNTPs	Fermentas	R0191
EDTA	Sigma-Aldrich	EDS-100g
Essigsäure	Carl Roth	3738,1
Ethanol	Carl Roth	9065,4
Ethylenglycol Tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich	E0396-10G
FCS	Pan Biotech	10270-106
GeneRuler™ DNA Ladder Mix, ready to use	Fermentas	SM0333
Gentamicin	Invitrogen	15710064
Glucose	Sigma-Aldrich	G-8270
Glycerol	Carl Roth	3783,1
Glycine	AppliChem	A3707,0500
Glycylglycin	Sigma-Aldrich	G1002-25G
GMEM-Pulver	Gibco	22100-093
HCl, 37 %	Carl Roth	X942.1
Isopropanol	Merck	1096342511
Kaliumchlorid	Merck	1049355000
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	104872
L-Glutamin	Merck	1002891000
Lipofectamine 2000	Invitrogen/Life Technologies	11668-019
Lipofecatamie LTX	Invitrogen/Life Technologies	15338-100
Luciferin	Sigma-Aldrich	L9504-1MG

9.2 Anhang - Verwendete Chemikalien und Kits

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
MagicMarker®Protein Ladder	Invitrogen	LC5602
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich	M7506-500G
Metafectene Pro	Biontex	T040-1.0
MESA Green qPCR Mastermix	Eurogentec	RT-SY2X-03
Methanol	Carl Roth	CP43.1
Milchpulver	Carl Roth	T145.1
N,N,N',N',-Tetramethylethane-1,2-Diamin (TEMED)	GE Healthcare	17-1312-01
Natriumacetat	Sigma-Aldrich	S2889-250G
Natriumchlorid	Carl Roth	P029.3
Natriumcitrat	Carl Roth	HN13.1
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich	S8282
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich	S7920
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich	S6014
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich	S8045
Natriummolybdat	Sigma-Aldrich	M1003
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich	S6508
Natriumpyrophosphat	Sigma-Aldrich	71515-250G
NTP Set, 100 mM	Fermentas	R0481
NucleoBond® Xtra Midi EF	Macherey-Nagel	740.410.10
NucleoSpin® RNA II	Macherey-Nagel	740955250
NucleoSpin® RNA Virus	Macherey-Nagel	740956250
Pepton	Lab M limited	LAB204
Phenylmethanesulfonylflouride (PMSF)	Sigma-Aldrich	93482
Passive lysis buffer (PLB)	Promega	E1941
Ponceau Rot	Merck	1142750010
Proteaseinhibitor Mix	Roche	11697498001
PVDF-Membran	Millipore	IPVH00010
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen	28706
Random Hexamer Primer	Fermentas	SO142
RevertAid™ H Minus Reverse Transkriptase	Fermentas	EP0451
RiboLock™ RNase Inhibitor	Fermentas	EO0382
Roti-Safe GelStain	Carl Roth	3865
Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit	Qiagen	204076
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem	A2263,0100
SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrat	Thermo Scientific	34075
TPCK-treated trypsin	Sigma-Aldrich	T1426
Tris-Cl	Applichem	A3452
Trypsin	Gibco	1188797
Trypsin	Sigma-Aldrich	T7409
Tween 20	Merck	655204-100ML
Yeast Extract	BD	212750
Zanamivir	Chemos	144733
β-Mercaptoethanol	Merck	444203

9.3 Arbeitsanweisungen

9.3.1 M 02: Herstellung von Glasgow-MEM-Vollmedium aus gebrauchsfertigen

Teillösungen

Datum: 13.04.2000 Autor: Dr. Annett Kiesel
geändert: 23.11.2005 Autor: Susanne Koenig
geändert: 11.09.2006 Autor: Nancy Schlawin

1. Ziel

Herstellung von Vollmedium zur Kultivierung von MDCK-Zellen, speziell als „back - up“. Alle Medienbestandteile sind bereits als Lösungen steril vorhanden und brauchen nur noch zusammenpipettiert zu werden.

2. Material

- foetales Kaelberserum (FCS, Fa. Gibco, Best.Nr. 10270-106): 500 mL-Flasche
- Glasgow-MEM (BHK-21-Medium, Fa. Gibco, Best.Nr. 21710-025): 500 mL-Flasche
- Tryptose Phosphate Broth (Fertigbouillon, c = 29,5 g/L, Fa. Gibco, Best.Nr. 18050-047) : 500 mL Flasche
- Pipetten
- sterile Flasche

3. Methode

- Die Flasche mit dem FCS wird über Nacht im Kuehlschrank aufgetaut.
- Alle Teilloesungen auf Zimmertemperatur erwaermen lassen und steril unter der Werkbank zusammengiessen (auf der Waage abwiegen).
- Zusammensetzung des Vollmediums:
 - Glasgow-MEM-Fertigmedium
 - 10% FCS
 - 2 g/L Tryptosephosphat (= 68 mL der Fertigbouillon)
- 416 mL des Glasgow-MEM-Mediums aus der 500 mL-Flasche mit Glasgow-MEM-Medium in eine sterile Flasche geben bzw. sammeln um weitere Flaschen herzustellen (bei Dokumentation beachten, d.h. die fertige FM-Flaschennummer ins Datenblatt eintragen, bzw. Restmedium der vorherigen Flasche).
- Zugabe von 50 mL FCS, sowie 34 mL Tryptosephosphat (c = 2 g/L) in die 500 mL-Flasche
- Angabe der jeweils verwendeten Chargen im Arbeitsblatt.
- Vollstaendige Beschriftung der Flaschen (MEM + 10% FCS + TPB, Datum).
- Von allen hergestellten Flaschen, sowie dem FCS und Tryptosephosphat 2 x 2ml in Casobouillon geben.
- Bei negativer Bewertung nach 4 Wochen der Bouillons, kann das Medium genommen werden.

4. Verwendung

Wird als sogenanntes FM-Medium zur Kultivierung von MDCK-Zellen verwendet. Da alle Medien steril gekauft werden dient es als Kontrollflasche, falls die selbsthergestellten Medien unsteril sein sollten.

5. Lagerung

- Das Vollmedium (GMEM) wird bei 4°C aufbewahrt (siehe Haltbarkeitsdatum).
- FCS ist aufgetaut 6 Monate bei 4°C haltbar (Lagerung sonst bei –20°C).
- Tryptose Phosphate Broth wird bei 4°C aufbewahrt (siehe Haltbarkeitsdatum).
- Das fertige FM-Medium kann im Kuehlschrank ca. 3 Monate aufbewahrt werden.

9.3.2 M 03: Herstellung von Glasgow-MEM-Medium aus Pulvermedium

Datum: 12.04.2000	Autor: Dr. Annett Kiesel
ueberarbeitet: 2002	Autor: I. Behrendt
ueberarbeitet: 23.11.2005	Autor: S.Koenig
ueberarbeitet: 11.09.2006	Autor: N. Schlawin
ueberarbeitet: 19.08.2010	Autor: S.Koenig

1. Ziel:

Herstellung von Glasgow-MEM-Vollmedium zur Kultivierung von MDCK-Zellen in groesseren Mengen. Pulvermedium ist wesentlich preiswerter als Fertigmedium. Da der Sterilfilter aber sehr teuer ist, sollten mindestens 30 L angesetzt werden. Die maximale Menge pro Filtereinsatz betraegt 60L.

2. Material

- BHK-21-Medium- (Glasgow-MEM-) Pulvermedium (Fa. Gibco, Best.Nr. 22100-093, für 50 L)
- NaHCO₃ (Fa. Merck, Best.Nr.: 1.06329.1000)
- Glucose (Fa. Roth, Best.Nr.: X997.2)
- Magnetrührer mit Ruehrstab
- Ansatzgefäß (z. B. 5L Becherglas)
- sterile 1L – 5L -Flaschen (für das sterilfiltrierte Medium)
- 1 N HCl (Fa.Roth, Best.Nr.fuer 37%: 4625.1 oder Fa. Merck, Best. Nr. fuer 37%: 1.00317.1000)
- 1 N NaOH (Fa. Merck, Best. Nr. fuer Plaetzchen: 1.06482.1000)
- Sterilfiltrieranlage (Sterilfilter Sartobran 300 von Sartorius, Edelstahl Druckbehaelter, 2 Druckschlaeuche, 4 Schlauchklemmen, 1 Aterienklemme, Stativ)
- pH-Meter
- Druckluft
- Mikrowelle (zum zuegigen Erhitzen des Milli-Q-Wassers)
- Pepton (Fa. idg / Grossbritannien, Best.Nr.: MC 33)
- Schutzbrille

3. Methode

3.1 Zusammensetzung des Glasgow-Mediums (4,5 L):

- | | |
|-----------------------------------|--------|
| - Glasgow-MEM-Pulvermedium: | 62,6 g |
| - NaHCO ₃ | 20,0 g |
| - Glucose | 5,00 g |
| - pH-Wert (Einstellung): Sollwert | 6,7 |

3.2 Ansetzen des Glasgow-MEM-Mediums (4,5 L):

- 2,5 L Milli-Q-Wasser in das Ansatzgefäß auf dem Magnetruehrer geben.
- 1 L Milli-Q-Wasser auf ca. 90°C erwaermen (in der Mikrowelle, 10min bei 1000 W).
- Dann das warme Wasser zu den 2,5 L hinzufuegen, das Milli-Q-Wasser betraegt jetzt ca. 35°C -37°C
- 62,6 g Pulver abwiegen und gleich in das ca. 35°C -37°C warme Wasser einruehren (Pulver ist stark hygroskopisch).
- 20 g NaHCO₃ und 5 g Glucose hinzufuegen und loesen .
- pH-Wert mit NaOH oder HCl auf 6,7 einstellen

- Auf 4,5L mit Milli-Q-Wasser auffüllen und in den Edelstahlbehälter füllen, sofort sterilfiltrieren (in eine oder mehrere sterile Flaschen).
- Da es eine Druckfiltration ist, Schutzbrille tragen. Der Druck beträgt max. 1,5 bar.
- Angabe der jeweils verwendeten Chargen (Datum) im Arbeitsblatt eintragen.
- Vollständige Beschriftung (Datum, Bezeichnung)
- Von dem sterilfiltrierten Medium Sterilkontrollen in CASO-Bouillon anlegen (je 2 am Anfang, 2 in der Mitte und 2 am Ende).

4 Lagerung

Bei 4 °C bis 8°C kann das Medium maximal 6 Monate aufbewahrt werden. Die Stabilität von Glutamin und anderen Inhaltsstoffen kann dann abnehmen.

9.3.3 Z 02: Auftauen von MDCK-Zellen

Autor: Ilona Behrendt

1. Ziel

Schonendes Auftauen von in der Gasphase von flüssigem Stickstoff langzeit-gelagerten MDCK-Zellen.

2. Material

- Zellen in Kryoröhrchen im flüssigen Stickstoff
- Stickstoffaufbewahrungsbehälter
- Schutzkleidung: Thermohandschuhe und Schutzschild
- Wasserbad 37°C
- Kulturgefäß (T25, besser T75)
- Vollmedium (komplett gemischt mit FCS und Tryptosephosphatboullion oder Pepton) oder serumfreies Medium (Episerf, Optipro, Ex-Cell) (auf Raumtemperatur vorgewärmt)
- Werkbank gesäubert
- Pipettierhilfe, Pipetten (steril)
- Desinfektionslösung (Descosept AF / Cleanisept) in Sprühflasche
- Sterillium für Händedesinfektion

3. Methode

- Werkbank 15min vor Arbeitsbeginn einschalten, desinfizieren
- Pipetten, Pipettierhilfe und Medium desinfizieren und in die Sterilbank stellen
- Handschuhe anziehen und desinfizieren
- unter Sterilbank Medium in die Zellkulturflasche pipettieren oder gießen (20 ml in eine T25-Flasche, 50 ml in eine T75-Flasche)
- Zellen aus dem Stickstoffbehälter holen (mit Schutzkleidung!!!) und schnell auftauen

Gefriermittel DMSO ist toxisch. Die Zellen müssen möglichst schnell aufgetaut werden und in das Medium zur Verdünnung überführt werden!! Kryoröhrchen nicht über-Kopf-schütteln – Kontaminationsgefahr!

- Kryoröhrchen sofort nach dem Schmelzen des letzten Eisklumpchen von außen desinfizieren und unter die Werkbank stellen
- den Inhalt mit einer geeigneten Pipette in die Kulturflasche überführen (die Kulturflasche sollte mind. 20 ml Medium enthalten, um das DMSO ausreichend zu verdünnen)
- bei Problemen während der Anzucht:
 1. nach dem Anheften der Zellen (ca. 4 – 12 h) einen Mediumwechsel durchführen, um das DMSO aus der Kultur zu entfernen (siehe Arbeitsanweisung Z/03) oder
 2. gerade aufgetaute Zellen in ein mit 40 ml Medium (37°C) gefülltes 50-ml-Falkongefäß überführen, in der Zentrifuge bei 500 x g Zellen 5 min bei Raumtemperatur abzentrifugieren, Medium abpipettieren und Zellen in einem geeigneten Volumen (Bsp. 50 ml) Medium aufnehmen und in die Zellkulturflasche überführen (Bsp. T75)

9.3.4 Z 04: Passagieren von MDCK-Zellen in serumhaltigem Medium

Datum: 14.04.2000 Autor: Dr. Annett Kiesel
geändert am: 09.07.2003 Autor: Ilona Behrendt
geändert am: 20.06.2006 Autor: Susanne Koenig
geändert am: 11.09.2006 Autor: Nancy Schlawin

1. Ziel

Langzeitkultivierung und Vermehrung von Zellen, zur Beimpfung mit verschiedenen Virusarten und späteren Aufarbeitung.

2. Materialien

- Kultur mit konfluent gewachsenen Zellen (25-cm²-, 75-cm²-, 175-cm²-Flasche oder 850-cm²-Rollerflasche);
- MDCK-Zellen: 4- bis 6-Tage alte, konfluent gewachsene Kultur
- Trypsin/ EDTA-Lösung (0,05% Trypsin/ 0,02% EDTA, 37°C), 1:10-Verdünnung aus Stammlösung, siehe Arbeitsanweisung M/07
- Vollmedium (GlasgowMEM komplett gemischt mit 10% FCS und Tryptosephosphatboullion/Pepton), siehe Arbeitsanweisungen M/02 oder M/04
- PBS (Raumtemperatur) siehe Arbeitsanweisung M/01
- foetales Kaelberserum (FCS) (auf Raumtemperatur vorwärmen)
Firma: Gibco/Best.Nr.: 10270106

3. Methode

- Kulturflaschen aus dem Brutschrank nehmen und desinfizieren, unter die Werkbank stellen
- Kulturflaschen aufschrauben, Deckel mit Öffnungen nach oben legen (Deckel nach hinten legen, so dass man nicht darüber fasst beim Arbeiten)
- altes Medium in eine sterile Abfallflasche abgießen (nicht den Rand beruehren!)
- die Zellen mit PBS-Lösung 2x waschen (s. Volumentab., I), gebrauchtes PBS in die sterile Abfallflasche abgießen (dazwischen die T-Flaschen immer zuschrauben und schwenken)
- Trypsin/ EDTA-Lösung zupipettieren, ein dünner Flüssigkeitsfilm genuegt (s. Volumentab., II), und die Zellen bei 37 °C für ca. 20 min inkubieren
- in der Zwischenzeit neue Kulturflasche mit entsprechender Menge Medium befüllen (s. Volumentab., IV)
- nach 10 min Trypsininkubation die Flasche zum erstenmal leicht schuettern, dann Zellen weiterinkubieren (insgesamt ca. 20 bis 30 min.) bis sich die Zellen nach erneutem kraeftigen Schuettern vom Boden abloesen (optische Kontrolle und/oder unterm Mikroskop angucken)
- zum Abstoppen der enzymatischen Reaktion FCS (s. Volumentab., III) zu den abgelösten Zellen geben
- durch mehrmaliges (ca. 2-3x) Aufziehen des Inhaltes der Flasche in eine Pipette erfolgt eine Zellvereinzlung (um Schaum zu vermeiden, Pipetteninhalt am Flaschenboden oder an der Innenseite der Flasche auslaufen lassen!)
- von dieser Zellsuspension entnimmt man 1/3tel bis 1/6tel (bei Inkubation in Flaschen mit gleichem Volumen) und pipettiert dieses jeweils in eine der vorbereiteten Flaschen (Berechnung der Einsaatdichte siehe unter Punkt 5 oder 6).
- **Beachte!** Fuer Zellkultivierung Deckel mit Membran benutzen (CO₂-durchlaessig), bei Arbeiten mit Virus in den T-Flaschen, geschlossenen Deckel (ohne Membran) nehmen.
- Flaschen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubieren

4. Volumentabelle

Kulturgefaess	PBS zum Waschen (I)	Trypsin/EDTA (II)	FCS (III)	Vollmedium (IV)
25-cm ² -Flasche	5 – 10 mL	1 mL	1 mL	15 - 20 mL
75-cm ² -Flasche	10 – 15 mL	3 mL	3 mL	50 mL
175-cm ² -Flasche	15 – 20 mL	5 mL	5 mL	100 - 125 mL
850-cm ² - Rollerflasche	40 – 50 mL	10 mL	10 mL	250 mL

5. „Faustregeln“ für die Anzucht von MDCK-Zellen

- Ausgangskultur: 4- bis 6-Tage alte, konfluent gewachsene Kultur (zu alte Kulturen vermeiden)
- Weiterkultivierung der Zellen in einer Kulturflasche mit gleichem Volumen: 1/3tel bis 1/6tel der Zellen in die neue Flasche geben.
- Vermehrung der Zellen für den Fermenter: Ampulle – T75 – T175 – Rollerflasche: jeweils die gesamten Zellen in das naechstgroessere Kulturgefaess ueberfuehren (Ampulle mit $2 - 5 \times 10^6$ Zellen/mL; wenn weniger Zellen oder alte Zellen: Zwischenstufe über T25)
- Zellen nicht untereinander austauschen (bei Kontaminationsgefahr nicht mehr genau nachvollziehbar, woher diese stammt)
- fuer eine Reaktorkultivierung Zellen aus einer Passagierung kleiner 20 verwenden
- stets eine T 75 Flasche parallel zur Fermentation als back-up laufen lassen

6. Einsaat

6.1 *Ermittlung des Einsaatvolumens*

- ermittelte Zellzahl der trypsinierten Flasche Z (z. B. $1,2 \times 10^6$ Zellen / mL)
- Tage, in denen die Zellen bis zur Konfluenz wachsen sollen T (z. B. 4 d)
- empirisch ermittelte Einsaatdichte E , bei der die Zellen nach T Tagen in dem verwendeten Kulturgefaess konfluent sind (z. B. $0,8 \times 10^7$ Zellen pro 175 cm² werden benoetigt, um in 4 Tagen eine konfluente Kultur in einer 175-cm²-Flasche zu erhalten)
- Rechnung: $E : Z = \text{Volumen [mL]}$

Bsp:

$(0,8 \times 10^7 \text{ Zellen}) : (1,2 \times 10^6 \text{ Zellen/mL}) = 6,7 \text{ mL}$

In eine 175-cm²-Flasche muessen 6,7 mL einer Zellsuspension, die $1,2 \times 10^6$ Zellen/mL enthält, pipettiert werden, um nach 4 Tagen eine konfluente Kultur zu erhalten.

6.2 *Bestimmung der Einsaat*

Einsaat = Zellen pro cm²

= (Einsaatvolumen x Zellzahl) : Oberflaeche

Bsp.: = $(6,7 \text{ mL} \times 1,2 \times 10^6 \text{ Zellen/mL}) : 175 \text{ cm}^2 = 4,6 \times 10^4 \text{ Zellen/cm}^2$

6,7 mL der Zellsuspension (mit $1,2 \times 10^6$ Zellen/ml) ergeben in einer 175-cm²-Flasche eine Einsaat von $4,6 \times 10^4$ Zellen/cm².

Was ist ein guter Richtwert pro cm² ?

z.B. : $3,3 \times 10^4$ cells/ cm² fuer Bioreaktor ($\approx 3,0 \times 10^5$ cells/ml)
 $2,9 \times 10^4$ cells / cm² fuer Rollerflaschen in 4 Tagen oder
 $1,5 \times 10^4$ cells / cm² fuer Rollerflaschen in 7 Tagen

7,6 x 10⁴ cells/ cm² fuer T 175 (1:6 gesplittet)
4,3 x 10⁴ cells/ cm² fuer T175 (5ml) in Rollerflasche (850 cm²)

7. Lagerung

Zellen wachsen in:

- T-Flaschen bei 37°C im CO₂-Brutschrank im N1.06
- Rollerflaschen im 37°C Rollerflaschenschrank im N1.06 oder im 37°C Brutraum auf dem Rollerflaschengestell
- Spinner bei 37°C im Brutraum auf einen Ruehrer

Die eingefrorenen Zellen werden im Fluessigstickstoffbehaelter im N1.12 gelagert. Die Dokumentation erfolgt über Tabellen mit den jeweiligen Farbcode und Kennnummern die in einem Ordner im Raum N 1.06 abgeheftet sind.

9.3.5 Kurzanleitung Zellzählgerät ViCell XR

Version 1.5

Erstellt am: 29.03.2006

Aktualisiert am 08.08.2008

Autor: J. Schulze-Horsel

1. Im Vorfeld zu beachten

- Das Gerät darf nur nach Einweisung durch die dafür zuständige Person bzw. nach Absprache durch eine andere eingewiesene Person benutzt werden.
- Die zu messende Probe darf **auf keinen Fall Microcarrier** enthalten, da sonst das Gerät verstopft wird!
- Validierter Messbereich (für Zelltyp „MDCK 100“: $9.6 \cdot 10^4$ bis $1,0 \cdot 10^7$ Zellen/mL (Gesamtzellzahl))

2. Material

Originalprodukte von Beckman Coulter:

Nr. 383260	Single Pack	250 Messungen, Reagenzien plus Probengefäße (ca. 240 Euro)
Nr. 383194	Quad Pack	1000 Messungen (4x Single Pack = ca. 845 Euro)
Nr.		Probengefäße (ViCell Cups)

Die Probengefäße können gespült und mehrmals verwendet werden.

Die Komponenten des Reagenzienpacks sind entweder bereits vorhanden oder können selbst hergestellt werden:

Trypanblaulösung:	0,4 % w/v Trypanblau und 0,15 mol/L Natriumchlorid in vollentsalztem Wasser (VE-Wasser), mit Papierfilter vorfiltriert, anschliessend 0,45 µm filtriert
Desinfektionsmittel:	Isopropanol (2-Propanol), 90 %
Reinigungsmittel:	Beckman Coulter Clenz (Nr. 8448222, 5 Liter)
Pufferlösung	dH ₂ O, z.B. MilliQ-Wasser

Das benötigte Reagenzienvolumen pro 250 Messungen ist:

- Trypanblaulösung	ca. 110 mL
allen anderen Reagenzien	ca. 220 mL benötigt

Auffüllen der Reagenzien:

Wenn das aktuelle Reagenzienpack leer ist, im Menü „Instrument“, „Replace reagent pack“ auswählen und den schrittweisen Anweisungen folgen.

Anstelle eines neuen Reagenzienpacks werden die Flaschen des vorhandenen Packs mit dem entsprechend benötigten Volumen (110 bzw. 220 mL) aufgefüllt.

Die Abfallflasche wird in eine Schottflasche umgegossen, autoklaviert und anschließend in den Trypanblau-Abfall entsorgt.

3. Einschalten und Ausschalten der Geräte

Einschalten:

- ViCell einschalten (Schalter auf der Rückseite)
- Computer einschalten
- Software „ViCELL XR 2.03“ starten

Ausschalten:

- Software schließen
- Rechner herunterfahren
- ViCell ausschalten

4. Zellzählung

Anforderungen an die Zellsuspension:

- Probenvolumen: minimal 0,5 mL, maximal 1,5 mL im Probengefäß
- Konzentrationsbereich (Herstellangaben): $1,0 \cdot 10^4$ bis $1,0 \cdot 10^7$ Zellen/mL
- Proben mit einer Konzentration $> 1,0 \cdot 10^7$ Zellen/mL müssen vorverdünnt werden
- Proben, die Carrier enthalten können, müssen filtriert werden ($< 100 \mu\text{m}$), z.B. mit:
 - Partec Celltrics $100 \mu\text{m}$, Nr. 04-0042-2318)
 - Becton Dickinson Bioscience Discovery Labware, Cell strainer, $70 \mu\text{m}$, Nr. 352235

Messung:

1. Probe in Original-Probengefäß pipettieren und in das Probenkarussell stellen
2. „Log in sample“ auswählen, dann im Untermenü eingeben:
 - Probenposition im Karussell angeben
 - falls nötig: Probenbezeichnung eingeben
 - Zelltyp auswählen (Standard: MDCK 50)
 - „Dilution factor“ überprüfen: für unverdünnte Proben: 1.0
 - für sehr wichtige Proben: „Save images“ auswählen (Speicher: 1 MB/Bild)
 - Speichern der Ergebnisse als eigene Excel-Datei oder als Zeile in „Multi-run file“:
„bpt_datensammlung.xls“ als Standarddatei auswählen
 - zum Messen: „OK“ oder nächste Probe eingeben („Next sample“)
3. Start der Messung: „Start queue“, Dauer einer Messung: 3 Minuten
4. Gerät reinigt sich selbständig, Probengefäß wird ausgeworfen
5. das Karussell wird nach weiteren Proben durchsucht, die dann mit fortlaufender Nummerierung gemessen werden (sofern nicht anders eingelogt)
6. Speicherort für gezählte Proben (in Excel-Dateien): lokal und im Netzwerk
c:\daten\ViCell\Excell\
h:\bio\daten\vicellxr\Excell\
Wenn auf der lokalen Festplatte (c:\) kein Speicherplatz mehr vorhanden ist, müssen die lokalen Dateien in den gleichen Ordner auf dem Laufwerk (h:\) kopiert werden. Nach der Sicherung können die lokalen Dateien gelöscht werden. Die Ordner dürfen nicht gelöscht oder umbenannt werden.
Bei Problemen mit dem Speichern auf Spiegellaufwerk Software neu starten.

6. Aufzeichnung von Bioprozessen

Um Zellzählungen verschiedener Proben einer Zeitreihe zusammen zu speichern und auszuwerten, ist es sinnvoll diese als „Bioprocess“ zu sammeln und in einer Datei abzulegen.

- „File“ => „New Bioprocess“
- Bezeichnung für den Prozess vergeben, z.B. Fermentation100
- Zelltyp auswählen
- Speicherdatei auswählen, Daten werden im Unterordner \data\ abgelegt
- in der linken Menüleiste wird ein Icon hinzugefügt (Symbol: Erlenmeyerkolben)
- Messen der Proben des Prozesses: Icon anwählen und Probe eingeben („Log in sample“)

7. Messen von infizierten Zellproben

Mit dem ViCell können auch Zellzählungen von infizierten Kulturen gemacht werden. Dabei sind folgende Besonderheiten zu beachten:

- Vor dem Messen: die Schale mit gebrauchten Probengefäßen (innen) sowie die Abfallflasche entleeren
- Probengefäße unter der Virusbank befüllen
- Nach dem Messen: Schale in den Probengefäß-Virusabfall entleeren und desinfizieren, Inhalt der Abfallflasche in flüssigen Virusabfall geben

8. Entfernung von Microcarriern aus der Flusskammer

Die Flusskammer hat eine Höhe von ca. 100 µm. Daher können sich Microcarrier, die sich in den Proben befinden, in der Kammer festsetzen. Das kann zu veränderten Messwerten führen.

Um Microcarrier aus der Kammer zu entfernen folgende Prozedur durchführen:

- Probengefäß mit 2,5 mL verdünnter Natriumhypochlorid-Lösung (10 %ig, Sigma) füllen und in die erste Position des Probentellers stellen (1:10 verdünnen: 0,250 mL Natriumhypochlorid-Lösung + 2,25 mL Wasser)
- Befehl „Decontaminate“ im Menü „Instrument“ ausführen, dabei Anweisungen befolgen
- Die Reinigung dauert ca. 13 Minuten.
- Anschliessend kontrollieren, ob die Flusskammer frei ist („Instrument“ -> „Live-Image“)
- Die Option „Live-Image“ wieder deaktivieren

9.3.6 V05: HA-Assay

1. Introduction

The HA assay is used to detect influenza virus particles (infectious and non-infectious). Influenza viruses carry the protein hemagglutinin (HA) on their surface which binds to specific glycosylation patterns on proteins which are located on the outer membrane of a cell. Thus, virus particles bind to cells and by using erythrocytes as cell system, influenza virus particles can cross-link erythrocytes with each other. This agglutination of erythrocytes can be observed in wells of a round bottom well plate as agglutinated erythrocytes sediment like a carpet at the bottom of the well instead of a point-like sedimentation.

By titrating the virus containing sample, one can determine a critical concentration of the sample at which this switch in sedimentation behaviour occurs. The negative logarithm of this dilution has been defined as the logarithmic HA titer (or simply log-titer) and is a measure for the concentration of influenza virus particles in the sample. The inverse of the dilution has been termed HA activity with units HAU/100 μ L and is also supposed to be proportional to the number of virions in the sample.

There are two ways in which one can analyze the HA assay (procedure of pipetting is the same for both methods):

- i) a classical analysis in which the experimenter visually evaluates the HA titer
- ii) a photometric analysis which uses an automated procedure in order to minimize subjectivity and which includes an additional dilution step that increases sensitivity and reduces the error of the method

2. Materials

- Protective clothing: lab coat, protective gloves (Nitrile)
- Centrifuge (e.g. Primo R, Hera, N1.06)
- Sterile kryotubes
- Influenza virus samples (active or chemically inactivated)
- Internal HA standard (= control which is a chemically inactivated influenza virus sample with defined HA titer, stored at -80°C in N1.11, produced as described in SOP HA assay from Bernd Kalbfuß, Version 2.1 (04.12.2006))
- Erythrocyte suspension (conc. approximately 2.0×10^7 erythrocytes/mL, stored at 4°C in N1.06, produced as described in SOP V/07 from Claudia Best (07.06.2007))
- Unsterile phosphate buffered saline, PBS (stored in N1.06, produced as described in SOP M/01 from Claudia Best (26.09.2007))
- Unsterile transparent 96well round bottom microtiter plates (stored in N1.06, e.g. Greiner Bio-One, Cat.No. 650101) + transparent disposable lids (stored in N1.06, e.g. Greiner Bio-One, Cat.No. 656101)
- 100 μ L micropipette + disposable tips
- 8x100 μ L or 8x300 μ L multichannel micropipette + disposable tips
- Electronic 8x1200 μ L multichannel pipette + 1250 μ L disposable tips
- 2 reservoirs for multichannel micropipette (PBS, erythrocyte suspension)
- Plate photometer (e.g. Tecan spectra, Tecan Instruments, N1.07)

3. Sample preparation

Infected cell culture with cells and without microcarrier should be filled directly into sterile kryotubes or other sterile tubes and centrifuged at 300xg for 5 min at 4°C . If cells cannot be settled at this g force, choose an appropriate centrifugation setting. After the centrifugation step transfer the supernatant into a new sterile kryotube and freeze at -80°C .

4. Assay procedure

It is absolutely necessary to pipet exactly in this assay!!

Active samples have to be handled under S2 work bench! For handling outside the safety hood (e.g. when scanning the microtiter plate with the spectrometer), keep disinfectant or citric acid ready in case of accidental spillage!

4.1 Classical method

The titration of influenza virus by the classical method is based on the method described by Mahy and Kangro [1].

1. Pre-dilute samples which are known to be highly concentrated in PBS (all samples which have a HA activity above 3.0 log HA units/100 μ L should be diluted). Typically, a 1:10 pre-dilution is sufficient. Samples from cell culture normally do not require this pre-dilution. However, this has to be decided from the assay performer.
2. Fill the wells of column 2-12 with 100 μ L PBS each. Wells B, D, F and H of column 1 and 2 are filled with 29.3 μ L PBS.
3. Perform the following steps with a 100 μ L pipette under S2 work bench! Don't spray disinfectant onto reservoirs and microtiter plates.
The wells 1 and 2 of row A are filled with 100 μ L of internal HA standard. Beneath these, a pre-dilution of internal HA standard is prepared by adding 70.7 μ L of HA standard to wells 1 and 2 of row B. These 4 wells are prepared accordingly for the samples in rows 3 to 8. This means that on each plate 3 samples can be prepared. If there are more samples, an additional plate is necessary. Standard is necessary on every second plate.

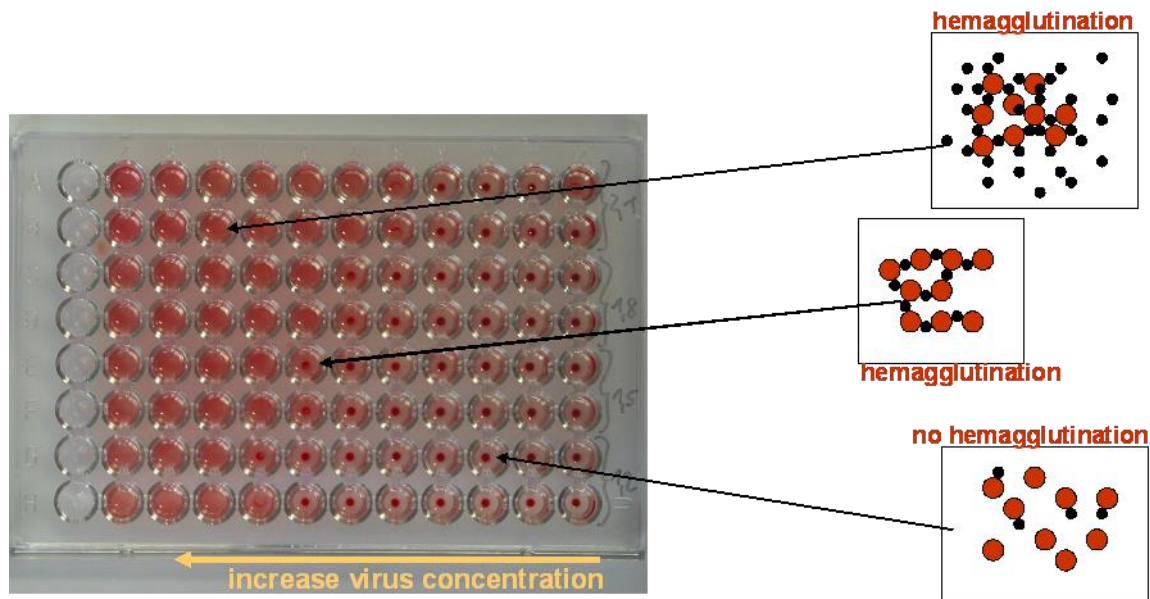
Pipetting scheme for pipetting internal HA standard and samples onto microtiter plate

	1	2	3
A	100 μ L HA standard	100 μ L HA standard	...
B	70.7 μ L HA standard 29.3 μ L PBS	70.7 μ L HA standard 29.3 μ L PBS	...
C	100 μ L sample 1	100 μ L sample 1	...
D	70.7 μ L sample 1 29.3 μ L PBS	70.7 μ L sample 1 29.3 μ L PBS	...
E

4. Mix column 2 three times with a multichannel pipette and transfer 100 μ L of column 2 to column 3. Empty the pipette tips completely once before the transfer. Mix again three times and continue the serial dilution until the end of the plate (column 12). The remaining 100 μ L should be disposed. Each well has to be filled with 100 μ L after finishing these steps. Add 100 μ L of erythrocyte suspension into each well by using an electronic multichannel pipette. Mix the suspension well before you start! Start pipetting at the column with the highest dilution (column 12). *For each plate new tips have to be used!*
5. Each well which has been pipetted faulty should be marked as the values from these wells need to be eliminated during assay evaluation!
6. Incubate the plates for at least 3 hours under the work bench. If the assay is not analyzable, incubation must be prolonged (over night if necessary).
7. Evaluate the results visually. Therefore, mark every well which shows a perfect erythrocyte dot with a (●) and each imperfect dot with a (○). Record your findings by taking the document "AB-

HA_Testauswertung_3.pdf". The last dilution with an imperfect dot is the end point of the titration and is expressed as log HA units per test volume (100 μ L). The inverse of this dilution gives the HA activity [HAU/100 μ L].

8. Compare the measured titer of the internal standard with its nominal titer. The difference (*nominal-measured*) has to be added to the titer of each sample. If two or more standards were analyzed (e.g. because 3 plates were assayed) use the mean difference. If the measured titer of internal standard is more than 0.3 log HAU/100 μ L different from its nominal titer, re-do the whole assay!
9. After evaluation of the titer microtiter plates scan them (see section 4.1) or dispose them into S2 waste!!



Scheme for determination of HA titers in micro titer plate (example shows HA titers from 1.2-2.1 log HA units/100 μ L in double determination)

Overview on dilutions and resulting HA titers (log HA units/100 μ L)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Dilution	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048
HA titer (100 μ L sample)	0	0.3	0.6	0.9	1.2	1.5	1.8	2.1	2.4	2.7	3.0	3.3
HA titer (70.7 μ L sample)	0.15	0.45	0.75	1.05	1.35	1.65	1.95	2.25	2.55	2.85	3.15	3.45

4.1.1 Points to consider

- The detection limit of this assay is 0.15 log HAU/100 μ L. This corresponds to approximately 2.0×10^7 virions/mL; assuming that the number of erythrocytes is proportional to the number of virus particles (each virus particle binds to one erythrocyte).
- The assay has been validated with a standard deviation of ± 0.03 log HAU/100 μ L which is the dilution error.
- The confidence interval for HA activity was determined to be $\pm 15\%$ (with a confidence level of 95 %).
- The validation has been made for the assay procedure which is described here. If you change singular steps in your procedure, be aware that validation is not valid then.

- Before you start with serious analyses, train yourself in pipetting accurately and precisely, e.g. by measuring standard samples several times.
- HA activity may suffer depending on sample treatment and storage conditions. Thus, do not freeze a measured sample and re-thaw it. Probably, HA titer has then been changed.

4.2 Photometric analysis

In order to minimize subjectivity (dependence on the experimenter), the titration result is evaluated photometrically using an automated procedure. However, this evaluation is restricted to samples with titer $>1.0 \log \text{HAU}/100 \mu\text{L}$. Otherwise, sample titers have to be evaluated with the classical method.

4.2.1 Measurement of extinction

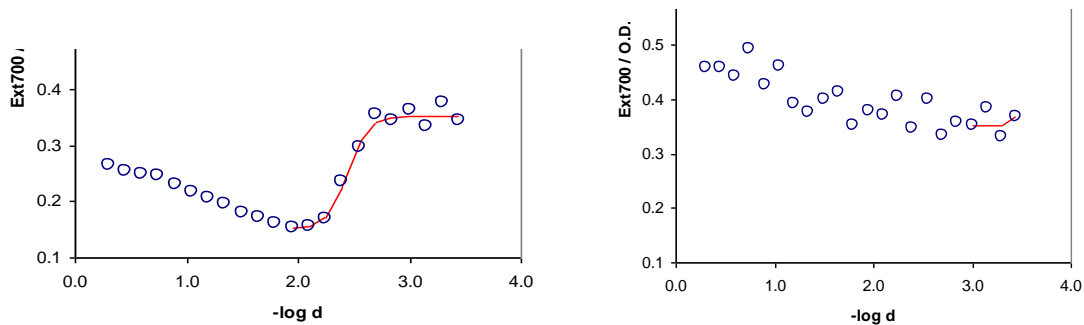
1. Perform all steps which are described for the classical method.
2. Cover microtiter plates containing active virus samples with an appropriate lid.
3. Make sure that Tecan photometer is switched on. Open the software "iControl" and choose "HA protocol" from the list of used protocols. The settings should be defined as follows: Messfilter 700 nm, Referenzfilter none, 10 Blitze, Temperatur 0.0 °C, Schüttelmodus none. (Changes can be made by clicking on button "Messparameter definieren", but should not be done for standard HA protocol.)
4. After having inserted the plate into the reader, click the button "Messung starten". You will be asked for a file name first and to put your plate onto the tray afterwards. The measurement will be carried out immediately afterwards.
It is of utmost importance to remove either the lid before scanning and to remove any condensed water from the bottom of a microtiter plate before scanning!!
5. Save extinction data as Excel-file in the folder "/bpt/data/Tecan/HA_assay/2010/..." using the file name pattern "<Number>-<Date>-<Experimenter>.xls (e.g. 145_10-03-31_CB). If more than one plate will be measured, let the excel file from the first plate open. Then, the results from the following plate will be saved as a new sheet in this file. You have to rename the sheets after your measurement in order to document which sheet belongs to which plate.
6. Repeat step 4 and 5 for each plate of the assay run.

4.2.2 Evaluation of HA titers

A data evaluation template (Excel-file) has been prepared. The evaluation procedure is described in the following. You have to enable macros for the sheet to work properly!

7. Open the data evaluation template ("/bpt//Labor/HA_neu/Data_Evaluation_Template.xls") and save a **copy** in the appropriate folder (/bpt/usp/Labor/HA_neu/data/2010/...).
8. Import your extinction data. Therefore, copy all values and paste them into data-sheet. Delete extinction values of all wells that suffered from erroneous pipetting! As long as affected wells are not within the zone of transition, the assay result may be unaffected.
9. Adjust the sample names and dilutions in the "Report" sheet. Fill all empty header fields and transfer the remarks from the run protocol. Specify the internal standard used and the position of the internal standard (normally, position 1 and 9). If only one standard was measured, specify the same position twice.
10. Click "Evaluate" to start HA titer evaluation.
11. Check difference between nominal titer of the standard and the evaluated titer. Re-do the assay if both values differ more than $0.3 \log \text{HAU}/100 \mu\text{L}$.

12. Check all fitted curves in the "Evaluation" sheet. If fitting of extinction values has not been made by a sigmoidal curve, then re-analyze the sample. Be careful, if this maybe is due to a low titer of the sample. Then take titers evaluated by the classical method.



Evaluation of the transition point by a Boltzmann function. Left: correct fitting, right: erroneous fitting which would lead to high titer evaluation if curve is not checked and rejected

13. Compare the evaluated titers with the results obtained by the classical method. The discrepancy should be less than 0.3 log HAU/100 μ L.
14. Save the document and make at least one hardcopy of the "Report" and "Evaluation" sheets. Documents are collected in a folder located in N1.07 and N0.13.

5. Sample storage

If samples are kept at below -70 °C, they can be stored up to five years without loss of HA activity. Anyway, this holds true for samples which have been prepared as described in this document (see sample preparation). After this period, it cannot be guaranteed that measured HA activities resemble the original values.

[1] Mahy B.W.J., Kangro H.O. "Virology Methods Manual": Academic Press Limited, 1996.

9.3.7 V 08: Bestimmung des TCID₅₀

Datum: 02.06.2008 Autor: Ilona Behrendt
geändert: 23.03.2010 Autor: Verena Lohr

1. Ziel

Bestimmung der Virusverdünnung, bei der 50% der adhärennten Zellen infiziert werden.

2. Material

2.1. Zellanzucht und Virusvermehrung

- 4-8 Tage alte konfluente MDCK-Zellen aus Zellkulturflaschen (T175 oder RF)
- PBS steril (Arbeitsanweisung Nr. M/01)
- Trypsin 10000 BAEE / mL in Milli-Q-Wasser, sterilfiltriert (Trypsin, Sigma, Bestell-Nr. T-7409) Lagerung bei -70 °C für Virusinfektion
- Zellkulturmedium (GMEM + 1% Lab-M-Pepton + 10% FCS) siehe Arbeitsanweisung Nr. M/04
- Virusmedium (GMEM + 1% Lab-M-Pepton) siehe Arbeitsanweisung Nr. M/04
- Gentamycin 10 mg / mL (Invitrogen, Bestell-Nr. 11130-036) Lagerung: Raumtemperatur
- 96-Wellplatten 400 µL Inhalt steril mit flachem Boden mit Deckel (für Zellkultur) (Cellstar, Greiner bio-one, Bestell-Nr. 655180)
(für jede Probe wird eine Wellplatte benötigt)
- Reaktionsgefäße 1,5 mL, sterilisiert für Verdünnungsreihen
- sterile Pipetten, Pipettierhilfe
- 100 µL Pipette
- Elektronische Einkanalpipette 1 mL (Eppendorf)
- Elektronische Mehrkanalpipette 1250 µL (Eppendorf)
- Pipettenspitzen 100 µL (Plastibrand, steril)
- Pipettenspitzen 1250µL (Eppendorf, steril)
- Multipette mit Combitips 10 ml (Eppendorf, Combitips plus biopure)
- 1 sterile Schottflaschen (250 oder 500 mL)
- 4 Pipettierbehälter, sterilisiert
- 2 kleine Laborschalen, sterilisiert
- Warnhinweisaufkleber: Biogefährdend

2.2. Fixierung und Färbung

- 80%ige Acetonlsg. in Wasser (Aceton, p.A.)
- Primärantikörper entsprechend dem zu testenden Virus
z.B. - (Equine Influenza A Ziegenserum , final bleed, goat 613, vom 2.08.01, nano Tools)(1:100 mit PBS verdünnt)
 - Influenza Anti A/Wisconsin/67/2005 H₃N₂ (HA Serum sheep) von NIBSC
 - Influenza Anti B/Malaysia/2506/2004 (HA Serum sheep) von NIBSC
 - Influenza Anti A/PR/8/34 H₁N₁ (HA Serum sheep) von NIBSC
- PBS steril (Arbeitsanweisung Nr. M/01)
- konfluent bewachsene Zellkulturflaschen (T75 oder RF)
- Sekundärantikörper ((Invitrogen, Bestellnr.: A-11015)
- 100 µL 8-Kanal-Pipette mit Pipettenspitzen
- Laborschale
- 3 Pipettierbehälter
- Entsorgungsbehälter Aceton

3. Methode

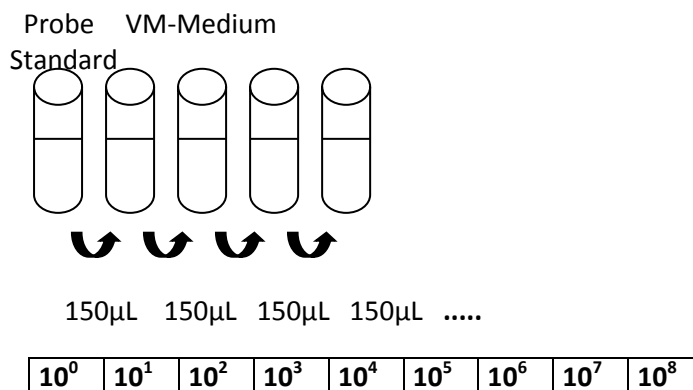
3.1 Zellanzucht und Virusvermehrung

A) Zellanzucht

- konfluente MDCK-Zellen aus Zellkulturflaschen 3-mal mit PBS waschen und mit der vorgeschriebenen Menge Trypsin (1 mg/mL) 20 min bei 37 °C abtrypsinieren, mit Z-Medium abstoppen (siehe Arbeitsanweisung Nr. Z/04)
- Zellkulturmedium mit Gentamycin vermischen (100 mL Zellkulturmedium mit 1 mL Gentamycin)
- abtrypsinierte Zellen mit angesetztem Zellkulturmedium auf eine Zellzahl von $4 - 5 \cdot 10^5$ Zellen / mL verdünnen (siehe Arbeitsanweisung Zellzahlbestimmung)
- 10 mL der Zellsuspension werden ca. für eine Zellkulturplatte benötigt
- je 100 μ L der Zellsuspension werden mit der Elektronischen 8-Kanalpipette in jedes Well der Zellkulturplatte pipettiert
- die Zellen 1 - 2 Tage bei 37 °C mit 5 % CO₂ inkubieren (mikroskopische Beurteilung der Konfluenz der Zellen → müssen dicht bewachsen sein – wenn dies nicht der Fall sein sollte, ist der Versuch hier abzubrechen)

B) Herstellen der Virusverdünnung

- Virusmedium mit Trypsin und Gentamycin versetzen, 100 mL Medium + 20 μ L Trypsin + 1,0 mL Gentamycin (100 mL VM reichen für ca. 10 Verdünnungsreihen) → VM
- Je 900 μ L des Virusmediums in 8 – 10 Eppendorfcups (je nach benötigter Verdünnungsstufen) pipettieren. Virusverdünnung nach dem folgenden Schema in Eppendorfcups herstellen: mit einer Eppendorfpipette 100 μ L aus der zu bestimmenden Probe oder dem Standard entnehmen und in das erste Eppendorfcup geben, 5 mal durch auf- und abpipettieren mischen, mit einer neuen Pipettenspitze 100 μ L in das nächste Eppendorfcup geben, fortfahren bis zum Ende.



C) Virusvermehrung

- die Zellkulturplatten 2 mal mit je 100 μ L PBS je Well mit der Elektronischen 8-Kanal-pipette waschen (entleeren: in Laborschale ausschütten)
- mit einer Eppendorfpipette je 100 μ L der Virusverdünnung auf je 8 Wells der Zellkulturplatte geben (mit der höchsten Verdünnungsstufe beginnen)
- in die Reihen 1, 2, 11 und 12 werden nur je 100 μ L Virusmedium (mit Trypsin + Gentamycin) je Well gegeben (diese Wells dienen als Nullkontrolle, Randeffekte können dann ausgeschlossen werden)

- einzusetzende Verdünnungsstufen:
bei einem HA über 2,7: $10^3 - 10^{10}$
bei einem HA von 2,1 bis 2,7 (Standard, Saatvirus für Fermentationen) : $10^1 - 10^8$
bei einem HA unter 2,1: $10^0 - 10^7$

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Virus-Medium	Virus-Medium	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	Virus-Medium	Virus-Medium
B	Virus-Medium	Virus-Medium	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	Virus-Medium	Virus-Medium
C	Virus-Medium	Virus-Medium	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	Virus-Medium	Virus-Medium
D	Virus-Medium	Virus-Medium	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	Virus-Medium	Virus-Medium
E	Virus-Medium	Virus-Medium	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	Virus-Medium	Virus-Medium
F	Virus-Medium	Virus-Medium	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	Virus-Medium	Virus-Medium
G	Virus-Medium	Virus-Medium	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	Virus-Medium	Virus-Medium
H	Virus-Medium	Virus-Medium	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	Virus-Medium	Virus-Medium

- die Platten mit Virus mit einem Warnhinweis versehen und 1 Tag bei 37 °C mit 5 % CO₂ inkubieren

D) Trypsinzugabe

- Virusmedium mit Trypsin und Gentamycin versetzen (100 mL Medium + 40 µL Trypsin + 1 mL Gentamycin)
- Je 100 µL dieses Mediums in jedes Well pipettieren – Elektronische 8-Kanalpipette, darauf achten dass kein Virus verschleppt wird (von rechts nach links – von der höchsten Verdünnungsstufe zur niedrigsten pipettieren, Reihe für Reihe) nach jeder Platte die Pipettenspitzen verwerfen
- die Virusplatten nochmals 1 Tag bei 37 °C mit 5 % CO₂ inkubieren

3.2 Fixierung und Färbung

A) Vorbereitung des Primärantikörpers (nur bei dem Equine Influenza A Ziegenserum notwendig, wenn kein gereinigter Antikörper mehr vorhanden ist)

- der Primärantikörper für Equine Influenza A Ziegenserum ist ein polyklonaler Antikörper gegen den Pferdeinfluenza-Virus, aber auch gegen Zellbestandteile, deshalb müssen die Antikörper gegen die Zellen vorher absorbiert werden, sonst überdecken sie die Fluoreszenz der mit Viren infizierten Zellen
- 1 – 2 Tage alte konfluent bewachsene Zellkulturflasche dreimal mit PBS waschen
- auf eine T25 – Flasche 1 mL , auf eine T75 – Flasche 3 mL des verdünnten Primärantikörpers geben und 30 min bei 37 °C inkubieren (1 mL 1:100 verdünntes Serum reicht für eine Zellkulturplatte – dementsprechende Menge inkubieren)
- der gereinigte Primärantikörper kann bei –20 °C eingefroren werden

B) Fixierung

- Medium in Laborschale mit vorgelegter 2%iger Essigsäure in der Sterilbank abgießen und virusgerecht entsorgen
- auf jedes Well 100 µL eiskalte 80 %ige Acetonlösung pipettieren (Acetonlsg.in Eisbehälter stellen – nicht in den Kühlschrank → Kühlschränke sind nicht Ex geschützt)
- die Zellkulturplatten 30 min zum fixieren auf Eis oder in den Kühlraum stellen → Virus inaktiviert (die weiteren Schritte können außerhalb der Sterilbank durchgeführt werden)
- Zellkulturplatten 2 mal mit PBS spülen – (Aceton-PBS-Gemisch in Abfallbehälter sammeln-zur Entsorgung –Herrn Schäfer geben)

C) Färbung

- gereinigten Primärantikörper für Equine Influenza A Ziegenserum 1 : 100 mit PBS verdünnen, alle anderen Primärantikörper werden 1 : 200 verdünnt
- je 50 µL davon auf jedes Well mit Elektronischer 8-Kanalpipetten geben und 60 min bei 37 °C inkubieren
- nach dieser Zeit 2-mal mit PBS waschen
- den Sekundärantikörper 1 :500 mit PBS verdünnen
- wieder je 50 µL davon auf jedes Well pipettieren und 60 min bei 37 °C inkubieren
- 2 mal mit PBS waschen, nach dem letzten Waschschrift 100 µL PBS auf jedes Well geben

4. Auswertung und Berechnung

- die Auswertung erfolgt an einem Fluoreszenzmikroskop
- jedes Well in dem Virus gefunden wird (fluoreszierende Zellen) wird als positiv gewertet (1), jedes Well ohne fluoreszierende Zellen als negativ (0) und in das Arbeitsblatt eingetragen
- die Berechnung erfolgt nach der Gleichung von Spearman und Kärber :

$$(\log \text{Virus } 100\%) + (0,5) - \frac{\text{kumulativ } 100 \%}{\text{Anzahl Tests (pro Verdünnung)}} = \log \text{Virus} / 100 \mu\text{L}$$

Beispiel:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
B	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
C	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
D	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
E	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
F	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
G	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
H	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0

0	0	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	0	0
---	---	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	---	---

0: kein Virus, negatives well; 1: Virus, positives well

Verdünnungsstufe	Anzahl positive wells / Gesamtzahl wells	Anzahl positiver wells kumulativ
10 ⁻⁵	8 / 8	19
10 ⁻⁶	7 / 8	11
10 ⁻⁷	4 / 8	4
10 ⁻⁸	0 / 8	0

Beispielrechnung:

$$(-5) + 0,5 - 19/8 = -6,875 = y ; 10^{6,875+1} \text{ Viren / mL} = 7,58 \times 10^7 \text{ Viren/mL}$$

5. Festlegung des Referenzwertes

Für jeden neu hergestellten Standard wird von mindestens 2 Personen je zweimal eine Sechsfachbestimmung durchgeführt. Daraus wird der Mittelwert für den jeweiligen Standard berechnet, der als Referenzwert verwendet wird.

9.3.8 Chemische Inaktivierung von Influenza-Viren mit β -Propiolacton

Chemische Inaktivierung

Arbeitsanweisung

Autoren: Bernd Kalbfuß, Yvonne Genzel

Version: 1.0 (17.02.05)

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

Die chemische Inaktivierung von Viren mit Formaldehyd hat eine lange Geschichte und wurde bereits im Jahre 1923 berichtet (Glenny *et al.*, 1923). Aufgrund mehrerer Zwischenfälle und einer nachgewiesenen Unsicherheit der Formaldehyd-Inaktivierung wurde das Agenz in der Impfstoffherstellung mittlerweile weitläufig durch Aziridin-Derivate oder das Lacton der β -Propionsäure ersetzt (Brown *et al.*, 2001; Budowsky *et al.*, 1991). Neben einer effizienteren Inaktivierung besitzen beide Agenzien den Vorteil, dass der Mechanismus der Inaktivierung wahrscheinlich ausschließlich auf der Modifizierung des Erbguts beruht. Die Abwesenheit von Modifikationen der Oberflächenantigene, wie sie für Formaldehyd berichtet wurden, lassen prinzipiell eine verbesserte immunstimulierende Wirkung des Impfstoffs erwarten.

In dieser Arbeitsanweisung wird die Verwendung von „binärem“ Ethylenimin (BEI) und β -Propiolacton (β -PL) zur Inaktivierung von Influenza haltigen Zellkulturbrühen beschrieben. Für jedes der Agenzien existiert zusätzlich ein Laufprotokoll, mit dem die durchgeführten Inaktivierungen zu dokumentieren sind. Beide Agenzien sind als **extrem giftig** eingestuft und können zu **tödlichen Spätfolgen** führen. Es ist daher unbedingt erforderlich, sich vor dem Einsatz mit den Sicherheitsvorschriften vertraut zu machen. Ferner ist eine **persönliche Belehrung** durch Dr. Yvonne Genzel erforderlich. Die erfolgte Belehrung ist vom Belehreten schriftlich zu quittieren.

1.2 Zyklisierung von Bromoethylamin

Aufgrund ihrer Reaktivität sind Aziridine sehr instabil und schlecht zu lagern. Um dieses Problem zu umgehen, kann Ethylenimin direkt aus dem in Pulverform stabilen 2-Bromoethylamin (BEA) synthetisiert werden (Bahnmann, 1990). Die Zyklisierungsreaktion ist Laugen katalysiert. Um das auf diese Weise gewonnene Ethylenimin von reinem Ethylenmin abzugrenzen, wurde der Kunstbegriff „binary ethylenimine (BEI)“ geprägt.

Die Ringbildung erfolgt nach spontaner Dissoziation von Bromid über einen Übergangszustand mit Carbeniumion. Bei der Reaktion entsteht formal Bromwasserstoff (siehe Illustration 1). Der Reaktionsweg ist reversibel (nicht dargestellt) und das Gleichgewicht kann über den pH-Wert eingestellt werden. Ein alkalischer pH-Wert begünstigt die Ringbildung, da bei der Hinreaktion Protonen freigesetzt werden.

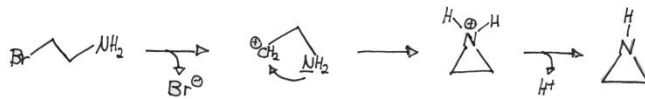


Illustration 1. Zyklisierung von 2-Bromoethylamin zu Ethylenimin.

1.3 Nukleophile Ringöffnung

Aufgrund ihrer Ringspannung sind Ethylenimin und β -Propiolacton extrem reaktiv. Die Art der Reaktion wird als nukleophile Ringöffnung bezeichnet (Vollhardt und Shore, 1999). Die in Illustration 2 gezeigten Reaktionsmechanismen wurden in Analogie zur im Detail beschriebenen nukleophilen Ringöffnung von Oxacyclopropan hergeleitet.

Obwohl der Mechanismus der Reaktionen von Ethylenimin und β -Propiolacton identisch ist, muss dies nicht für die Selektivität der Reaktionen gelten. Gemäß einer Übersicht von Brown (2002) gibt es viele Hinweise, dass Ethylenimin und seine Derivate fast ausschließlich mit Nukleinsäuren reagieren. Lediglich in einer Studie wurde von einer dosis abhängigen Modifikation viraler Proteine berichtet. Käsermann *et al.* (2001) konnten jedoch zeigen, dass trimeres Ethylenimin abhängig vom pH-Wert mit Testproteinen reagierte. Die modifizierten Proteine zeigten Verschiebungen im pI und in ihrer Masse.

Die Reaktion von β -Propiolacton mit Guanosine, Deoxyguanosin und RNA wurde von Roberts JJ und Warwick GP (1963) berichtet. In einer Studie von Budowsky *et al.* (1993) werden mehrere Studien zitiert, die eine Reaktion von β -Propiolacton mit Aminosäuren belegen.

Die Thematik der Selektivität wurde von den Verfassern noch nicht ausführlich recherchiert. Prinzipiell lässt sich jedoch aussagen, dass die Selektivität stark vom Reaktionsumfeld abhängen wird, also neben Parametern wie der Temperatur, dem pH-Wert und der Konzentration des Agens vor allem von der Zusammensetzung der zu inaktivierenden Brühe.

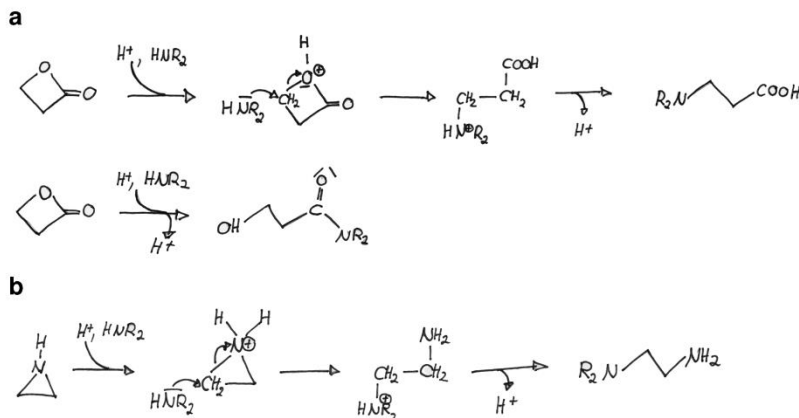


Illustration 2. Reaktion von β -Propiolacton mit einem sekundären Amin. Es entstehen zwei mögliche Produkte (a). Reaktion von Ethylenimin mit einem sekundären Amin (b).

1.4 Spontaner Zerfall und Polymerisation

Beide Agenzien zerfallen in wässriger Lösung spontan (Illustration 3). Die Zerfallsreaktionen sind Säure katalysiert. Ausgehend von den Zerfallsprodukten oder funktionell ähnlichen Molekülen kann eine Polymerisation einsetzen. Das Polymer des β -Propiolactons ist ein linearer Ester. Im Fall des Ethylenimins kommt es bei der Polymerisation zusätzlich zu einer starken Verzweigung an der Aminofunktion (nicht dargestellt).

Der Säure katalysierte Zerfall ist die rationale Grundlage für die Zugabe von Zitronensäure vor der Entsorgung. Bei ausreichender Reaktionszeit passivieren sich beide Agenzien von selbst. Zu den exakten Kinetiken der Zerfallsreaktionen konnten die Verfasser bisher noch keine Literatur finden.

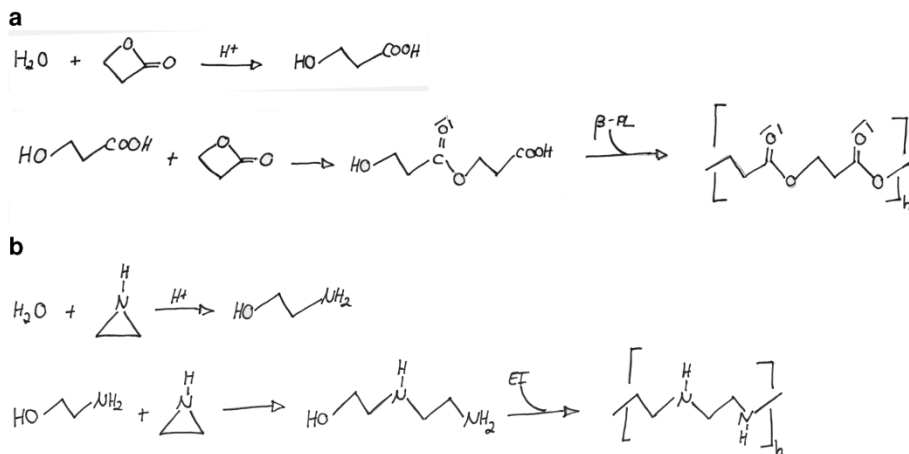


Illustration 3. Hydrolyse von β -Propiolacton zu 3-Hydroxypropionsäure und Polymerisation zu Poly-3-Hydroxypropionsäureester. (a). Hydrolyse von Ethylenimin zu 3-Hydroxyaminoethan und Polymerisation zu Polyethylethanimin. Es ist nur die lineare Form des Polymers dargestellt (b).

1.5 Inaktivierungskinetik

Die Kinetik der Inaktivierung von Influenzavirus mit β -Propiolacton wurde im Detail von Budowsky et al. (1991a) untersucht. Die Influenza-Stämme A/Leningrad/385 (H3N2) und B/Leningrad/489/80 wurden hierzu in Eierkulturen vermehrt. Es wurden Kinetiken der Inaktivierung direkt in der Allantoinflüssigkeit und für aufgereinigten Virus aufgenommen. Die publizierten Reaktionskonstanten wurden genutzt um eine pessimistische Abschätzung der Virusabreicherung und Endkonzentration von β -Propiolacton als Funktion der Einsatzkonzentration und Inkubationszeit durchzuführen (Illustration 4).

Bei einer Einsatzkonzentration vom 3 mM β -Propiolacton und einer Inkubationszeit von 24 h kann entsprechend der Abschätzung eine Abreicherung um 15 Größenordnungen erwartet werden. Die Endkonzentration des Agenz sollte am Ende nur noch bei etwa 10 μ M liegen.

Für die Inaktivierung mit BEI liegen den Verfassern keine kinetischen Daten vor. Die empfohlene Einsatzkonzentration vom 1.5 mM ist ein reiner Erfahrungswert.

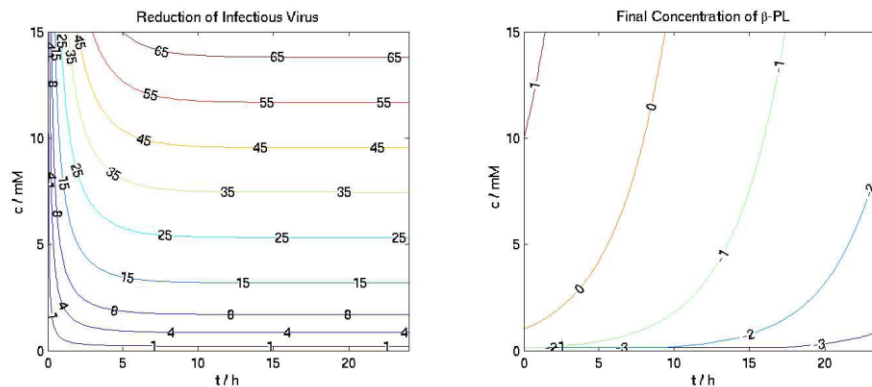


Illustration 4. Log-Abreicherung des aktiven Virus (a) und logarithmierte Endkonzentration von β -Propiolacton in mmol l^{-1} (b) in Abhängigkeit der Einsatzkonzentration und Inkubationszeit.

2 Sicherheitsmaßnahmen

Sowohl bei Ethylenimin als auch β -Propiolacton handelt es sich um extrem gefährliche Chemikalien. Beide Substanzen wurden als sehr giftig (T+) und mutagen eingestuft und sind nachweislich Krebs erregend (s. Sicherheitsdatenblätter der Firmen Sigma-Aldrich GmbH und Serva Electrophoresis, Roempp Online-Lexikon). Im Fall von Ethylenimin kann es bei direktem Kontakt zusätzlich zu schweren Verätzungen der Haut und Augen kommen. Die wichtigsten Eigenschaften der Substanzen sind in Table 1 zusammengestellt.

Alle Lösungen, die eine dieser Substanzen enthalten, sind ausschließlich unter dem Abzug anzusetzen. Bei der Handhabung ist neben der regulären Schutzausrüstung (**Laborkittel und Handschuhe aus Butylkautschuk**) eine **Vollsichtbrille** und bei der Einwaage von BEA ein **Mundschutz (P2)** zu tragen.

Die Ansatzgefäße sind gegen Umfallen zu sichern. Sie können entweder direkt mit einem Stativ fixiert werden oder indirekt durch Fixierung eines passenden Gefäßständers (z.B. 50 ml Falcons). Es empfiehlt zusätzlich eine Plastikwanne unterzulegen.




Beide Substanzen sind flüchtig und dampfen aus wässrigen Lösungen aus. Die Gefahr einer Vergiftung durch die Atemwege steigt mit der Konzentration. Der Abluftvolumenstrom des Abzugs ist deshalb auf maximal zu stellen. Betroffene Gefäße sollten nur wenn notwendig geöffnet werden. Um den Dampfdruck gering zu halten, wird eine Lagerung auf Eis empfohlen.

Während der Handhabung von reinem β -Propiolacton ist das Labor zu räumen. Die Türen müssen entweder abgeschlossen oder durch weitere Personen überwacht werden. Der Vorgang ist von mindestens einer weiteren Person durch die Türfenster zu beobachten, um im Gefahrfall eingreifen zu können. Diese Person hat eine Atemschutzmaske mit Aktivkohlefilter vom Typ A2B2E2K2 bei sich zu führen (Verfallsdatum des Filters beachten!).

Im Fall einer unbeabsichtigten Freisetzung sind die Arbeitskollegen unverzüglich zu informieren und das Labor ist zu räumen. Kam es zu einem direkten Kontakt, sind die betroffenen Hautstellen gründlich mit 2% Zitronen-/Essigsäure (außer Gesicht und Augen), danach mit Wasser zu spülen und die betroffene Person ist verpflichtet, einen Arzt aufzusuchen. Bevor das Labor wieder betreten werden kann, muss die Flüssigkeit mit einem bindendem Material

(Chemizorb) aufgenommen und entsorgt werden. Der Vorgang ist von mindestens einer weiteren Person durch die Türfenster zu beobachten. Diese Person hat eine Atemschutzmaske mit Aktivkohlefilter vom Typ A2B2E2K2 bei sich zu führen (siehe oben).

Table 1. Zusammenstellung der wichtigsten Eigenschaften von 2-Bromoethylamin, Ethylenimin und β -Propiolacton.

Name	2-Bromoethylamin (BEA)	Ethylenimin (EI)	β -Propiolacton (β -PL)
Struktur			
Synonyme		Aziridin, Azacyclopropan	3-Hydroxypropionsäurelacton, Propano-3-lacton, 3-Propanolid, 2-Oxetanon
CAS-Nr.	2576-47-8	151-56-4	57-57-8
Gefahrenbezeichnung	gesundheitsschädlich (X)	entzündbar (F), sehr giftig (T+)	sehr giftig (T+)
R-Sätze	Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut (20/21/22). Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut (36/37/38). Irreversibler Schaden möglich (R40)	n.b.	Kann Krebs erzeugen. (45) Auch sehr giftig beim einatmen. (26) Reizt die Augen und die Haut. (36/38)
S-Sätze	Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen (36/37/39). Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen). (45)	n.b.	Exposition vermeiden – vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. (53) Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen). (45)
WGK	n.b.	stark wassergefährdend (3)	stark wassergefährdend (3)
Mutagen	möglicherweise	erwiesen (M2)	erwiesen
Cancerogen	n.b.	erwiesen (C2)	erwiesen (C2)
Toxizität	LD ₅₀ 105 mg/kg	LD ₅₀ (Ratte oral) 15 mg/kg	n.b.

3 Dokumentation

Es wurden vorgeschriebene Laufprotokolle für die Inaktivierung mit Ethylenimin und β -Propiolacton erstellt. Die Vorlagen sind in Unterverzeichnissen des Verzeichnisses "flu_dir/dsp/operations" abgelegt. Eine Übersicht über die relevanten Dokumente gibt Table 2. Jede Inaktivierung ist in Form dieser Protokolle zu dokumentieren. Abweichungen von der empfohlenen Prozedur sind im Bemerkungsfeld einzutragen. Eventuelle Fehler in den Dokumenten sind den entsprechenden Verfassern mitzuteilen. Ausgefüllte Protokolle werden im Ordner „Inaktivierung“ in Raum N 1.07 gesammelt.

Table 2. Übersicht über die für die chemische Inaktivierung relevanten Dokumente.

Typ	Verzeichnis	Name
Arbeitsanweisung	sops	Chemische Inaktivierung - Arbeitsanweisung
Laufprotokoll für BEI	templates	Inaktivierung mit BEI - Laufprotokoll
Laufprotokoll für β -PL	templates	Inaktivierung mit β -PL - Laufprotokoll
Belehrung	templates	Belehrung zum Umgang mit b-PL und BEI

4 Vorbereitung der Brühe

Prinzipiell kann die Inaktivierungsprozedur auf beliebige Brühen angewendet werden. Es ist jedoch zu beachten, dass die empfohlenen Konzentrationen für Ethylenimin (1.5 mM) und β -Propiolacton (3 mM) sich auf **geklärte** Brühen, d.h. Brühen ohne größere Anteile an Zelltrümmern beziehen. Sollen ungeklärte Brühen inaktiviert werden, so ist zum einen für eine ausreichende Durchmischung zu sorgen (z.B. mit einem Magnetrührer), da sich größere Partikel sonst am Boden ablagern und eventuell eine für das Agenz undurchdringliche Schicht bilden. Zum andern muss die Konzentration des Agenz angepasst werden. Über die notwendigen Konzentrationen liegen noch keine zuverlässigen Daten vor. Es wurden jedoch schon ungeklärte Brühen erfolgreich mit 1.5 mM Ethylenimin und 12 mM β -Propiolacton inaktiviert.

5 Inaktivierung

- Zur Stabilisierung des pH-Wertes über den Zeitraum der Inaktivierungsreaktion wird Phosphatpuffer verwendet. Die Stammlösung ist vor der Benutzung zu autoklavieren oder sterilzufiltrieren. Der Puffer kann in größeren Mengen hergestellt und im sterilen Zustand unbegrenzt gelagert werden.

Der Puffer sollte nach exakter Einwaage einen pH-Wert von 6.4...6.6 aufweisen. Eine Titration ist nicht notwendig. Die Einhaltung des pH-Wertes sollte jedoch mit einem pH-Meter überprüft werden.

Phosphatpuffer, 0.6 M	c / M	Menge
KH ₂ PO ₄ , 136.09 g mol ⁻¹	0.3	40.8 g
Na ₂ HPO ₄ , 141.96 g mol ⁻¹	0.3	42.6 g
H ₂ O		1 l

- Bevor begonnen wird, mit den giftigen Agenzien zu hantieren, sollte die Entsorgung vorbereitet werden. Es wird ein Abfallbeutel für den Feststoffmüll benötigt, der entsprechend beschriftet sein muss. Für die Passivierung der Inaktivierungsagenzien muss 2% Zitronensäure vorhanden sein. Am Abzug ist ein Hinweis auf die Lagerung gefährlicher Substanzen anzubringen. Der Abfallbeutel, das zu verwendende Reaktionsgefäß und das Gefäß für den Ansatz der Agenz sind außerdem mit dem Gefahrenzeichen „sehr giftig (T+)“ zu kennzeichnen, das Reaktionsgefäß zusätzlich mit dem Gefahrenzeichen „Biogefährdung“.
- Vor dem Ansatz der Inaktivierung muss eine Arbeitslösung des zu verwendenden Inaktivierungsagens hergestellt werden. Es wird nur ein Agenz benötigt (Ethylenimin oder β -Propiolacton). Beim Ansetzen der Arbeitslösung sind unter allen Umständen die **Sicherheitsmaßnahmen** einzuhalten (siehe oben). Der Ansatz muss **im Abzug** erfolgen. Es

sollte nicht mehr Agenz als notwendig angesetzt werden. Die Öffnung des verwendeten Gefäßes muss ausreichend weit sein, um den Zugang mit einer Spritze zu ermöglichen. Es dürfen nur Gefäße verwendet werden, die sich sicher verschließen lassen.

Die in den Rezepten angegebenen Volumina beziehen sich auf die Inaktivierung von 1 L vorgeklärter Brühe. Die tatsächlich benötigte Menge kann per Dreisatz berechnet werden. Die Ethylenimin-Arbeitslösung ist nach dem Ansatz für mindestens 1 h bei 37 °C zu inkubieren (Ringbildung). Die β -Propiolacton- bzw. die fertige Ethylenimin-Arbeitslösung ist bis zur Verwendung auf Eis zu lagern. **Die Lösungen sind für jede Inaktivierung frisch anzusetzen.**

Die genaue Haltbarkeit der Arbeitslösungen ist unbekannt. Beide Agenzien können in wässriger Lösung spontan zerfallen und auspolymerisieren. Es wird deshalb empfohlen, die Lösungen so schnell wie möglich zu verwenden.

BEI, 0.5 M	Menge
BEA HBr, 204.9 g mol ⁻¹	0.41 g
NaOH, 1 M	4 ml
	4 ^a ml

β-PL, 0.5 M	V / ml
β -PL, 99%, 15.74 M	0.254
PBS	7.75
	8 ^a ml

^a Das molekulare Volumen des gelösten Agenz wurde nicht berücksichtigt. Das Gesamtvolumen ist nur eine Näherung.

4. Vor dem Beginn der Inaktivierung können optional Proben von der Brühe für die Analytik genommen werden. Es empfiehlt sich außerdem, Steriltests in Casos anzusetzen.
5. Unter der **Virusbank** die Brühe vorlegen und den Phosphatpuffer zudosieren (siehe Tabelle unten). Den Gefäßinhalt durch sanfte Rotation vermischen (Schaumbildung vermeiden).
6. Im **Abzug** das Agenz mit einer Spritze aufziehen und direkt durch einen 0.2 μ m Sterilfilter in das Reaktionsgefäß tröpfeln. Die Dosierung sollte so genau wie möglich sein, im Zweifelsfall ist leicht überzudosieren. Die in den Rezepten angegebenen Volumina beziehen sich auf die Inaktivierung von 1 L vorgeklärter Brühe. Die tatsächlich benötigte Menge kann per Dreisatz berechnet werden. Nach der Zugabe die Reaktion durch sanfte Rotation gut mischen (Schaumbildung vermeiden). Optional kann der pH-Wert mit einem Indikatorstreifen überprüft werden. Er sollte nicht mehr als 0.5 pH-Einheiten von 6.8 abweichen.
Die Arbeit unter dem Abzug stellt ein gewisses Sterilitätsrisiko dar. Aus Sicherheitsgründen wurde jedoch darauf verzichtet, den Ansatz unter einer Sterilbank durchzuführen. Um das Risiko einer Kontamination gering zu halten, sollte das Gefäß mit der Brühe nur so lange wie nötig geöffnet werden. Der direkte Kontakt unsteriler Elemente (Hände, unsterile Pipette, Indikatorstreifen) muss in jedem Fall vermieden werden.

Inaktivierungsreaktion	c / mM	BEI	β -PL
		V / ml	V / ml
Brühe		1000	1000
Phosphatpuffer, 0.6 M	30 mM	53	53
BEI, 0.5 M	3 mM	3.2	-
β -PL, 0.5 M	1.5 mM	-	6.4
		1056	1059

7. Das Gefäß mit der Lösung des Agenz mit 2% Zitronensäure fluten und sicher verschließen, den Feststoffmüll in dem dafür vorgesehenen Müllbeutel sicher verstauen. Der Müll ist unter einem gekennzeichneten Abzug zwischenzulagern. Die Vorschriften für die Entsorgung sind einzuhalten (siehe unten).
8. Die angesetzte Inaktivierungsreaktion etwa eine Stunde ruhen lassen und danach unter der **Virusbank** in ein frisches steriles Gefäß überführen. Das neue Gefäß ist mit den Gefahrensymbolen „sehr giftig“ und „Biogefährdung“ zu kennzeichnen. Außerdem sollte der Typ und die verwendete Menge des Agenz sowie der Zugabezeitpunkt auf dem Gefäß vermerkt werden. Volumina bis zu einem 1 L dürfen umgeschüttet werden. Größere Volumina müssen umgepumpt oder vorsichtig abgedrückt werden. Die hierzu notwendigen Schläuche und Flaschenaufsätze sind vor und nach der Benutzung zu autoklavieren. *Der Transfer in ein frisches Gefäß entspricht dem obligatorischen Tanktransfer in der Produktion. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass die gesamte Brühe mit dem Agenz in Berührung kommt.*
9. Optional können wieder Proben für die Analytik genommen und Steriltests in Casos angesetzt werden.
10. Die Inaktivierungsreaktion ist für mindestens 24 h bei 37 °C zu lagern. Die minimale Inkubationszeit ist unbedingt einzuhalten, damit die Inaktivierungsangenzien vollständig abreagieren können. **Die Lagerung muss im S2-Bereich erfolgen.** Danach kann die Lagerung den jeweiligen Anforderungen angepasst werden (z.B. 4 °C im Kühlraum). Eine Überführung in den S1-Bereich ist jedoch erst nach dem erfolgreichen Abschluss der Inaktivierungstests zulässig.

6 Inaktivierungstest

1. Für die Durchführung der Inaktivierungstests werden vier konfluente T75-Flaschen mit MDCK-Zellen in Z-Medium benötigt. Die Zellen sind gemäß der aktuellen Arbeitsanweisung zu kultivieren (Kiesel *et al.*, 2000). Es werden jeweils zwei Flaschen im Abstand von drei Tagen benötigt. Die Zellen sind so einzusäen, dass sie zum jeweils benötigten Zeitpunkt konfluent und noch vital sind. Die Morphologie ist vor der Verwendung unter dem Mikroskop zu überprüfen.
2. Die Flaschen werden mit der inaktivierten Brühe regulär infiziert. Die Flaschen hierzu entleeren und 3 mal mit etwa 50 ml PBS waschen. Danach mit 50 ml frischem V-Medium und 10 µg/ml Trypsin befüllen und mit 1 ml der zu testenden Brühe beimpfen. Zur Sicherheit ist eine Positivkontrolle mit TCID₅₀-Standard parallel zu führen. Die Infektion für 3 Tage austragen, danach mit den Überständen eine weitere Infektion nach derselben Prozedur durchführen. Die Flaschen nach der Inkubation in den Kühlraum zur Lagerung bei 4 °C bringen.

3. Die HA-Titer der gelagerten Flaschen sind gemäß der aktuellen Arbeitsanweisung (Kiesel *et al.*, 2004) zu bestimmen. Nach erfolgreicher Inaktivierung muss der Titer der ersten Infektion der Verdünnung der Brühe entsprechen (ca. 1:50). In der zweiten Infektion darf kein Virus nachweisbar sein. Gleichzeitig müssen beide Kontrollen positiv sein (log-Titer > 1). **Sind die Bedingungen nicht erfüllt, muss die Inaktivierung wiederholt werden.**
4. Die Gefahrenzeichen auf dem Reaktionsgefäß sind zu entfernen. Die Beschriftung ist zusätzlich um das Wort „inaktiv“ zu ergänzen.

7 Entsorgung

Der anfallende Feststoffmüll und das überschüssige Agens sind unter einem gekennzeichneten Abzug zu lagern. Für die Entsorgung des Feststoffmülls ist Herr Jan Schaefer (Tel. 185) zuständig. Das überschüssige Agens muss mindestens eine Woche gelagert werden, um eine vollständige Polymerisation zu gewährleisten. Danach kann die Lösung im Ausguss entsorgt werden. Der direkte Kontakt mit der Flüssigkeit sollte dennoch vermieden werden. Das zugehörige Gefäß ist gründlich mit Wasser zu spülen, bevor es in die Spülküche gegeben wird. Die Gefahrenzeichen sind vorher zu entfernen.

8 Referenzen

- Bahnemann HG. 1990. Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethylenimine. *Vaccine* (1990), 8: 299-303.
- Brown F. 2002. Inactivation of viruses by aziridines. *Vaccine* (2002), 20: 322-327.
- Budowsky EI, Friedman EA, Zheleznova NV, Noskov FS. 1991a. Principles of selective inactivation of viral genome. VI. Inactivation of the infectivity of the influenza virus by the action of β -propiolactone. *Vaccine* (1991), 9: 398-402
- Budowsky EI, Zalesskaya MA. 1991b. Principles of selective inactivation of a viral genome. V. Rational selection of conditions for inactivation of the viral suspension infectivity to a given extent by the action of β -propiolactone. *Vaccine* (1991), 9: 319-325.
- Budowsky EI, Smirnov YA, Shenderovich SF. 1993. Principles of selective inactivation of viral genome. VIII. The influence of β -propiolactone on immunogenic and protective activities of influenza virus. *Vaccine* (1993), 3: 343-348.
- Glenny AT, Hopkins BE. 1923. Diphtheria toxoid as an immunizing agent. *Br. J. Exp. Path.* (1923), 26: 39-47.
- Käsermann F, Wyss K, Kempf C. 2001. Virus inactivation and protein modifications by ethyleneimines. *Antiviral Research* (2001), 52: 33-41.
- Kiesel A, Behrendt I, Best C. 2004. Hämagglutinationstest - Arbeitsanweisung Nr. V/01. MPI-Magdeburg, Bioprozesstechnik.
- Kiesel A. 2000. Passagieren von MDCK-Zellen - Arbeitsanweisung Nr. Z/03. MPI-Magdeburg, Bioprozesstechnik.
- Roberts JJ, Warwick GP. 1963. The reaction of β -propiolactone with guanosine, deoxyguanylic acid and RNA. *Biochemical Pharmacology* (1963), 12: 1441-1442.
- Vollhardt KPC, Schore NE. 1999. Organische Chemie, Abschnitt 9.9: Reaktionen von Oxacyclopropanen, Abschnitte 25: Heterocyclen. Wiley-VCH (1999), ISBN 3-527-29819-3.

9.3.9 MoBi 1: Western Blot mit anschließender Immundetektion

Datum: 13.02.2009 Autor: Nancy Wynserski
uebearbeitet: 07.07.2010 Autor: Björn Heynisch

1.0 Ziel

Elektrotransfer von Proteinen auf eine Trägermembran nach zuvor erfolgter gelelektrophoretischer Auftrennung mittels SDS-PAGE.

2.0 Material

- Acrylamid 30 %
- Ammoniumperoxidisulfat (Applichem A3626,500)
- Aqua dest.
- β -Mercaptoethanol
- Bromphenolblau (Amersham Biosciences 17-1329-01)
- BSA (Applichem A3912,100)
- Farbstoff Ponceau Rot
- Glycin (Applichem A1067,5000)
- Glycerol (Sigma. A1123)
- Methanol (Roth 4627.2)
- NaCl (Merck 1.06404.5000)
- PVDF-Membran (Millipore IPVH00010; Porengroesse 0,45 μ m)
- SDS (Applichem A1112,1000)
- SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific-Pierce 34076)
- Temed (Amersham Biosciences 17-1312-01)
- Tris (Applichem A 1086,1000)
- Tris-Cl (Applichem A 3452,1000)
- Tween 20 (Merck 8.17072.1000)
- Protein Marker Magic Mark (Invitrogen)
- Milchpulver
- Geraetschaften:
 - Pipetten , Spitzen
 - Bechergläser , Rührfisch
 - Gelkammer, Gelkämme, Gelkassette, Glasplatten, Eis-Akku
 - Blotklemme, Pads und Filterpapiere
 - Thermomixer , Zentrifuge
 - Spannungsquelle
 - Plastikwanne
 - Rührer, Schüttler
 - Whatman Papier

2.1. Puffer und Lösungen

APS (Ammoniumperoxidisulfat) 10 %ig

- 500 mg/5 ml in H₂O bidest.
- Aliquots à 500 μ l bei -20 °C lagern

Bromphenolblau (gesättigt)

- 50 mg/100 ml in H₂O bidest.

BSA 3 %

- 3 g BSA/ 100 ml TTBS

Lämmli-puffer (4x)

- 250 mM Tris-Cl pH 6,8 2,0 ml (1.0 M) (12,114 g/100 ml)
- 40 % Glycerol 3,2 ml
- 8 % SDS 0,64 g
- 0,05 % Bromphenolblaulsg. 1.6 ml
- 10 % β -Mercaptoethanol 0,8ml

9.3 Anhang - Arbeitsanweisungen

- H₂O bidest. 0,4 ml
 - Aliquots à 500 µl bei -20 °C lagern
- 10x Laufpuffer mit SDS (1 L)
- 1 % SDS 10 g
 - 1,92 M Glycin 144 g
 - 250 mM Tris 30,3 g
- 10x Laufpuffer ohne SDS (1 L)
- 1,92 M Glycin 144 g
 - 250 mM Tris 30,3 g
- Sammelgelpuffer 0,5 M TrisCl pH 6,8
- 12,114 g/ 200 ml in H₂O bidest.
 - Lagerung 4 °C
- SDS 10 %ig
- 5 g / 50 ml in H₂O bidest.
- Strip-Puffer pH 6,7 (1 L)
- 62,5 mM Tris 7,571 g
 - 2 % SDS 20 g
 - 100 mM β-Mercaptoethanol 350 µl/50 ml Puffer (Abzug!)
- TBS 10x pH 7,6 (1 L)
- 200 mM Tris 24,2 g
 - 1,37 M NaCl 80 g
 - TTBS: TBS mit 0,1 % Tween 20
- TTBS
- TBS + 0,1 % Tween 20
- Transferpuffer
- 10 % MeOH
 - 10 % Elektrophoresepuffer ohne SDS
 - 80 % H₂O bidest.
- Trenngelpuffer 1,5 M Tris-Cl pH 8,8
- 36,342 g/ 200 ml in H₂O bidest
 - Lagerung 4 °C

3.0 Methode

3.1. Herstellung SDS-Gel

- Kammer vorbereiten
- Glasplatten mit 1mm Spacern, vorher mit EtOH putzen, in den Glasplattenhalter einbauen und im Gießgestell einspannen
- zuerst ein Trenngel gießen und mit Isopropanol überschichten, ca. 45 min aushärten lassen
- danach Sammelgel gießen und die Kämme hineinsetzen

Trenngel 2x1mm

	7,5% Gel	8% Gel	10% Gel	12% Gel	15% Gel
H ₂ O	7,8	4,63	3,97	3,29	2,99
Acrylamid 30 %	2,5	2,66	3,33	4	5
Tris-Cl pH 8,8	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
SDS 10%	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
APS10%	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
TEMED	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01

[ml]

Sammelgel 2x1ml

	3% Gel
H ₂ O	6,3
Acrylamid 30 %	1
Tris-Cl pH 6,8	2,5
SDS 10%	0,1
APS10%	0,1
TEMED	0,01

[ml]

3.2. Probenvorbereitung

- Proteinproben je nach gewünschter Konzentration einstellen
- mit 4x red. Lämmli Ladepuffer versetzen
- Proben 5min bei 95 °C im Thermomixer erhitzen, abkühlen lassen auf Eis
- zentrifugieren 10 sec

3.3. Gel beladen

Tipp: die Taschen vorher kennzeichnen, erleichtert das Auftragen der Proben

- Gelkammer mit Elektrophoresepuffer (SDS Laufpuffer) befüllen, Vorsicht: keine Luftblasen am Unterrand des Gels
- Käbme entfernen und die Taschen mit einer Spritze mit Laufpuffer ausspülen, da sich evtl. noch Gelreste in den Taschen befinden können
- 4 µl Marker (Magic Mark) und Proteinproben langsam in die Taschen pipettieren, max. 25 µl (extra lange Spitzen verwenden)
- Strom einstellen bei 15 mA pro Gel bis zum Erreichen des Trenngels, danach 25 mA pro Gel (Dauer bei 2 Gelen ca. 1,5 - 2h)

3.4. Blotten

- Pads und Filterpapiere in einer Schale mit Transferpuffer äquilibrieren
- Membran beschriften und äquilibrieren:
 - 15 sec Methanol
 - 2 min in H₂O bidest.
 - mindestens 5 min in Transferpuffer
- Gel in Transferpuffer äquilibrieren
- Blotklemme mit schwarzer Seite nach unten in die Schale mit Transferpuffer legen
- Blotklemme zusammenbauen:
 - o Pad
 - o 2 Filterpapiere
 - o Gel mit Lauffront nach innen
 - o PVDF-Membran – Luftblasen wegstreichen
 - o 2 Filterpapiere
 - o Pad
- Klemmkasten in Vorrichtung einspannen (schwarz zu schwarz)
- Rührfisch in Plastikwanne
- Vorrichtung in Plastikwanne geben
- Eis-Akku einsetzen
- Kammer mit Transferpuffer auffüllen
- das ganze System in eine Schale auf Rührer setzen
- Strom: 100 V für 1 bis 1,5 h
- mit Farbstoff Ponceau Rot anfärben als Kontrolle für 1 min, mit fließendem Leitungswasser für einige Sekunden entfärben

3.5. Blockieren

- 1 h in TTBS (5 % Milchpulver oder 3 % BSA)
- 3 x 5 min waschen mit TTBS

3.6. Antikörper

- 1. AK über Nacht, 4 °C auf Schüttler
 - o Verdünnung in TTBS (5 % Milchpulver oder 3 % BSA)
- 3 x 10 min in TTBS waschen
- 2. AK 1h bei RT
 - o Verdünnung TTBS (5 % Milchpulver oder 3 % BSA)
- 3 x 10 min in TTBS waschen

3.6. Detektion

- 1,5 ml Pierce-Substratlösung für 2 Blots: 750 µl Lösung A + 750 µl Lösung B vermischen
- Mix auf Blot für 1 min inkubieren
- Blot in Folie auf ebener, lichtundurchlässiger Unterlage platzieren
- Blot scannen (siehe Anleitung Phospholumineszenzimager)

3.7 Strippen

- 350 µl β-Mercaptoethanol/50 ml Stripp-Puffer frisch dazugeben (Abzug !)
- Blot mit Stripp-Puffer im Wasserbad bei 50 °C für 10 min inkubieren
- 4 x 5min TBS
- mit dem Blockieren fortfahren

4.0 Verwendung

Der Western Blot dient zum immunologischen Nachweis bestimmter Proteine und ggf. ihrer posttranslationalen Modifikationen wie z.B. Phosphorylierungen.

5.0 Lagerung

Fertige Membranen können im getrockneten Zustand bei -80 °C gelagert und anschließend erneut gestrippt und mit Antikörpern analysiert werden.

5.1 Lagerung der durch RIPA Lyse gewonnenen Proben

Es erfolgte bisher keine systematische Überprüfung der Lagerbarkeit von Proben, die mittels RIPA Puffer gewonnen worden sind. Es gibt jedoch Anhaltspunkte für die Western Blot Analytik von Phosphoproteinen. Auf empirischen Erfahrungswerten basierend lässt sich sagen, dass nach mehr als 6 Monaten der Probenaufbewahrung bei -70°C es zu einer allmählichen Abnahme der Signalstärke im Western Blot kommen kann.

9.4 Veröffentlichungen über Teilgebiete der Dissertation

Artikel

Seitz C., Isken B., Heynisch B., Rettkowski M., Frensing T., Reichl U. (2012). Trypsin promotes efficient influenza vaccine production in MDCK cells by interfering with the antiviral host response. *Appl Microbiol Biotechnol.* **93(2)**, 601-11. DOI: 10.1007/s00253-011-3569-8

Seitz, C., Frensing, T., Höper, D., Kochs, G. & Reichl, U. (2010). High yields of influenza A virus in Madin-Darby canine kidney cells are promoted by an insufficient interferon-induced antiviral state. *Journal of General Virology* **91**, 1754-1763. DOI: 10.1099/vir.0.020370-0

Frensing, T., Seitz, C., Heynisch, B., Patzina, C., Kochs, G. & Reichl, U. (2011). Efficient influenza B virus propagation due to deficient interferon-induced antiviral activity in MDCK cells. *Vaccine* **29**, 7125-7129. DOI:10.1016/j.vaccine.2011.05.069

Vester, D., Lagoda, A., Hoffmann, D., Seitz, C., Heldt, S., Bettenbrock, K., Genzel, Y. & Reichl, U. (2010). Real-time RT-qPCR assay for the analysis of human influenza A virus transcription and replication dynamics. *Journal of Virological Methods*, **168(1-2)**, 63-71. DOI:10.1016/j.jviromet.2010.04.017

Heynisch, B., Frensing, T., Heinze, K., Seitz, C., Genzel, Y. & Reichl, U. (2010). Differential activation of host cell signalling pathways through infection with two variants of influenza A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) in MDCK cells. *Vaccine*, **28**, 8210-8218. DOI:10.1016/j.vaccine.2010.07.076

Vortrag

Seitz, C., Frensing, T., Heynisch, B. & Reichl, U. (2010). Einfluss der zelleigenen Pathogenabwehr auf die Influenza-Impfstoffproduktion in MDCK-Zellen. 28. DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen, Aachen, Deutschland.

Poster

Seitz, C., Frensing, T. & Reichl, U. (2010). Impact of interferon signaling on virus yield in mammalian cell culture based influenza vaccine production. 4th European Congress of Virology, Como, Italien.

Seitz, C., Frensing, T. & Reichl, U. (2009). Analysis of Interferon Induction in Mammalian Cells during Influenza Virus Production. 27. DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen, Mannheim, Deutschland.

Seitz, C., Frensing, T. & Reichl, U. (2009). Influence of the innate immune response on mammalian cell culture based influenza vaccine production. 21st ESACT Meeting, Dublin, Irland.

Seitz, C., Frensing, T. & Reichl, U. (2009). The role of the type I interferon response in mammalian cell culture based influenza vaccine production. 19th Annual GfV Meeting, Leipzig, Deutschland.

9.5 Betreute Studien- und Abschlussarbeiten

Henrike Götze (2009). Untersuchung der Influenza-induzierten Interferon-Expression in MDCK-Zellen. Studienarbeit. Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.

Maria Rettkowski (2010). Der Einfluss extrazellulärer Proteaseaktivität und der Infektionsdynamik auf die IFN-induzierte antivirale Aktivität von MDCK-Zellen. Studienarbeit. Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.

Robert Büttner (2011). Bestimmung der zellulären Ribosomenzahl bei der Influenza-Impfstoffherstellung in Säugerzellkultur. Bachelorarbeit. Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.

9.6 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Seitz
 Vorname: Claudius
 Geburtsdatum: 22.10.1981
 Geburtsort: Hagen, NRW
 Familienstand: ledig
 Staatsangehörigkeit: deutsch

BERUFLICHER WERDEGANG

seit 02/2012 Manager Qualitätskontrolle bei Vibalogics, Cuxhaven

4/2007 – 10/2011 wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe Bioprozesstechnik (Prof. Reichl), Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme, Magdeburg
 Doktorand am Lehrstuhl für Bioprozesstechnik, Fakultät für Verfahrens- und Systemtechnik, Otto-von-Guericke Universität Magdeburg (angestrebter Abschluss: Dr.-Ing.)
 Thema: „Einfluss der zelleigenen Pathogenabwehr auf die Influenza-Impfstoffproduktion in MDCK-Zellen“

05/2006 - 01/2007 Studentische Hilfskraft am Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme, Magdeburg

08/2005 - 01/2006 Praxissemester bei der Bitop AG, Witten
 Projekte:
 a. Klonierung des Ectoinhydroxylase Gens von *B. Linens* in *E. coli*
 b. Optimierung verschiedener Schritte der Aufbereitungsverfahren für Ectoin und Hydroxyectoin aus Fermentationsmedien

09/2001 - 06/2002 Zivildienst in der Paracelsusklinik Hemer, Abteilung OP

AUSBILDUNG

09/2002 - 03/2007 Studium der Bio- und Nanotechnologie an der Fachhochschule Südwestfalen (Iserlohn), Schwerpunkt Biotechnologie
 Abschluss: Diplom-Ingenieur (FH)

04/2006 - 01/2007 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme, Magdeburg
 Arbeitsgruppe Bioprozesstechnik (Prof. Reichl)
 Thema: „Quantitative molekularbiologische Untersuchungen an Influenza Viren durch Real-Time quantitative reverse Transkriptase PCR“

08/1994 - 06/2001 Friedrich-Leopold-Woeste Gymnasium Hemer,
 Abschluss: Abitur