

**Biologische, immunologische und molekulare
Eigenschaften neuer Isolate des aviären
Influenza A Virus (AIV) in Bayern**

der Fakultät für Biologie der
EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT
TÜBINGEN

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

von
Cordula Fuchs
aus Tübingen

vorgelegte

DISSERTATION

2009

Tag der mündlichen Prüfung 20.11.2009

Dekan:

Prof. Dr. H. A. Mallot

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. E. Pfaff / Prof. Dr. Dr. M. Büttner

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. H-G. Rammensee

Meiner Familie

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. Mathias Büttner am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim / München angefertigt.

Bei all denjenigen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Dr. Büttner für die Überlassung und Betreuung des Themas, seine wertvollen Anregungen und seine stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Rammensee für die Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten und vor der Fakultät für Biologie zu vertreten.

Herrn Prof. Dr. Pfaff für die Bereitschaft, diese Arbeit zu betreuen und zu begutachten.

Dr. Daniel Wienhold für die Ferndiagnosen meiner Arbeit.

Heike Lang, Susanne Gellert sowie alle anderen vom Team 105 F+E und der mittäglichen Schafkopfrunde.

Janine Webster für die transatlantische Motivation.

Dr. Elisabeth Stüber und Dr. Johannes Breitschopf für den vielen Spaß, den ich neben der Arbeit mit ihnen hatte.

Und nicht zuletzt meinen Eltern und meinen Geschwistern, die immer an mich geglaubt und mir dies alles ermöglicht haben.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Influenza A Viren	1
1.1.1	Taxonomie	1
1.1.2	Morphologie	1
1.1.3	Genomorganisation.....	3
1.1.4	Virusproteine	3
1.1.5	Replikation	5
1.1.5.1	Antigenic Drift und Antigenic Shift	8
1.1.6	Wirts- und Gewebespezifität	10
1.1.7	Immunreaktionen.....	13
1.1.7.1	Impfung gegen Influenza A Viren bei Nutztieren.....	16
1.2	Aviäre Influenza in verschiedenen Wirtsspezies.....	17
1.2.1	Im Menschen	17
1.2.1.1	Therapie	19
1.2.2	In anderen empfänglichen Wirten	20
1.3	Pathogenität/Virulenz als Multi-Gen Ereignis	21
1.4	Zielsetzung	23
2	MATERIAL	26
2.1	Zelllinien.....	26
2.2	Standardmedien	26
2.3	Nukleinsäuren und Oligonukleotide.....	26
2.3.1	Nukleinsäuren.....	26
2.3.2	Oligonukleotide	27
2.4	Aviäre Influenza A Virus (AIV) -isolate.....	30
2.5	Enzyme und Kits	30
2.5.1	Enzyme	30
2.5.2	Kits, Puffer und Lösungen.....	31
2.6	Antikörper und Konjugate.....	31
2.7	Chemikalien und Reagenzien.....	32
2.8	Verbrauchsmaterial.....	33
2.9	Geräte und Laborhilfsmittel	34
2.9.1	Zentrifugen	35
2.9.2	Software.....	35
3	METHODEN.....	36
3.1	Zellkulturen	36
3.1.1	MDBK (<i>Bos taurus</i> , Madin Darby Bovine Kidney), MDCK (<i>Canis familiaris</i> , Madin Darby Canine Kidney) und CRFK (<i>Felis catus</i> , Crandell-Rees Feline Kidney) Zellen	36
3.1.2	MA-104 Zellen (<i>Cercopithecus aethiops</i> , Affennierenzellen).....	36
3.1.3	Caco-2-Zellen (Zellen eines Dickdarmkarzinoms)	36
3.1.4	PK-15-Zellen (<i>Sus scrofa</i> , Schweinenierenzellen).....	37
3.1.5	Periphere Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells, PBMC).....	37
3.1.5.1	Bestimmung der Lebendzellzahl	37
3.2	Virologische Methoden	38
3.2.1	Virusvermehrung.....	38

3.2.1.1	In bebrüteten Hühnereiern.....	38
3.2.1.2	In Zellkultur.....	38
3.2.1.2.1	Titerbestimmung.....	39
3.2.1.3	In der Maus.....	39
3.2.2	Virusinaktivierung.....	40
3.3	Molekularbiologische Methoden.....	40
3.3.1	Primerkonstruktion.....	40
3.3.2	Präparation und Analyse von RNA und DNA.....	41
3.3.2.1	Gewinnung von Virusgenom aus Probenmaterial.....	41
3.3.2.2	Reverse Transkription.....	41
3.3.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	42
3.3.2.4	Agarosegelelektrophorese.....	42
3.3.2.5	Sequenzierung und Analyse von DNA Fragmenten.....	43
3.3.3	Entwicklung und Etablierung einer Multiplex-PCR.....	44
3.4	Immunologische Methoden.....	45
3.4.1	Immunhistochemie.....	45
3.4.1.1	Vorbereitung der Gewebeproben.....	45
3.4.1.2	Färbung der Gewebeproben.....	45
3.4.2	Impfversuch mit inaktiviertem H5N1 und H7N2.....	46
3.4.2.1	Impfversuchskonzeption.....	46
3.4.2.2	Interferon- γ Nachweis mittels EliSpot-Analyse.....	48
3.4.2.3	Antivirale Wirkung von peripheren mononukleären (PBMC) Zellüberstände.....	50
3.4.2.4	Antikörpernachweis.....	50
4	ERGEBNISSE.....	51
4.1	Virusisolierung und Selektion der AIV-Subtypen.....	51
4.2	Subtypisierung ausgewählter Isolate.....	52
4.2.1	Sequenzvergleiche.....	55
4.2.1.1	A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2.....	55
4.2.1.2	A/Mallard/Bavaria/1/06 H5N1 und A/Mallard/Bavaria/10/07 H5N1.....	55
4.2.1.2.1	A/Mallard/Bavaria/1/2006 H5N1.....	56
4.2.1.2.2	A/Mallard/Bavaria/10/2007 H5N1.....	57
4.2.1.3	A/Mallard/Bavaria/3/2006 H10N7.....	57
4.3	Immunhistochemischer Nachweis von AIV im Hühnerembryo.....	58
4.4	Molekulare Analytik von Nukleo- und Matrixprotein.....	59
4.4.1	Homologievergleich der AS-Sequenzen der bayerischen Isolate.....	61
4.5	Infektionsverlauf in Zellkulturen.....	62
4.6	Natürlichen Reassortantenbildung in der Maus mit den Stämmen A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2 und A/FPV/Bratislava/1979 H7N7.....	65
4.6.1	Charakterisierung des Reassortantenvirus.....	67
4.6.1.1	Gesamtgenom-Vergleich von H7N2, H5N2 und H7N7.....	69
4.6.1.2	Zellspektrum des Reassortantenvirus H7N2.....	70
4.7	Kodierende Genbereiche der AIV-Isolate mit Virulenzbezug.....	72
4.7.1	Vergleich der Virulenz zweier H5N1-Viren in der Maus.....	72
4.7.2	Funktion einer Multiplex-PCR.....	75
4.7.2.1	Vergleich kritischer Genombereiche beider H5N1 Viren.....	76
4.8	Ergebnisse der Impfungen beim Schwein.....	79
4.8.1	H5N1-Impfversuch mit naiven Ferkeln.....	80
4.8.1.1	Interferon- γ Sekretion von porcinen PBMC.....	80

4.8.1.2	Antikörperbildung von H5N1-immunisierten Ferkeln	83
4.8.2	H7N2-Impfversuch mit adulten Schweinen	85
4.8.2.1	Interferon- γ Sekretion durch PBMC der H7N2-immunisierten Schweine...	86
4.8.2.2	Antivirale Wirkung von Zellkulturüberständen	87
5	DISKUSSION	88
6	ZUSAMMENFASSUNG	98
7	ANHANG	100
7.1	Abkürzungsverzeichnis	100
7.2	Sequenzen	101
7.2.1	A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2	101
7.2.2	A/Mallard/Bavaria/1-R/2005 H7N2	108
7.2.3	A/Mallard/Bavaria/1/2006 H5N1	120
7.2.4	A/Mallard/Bavaria/10/2007 H5N1	120
7.2.5	A/Mallard/Bavaria/3/2006 H10N7	120
7.3	Gesamtgenomvergleich von von H7N2, H5N2 und H7N7	121
7.4	Veröffentlichungen	124
7.5	Lebenslauf	125
8	LITERATUR	126

1 EINLEITUNG

1.1 Influenza A Viren

1.1.1 Taxonomie

Zur Familie der *Orthomyxoviridae* gehören die Influenza Viren Typ A, B und C, sowie die Thogotoviren [Wright et al., 2001 und ICTV 2004] (s. Tab.1).

Tabelle 1: die wichtigsten Vertreter der Orthomyxoviridae

Genus	Mensch
Influenza A, B	Influenza A Viren bei Menschen Geflügel, Schwein, Pferd, Seehunden, Walen, Influenza B Viren bei Menschen
Influenza C	Influenza C Viren bei Mensch und Schweinen
Thogotoviren	Tick-Borne-Thogotovirus bei Zecken und Mäusen Dhori-Virus bei Zecken und Mäusen

Die Nomenklatur für Influenza A Viren richtet sich nach den beiden Oberflächenproteinen Hämagglutinin und Neuraminidase. Es gibt 16 Hämagglutinin- und 9 Neuraminidase-Komponenten, die in Kombination als Subtypen definiert sind [Fouchier et al., 2005]. Für Influenza Viren von Typ B und C gibt es keine Subtypisierung [Shen et al., 2009].

Die Einteilung der aviären Influenza A Viren (AIV) der Subtypen H5 und H7 kann durch die Angabe zur Virulenz in ‚high pathogenic avian Influenza virus‘ (HPAI) und ‚low pathogenic avian Influenza virus‘ (LPAI) ergänzt werden. Dabei wird neuerdings die Spaltstelle im Hämagglutinin als molekularbiologisches Unterscheidungskriterium für diese Angabe verwendet [Senne et al.,2006].

1.1.2 Morphologie

Die Viruspartikel sind pleomorph und zeigen keine einheitliche Form oder Größe. Die Mehrzahl der Partikel weist jedoch bei elektronenmikroskopischer

Darstellung (Abb. 2) eine sphärische Form mit einem Durchmesser von ~120nm auf. Die Abbildungen 1 zeigt die schematische Darstellung eines Influenza A Viruspartikels mit den wichtigsten Proteinen.

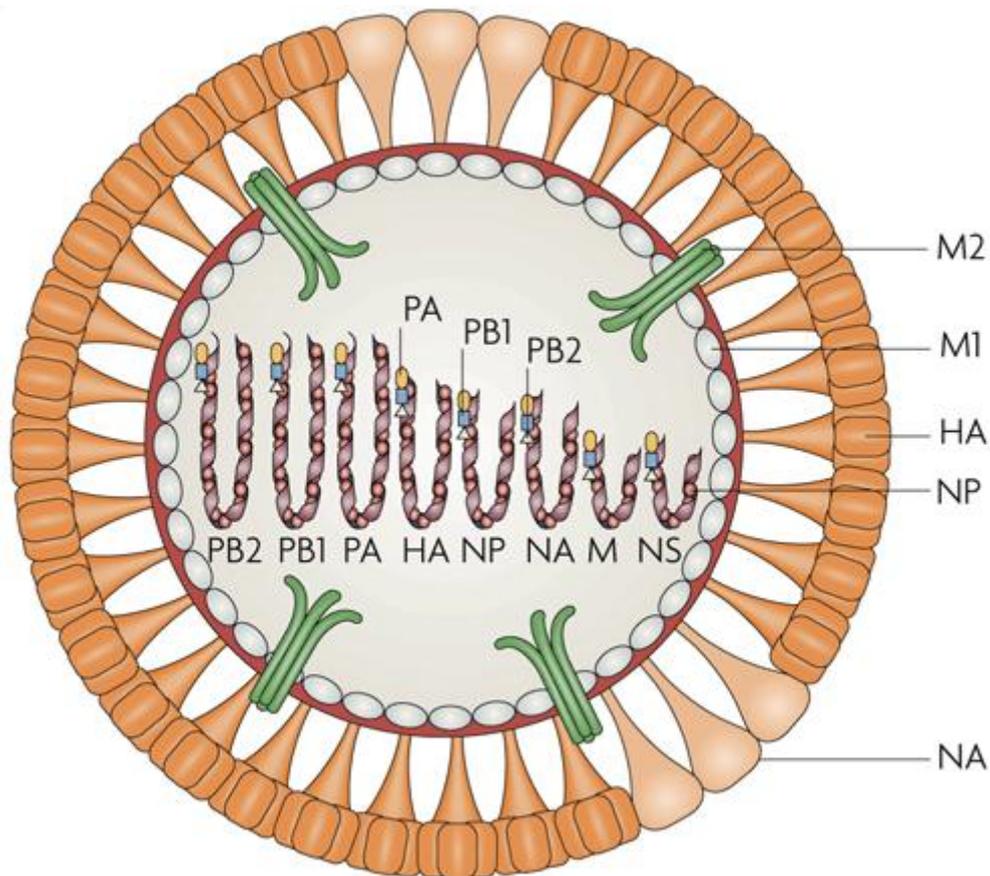


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Influenza-Partikels (www.nature.com).

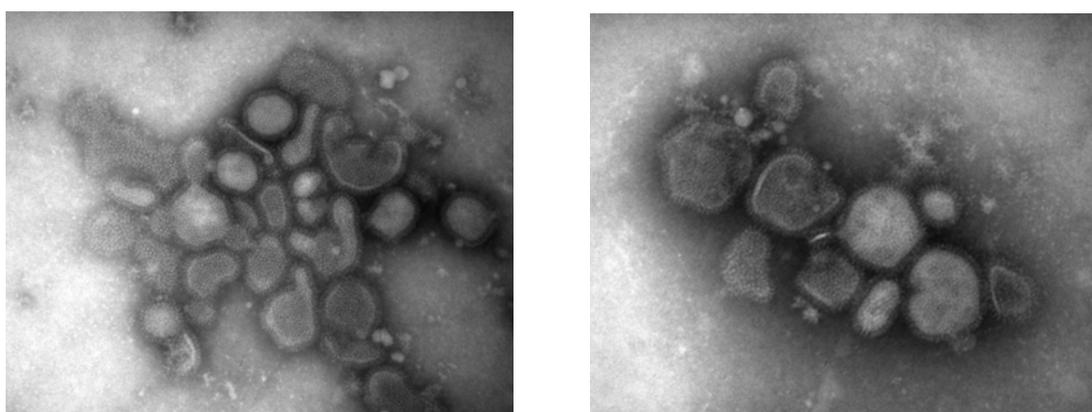


Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Darstellung eines Influenza-Partikels (Fotos: LGL-Oberschleißheim, F. Horvarth). Dargestellt sind einzelne Influenza-Partikel.

1.1.3 Genomorganisation

Influenza A Viren besitzen ein segmentiertes RNA-Einzelstrang-Genom in negativer Polarität (-ssRNA). Ca. 13600 Basen codieren auf acht Segmenten insgesamt 10 oder 11 Proteine (Tab.2), da das PB1-F2 Protein nicht in allen Influenza A Virusisolaten vorhanden ist [Shaw et al., 2008; Zell et al., 2007]. In der Regel codiert jedes RNA-Segment ein Protein. Allerdings können durch alternative Splice-Vorgänge auch zwei Proteine synthetisiert werden. Die 3'- und 5'-Enden bilden pfannenstielähnliche Strukturen aus und stellen die Signalsequenzen für die Initiation der Transkription und der RNA-Replikation dar. Zum Schutz der einzelsträngigen RNA sind diese mit argininreichen Nukleoproteinen (NPs) assoziiert. Am 3'-Ende jedes Segments befinden sich ca. 50 Einheiten des viruseigenen Polymerasekomplexes (Pol-Komplex).

1.1.4 Virusproteine

Die Virusproteine der Influenza A Viren lassen sich in Struktur- und Nichtstrukturproteine unterteilen. Zu den Strukturproteinen gehören die Membranproteine Hämagglutinin (HA), Neuraminidase (NA), der Transmembran-Ionenkanal (M2), das Matrixprotein (M1) sowie die Komponenten des Nukleokapsids (Nukleoprotein (NP) und Polymerasekomplex PB1, PB2 und PA). Die Nichtstrukturproteine umfassen NS1 und NS2 sowie PB1-F2, wobei PB1-F2 nicht immer vorhanden ist [Henklein et al., 2005]. In zahlreichen H1N1-Virusisolaten aus Schweinen hatte das PB1-F2- Protein ein in-Frame Stoppcodon an den Positionen 11, 25 und 36 [Zell et al., 2007]. In Tabelle 2 sind die Virusproteine den Segmenten des Virusgenoms zugeordnet aufgelistet.

Tabelle 2: Die RNA-Genomsegmente von A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2 und die durch sie codierten Proteine.

Segment	Nukleotide ^a (Bp)	Protein	Funktion
1	2277	PB2	Polymerase-Komplex Cap-Binding
2	2274	PB1	Polymerase-Komplex RNA-abhängige RNA-Polymerase
		PB1F2	auf ORF2 im PB1-Segment codiert induziert Apoptose
3	2151	PA	Polymerase-Komplex Protease-Aktivität
4	1695	HA ₁	N-terminaler Anteil von HA ₀ , Adsorption an Neuraminsäure, Rezeptorbindung
		HA ₂	C-terminaler Anteil von HA ₀ , Membranfusion
5	1497	NP	Nukleoprotein, Hauptkomponente des Nukleokapsids Kerntransportsignal: Nukleokapside in Kern
6	1410	NA	Neuraminidase entfernt endständige Neuraminsäuren von infizierten Zellen, verhindert so das Verkleben von neuen Viuspartikeln bei deren Freisetzung
7	982	M	M1 kleidet Innenseite der Lipiddoppelschicht aus, aktiv bei Morphogenese
		M2	Transmembran-Protein-Ionen-Kanal sehr früh im Infektionszyklus aktiv
8	838	NS	NS1 Kernprotein, Co-Faktor beim RNA-Splicing, reguliert Export der gesplitten RNA wirkt als Interferon-Antagonist
		NS2	Funktion nicht eindeutig bekannt

^a Die Nukleotide (Bp) geben die Anzahl der Basen in der codierenden Region wieder

Neben den viruseigenen Proteinen lassen sich auch eine Vielzahl zellulärer Proteine mittels Proteomtechnik [Maxwell et al., 2007], sowohl in der Hülle, als auch im Inneren eines Virion, nachweisen und identifizieren. Die Funktion der eingebauten Wirtszellproteine ist allerdings nicht gänzlich aufgeschlüsselt und es ist auch nicht sicher, ob es sich dabei um unspezifisch eingebaute Proteine handelt, die im Zuge des ‚Budding-Prozesses‘ in die Virushülle eingelagert wurden [Shaw et al., 2008]. Neben Influenza A Viren konnten auch bei anderen umhüllten Viren Wirtszellproteine im Virion nachgewiesen werden [Maxwell et al., 2007].

1.1.5 Replikation

Das Virus bindet an Sialinsäurereste von Glykoproteinen oder Glykolipiden auf der Zelloberfläche. Die Endocytose und anschließende Ansäuerung der Clathrin-umhüllten Einschlusskörper durch den M2-Protonenkanal führt zur Konformationsänderung von HA₀ [Harder et al., 2006]. Die fusogene Region am N-Terminus von HA₂ kommt in unmittelbare Nähe der Endosomenmembran. Der hydrophobe Charakter am N-Terminus führt zum Verschmelzen der Lipiddoppelmembranen von Virus und Endosom. Virale Nukleokapside gelangen, induziert durch das Kerntransportsignal der NP, durch Kernporen in den Nukleus, wo die Transkription der viralen RNA (vRNA) in messenger-RNA (mRNA) und komplementäre RNA (cRNA) stattfindet.

Zu Beginn des Replikationszyklus (Abb.3) dienen die Ribonukleoprotein-komplexe als Matrize für die Bildung von viraler mRNA. Der Promotor liegt am 3'-Ende, den Transkriptionspunkten vorgelagert. Da die RNA-abhängige RNA-Polymerase (PB1) die Synthese der neuen Stränge nicht selbst initiieren kann, entfernt das PB2 die 5'-Cap-Struktur der zellulären mRNA-Moleküle, sog. „Cap-Snatching“ [Gastaminaz et al., 2003], und lagert diese an das 3'-Ende der vRNA an. Das PB2-Protein bindet ein Uridin, welches immer an letzter Position der vRNA steht, an einen Adeninrest, der sich in den ersten 10-13 Basen der 5'-Cap-Struktur zellulärer mRNA-Moleküle befindet. Die PB2-eigene Protease-Aktivität spaltet nach dem Adenin und erzeugt so ein freies 3'-OH-Ende, das als Primer für die Polymeraseschritte dient. Dies hat zweierlei zur Folge: einerseits dienen diese Cap-Moleküle als Primer für die RNA-Polymerase, andererseits werden die zelluläre Transkription und Translation unterbrochen und der Wirtsstoffwechsel ganz auf die Bedürfnisse der Virusreplikation eingestellt.

Die Elongation der neuen RNA-Stränge erfolgt durch den viralen Polymerasekomplex (Pol-Komplex) bestehend aus PB2, PB1 und PA. Die Transkription endet 15-20 Nukleotide (Nkt) vor dem 5'-Ende, dessen pfannenstielähnliche Doppelstrangbereiche eine natürliche Barriere für den Pol-Komplex darstellen. Beim Export der viralen mRNA ins Cytoplasma wirken

virale und zelluläre Faktoren zusammen. Die Translation der membranassoziierten Proteine HA, NA und M2 erfolgt an der Membran des endoplasmatischen Reticulums (ER). Eine Signalase entfernt nach Durchschleusen der Aminosäure (AS) -Ketten ein N-terminales Signalpeptid von HA, NA und M2. Über den Golgi-Apparat und Golgi-Vesikel werden HA₀, NA und M2 an die Zelloberfläche transportiert. Dort interagieren sie zu trimeren (HA) bzw. tetramären (NA) Komplexen, werden glykosiliert und HA₀ und M2 zusätzlich mit einer Palmitinsäure modifiziert. M2 reguliert als Protonenpumpe den pH-Wert und verhindert so die vorzeitige Induktion der Fusionsaktivität der HA-Komplexe.

PB2, PB1, PA, NP, NS1, NS2 und M1 weisen eine Signalsequenz für den Transport in den Kern auf. Um den Transkriptionsapparat auf den Replikationsschritt umzustellen, müssen freie, neu synthetisierte NPs im Kern angereichert werden. Diese interagieren mit Proteinen des viralen Pol-Komplexes und leiten die Replikation ein. Die Bildung der notwendigen freien 3'-OH-Gruppe als Primer für die RNA-anhängige RNA-Polymerase erfolgt wie bei der Initiierung der viralen mRNA-Synthese. PB2, PB1 und PA lösen den Hairpin-Loop am 5'-Ende auf und es erfolgt die Synthese eines kompletten Genomstranges (Antigenom), welcher wiederum mit NPs assoziiert und als Matrize für die Negativstrang-Synthese dient. Diese neuen Genomstränge assoziieren mit NP, PB2, PB1 und PA zu Nukleokapsiden (vRNPs) und werden von M1-Proteinen umgeben. Diese Komplexe werden, vermittelt durch die Exportfunktion von NS2, aus dem Kern ins Cytoplasma an Stellen transportiert, an denen besonders viele HA-, NA- und M2-Proteine in die Membran eingelagert sind. Man vermutet, dass die vRNPs mit den assoziierten M1-Proteinen an die ins Cytoplasma reichenden Oberflächenproteine binden. Es erfolgt die Bildung der initialen Budding-Struktur. Die Zellmembran stülpt sich aus, umschließt die Nukleokapside und gibt diese durch Knospung an die Zelloberfläche ab. Die Aktivität der NA entfernt endständige N-Acetyl-Neuraminsäurereste von viralen und zellulären Oberflächenproteinen. So soll ein Verkleben der neu gebildeten Viruspartikel

untereinander oder eine Wechselwirkung der Viruspartikel mit bereits infizierten Zellen vermieden werden.

Ausschließlich Viren mit allen acht Genomsegmenten sind infektiös [Lamb et al., 2001]. Allerdings ist unklar, ob es einen Mechanismus gibt, der gewährleistet, dass immer alle Segmente in das zu bildende Viruspartikel gelangen. Viel wahrscheinlicher erscheint stattdessen, dass in jedes Virion 11-13 Nukleokapsidsegmente eingelagert werden, ohne Rücksicht um welche Segmente es sich handelt. Diese Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, dass nur ca. 10% der neu gebildeten Viruspartikel in Zellkultur infektiös sind.

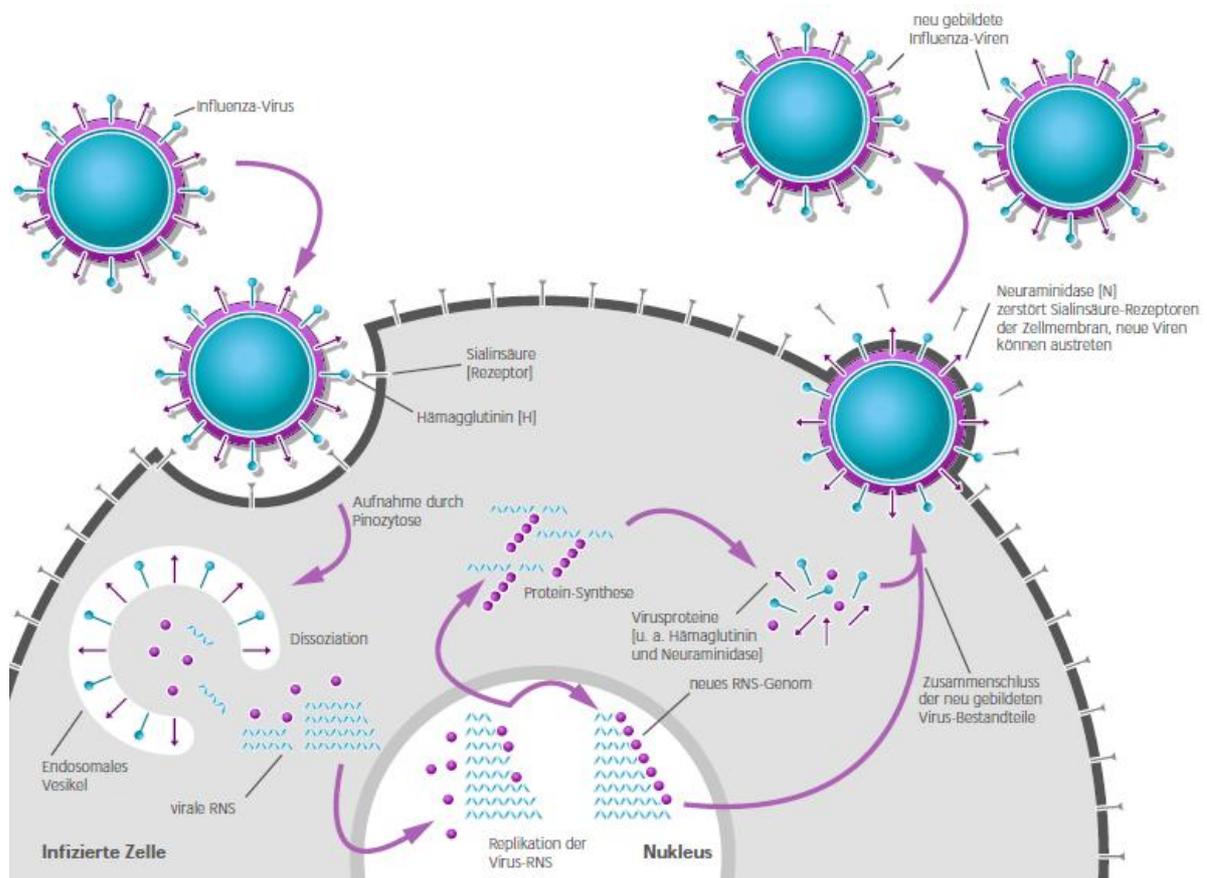


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Replikationszyklus eines Influenza A Virus in einer Zelle (www.grippeinfo.de).

1.1.5.1 Antigenic Drift und Antigenic Shift

Die hohe Mutationsrate im Influenzagenom ist auf die relativ geringe Lesegenauigkeit der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (Replicase) zurück zu führen, welcher zusätzlich auch eine Fehlerkorrekturfunktion (Proofreading, 5'-3'-Endonuclease-Aktivität) fehlt [Poland et al., 2007]. Viele abgeschwächte und nicht-infektiöse Genotypen werden durch konstant auftretende Mutationen erzeugt. Der hohe Selektionsdruck, z.B. durch Antikörper oder suboptimale Zellpermissivität, führt dazu, dass nur Genotypen mit deutlichen Wachstumsvorteilen überleben und sich daraus eine neue Population gegenüber den ‚Elternviren‘ durchsetzen kann [Zambon, 1999].

Eine problematische Eigenschaft von Influenza A Viren sind Punktmutationen, die während der Replikation mit einer Häufigkeit von etwa 10^{-5} [Modrow, 2003] bis 10^{-3} Basen [Poland et al., 2007] auftreten und vor allem die codierenden Genbereiche von HA und NA betreffen. Der daraus resultierende Austausch von AS kann zu einer grundlegenden Änderung in der Sekundär- und Tertiärstruktur der betroffenen Proteine führen [Proenca-Módena, 2007]. Durch die fehlende oder die geringe Kreuz-Reaktivität mit von früheren Infektionen noch vorhandenen Antikörpern kann eine durch Antigen drift entstandene Influenza A Virusvariante in der betroffenen Wirtspopulation Infektionen mit gravierenden Erkrankungen auslösen [Al Fares et al., 2005].

Weltweit auftretende Pandemien wurden in der Regel durch Viren mit multiplen Mutationen oder durch Auftreten des sog. Antigen shift verursacht. Letzteres, sehr seltenes Ereignis, tritt auf, wenn zwei unterschiedliche Influenza A Viren, möglicherweise auch von unterschiedlichen Wirtspezies stammend, gleichzeitig eine Wirtszelle infizieren. Dafür gilt das Schwein als Risikowirt, das heißt als sog. „Mixing vessel“, da es sowohl von humanen als auch von aviären Influenza A Virussubtypen infiziert werden kann [Hampson et al., 2006, Zambon 1999]. Bei der Replikation in zweifach infizierten Zellen kann es zu einer Neukombination ganzer Genomsegmente (Reassortment) kommen. Völlig neue Subtypen können entstehen, deren Partikel gemischte

Genomsegmente von beiden ‚Elternviren‘ enthalten können. Beispielsweise kann so ein „Reassortantenvirus“ volle Virulenz für Menschen zeigen und gleichzeitig ein Oberflächenantigen, z.B. das HA, von einem Tiervirus tragen. Je nach Dynamik seiner Vermehrung und Ausscheidung kann so ein Virus das Potential entwickeln, eine Pandemie auszulösen [Zambon, 1999].

Neben der laborexperimentellen Möglichkeit, ein Reassortantenvirus mit ausgesuchten Gensegmenten durch die *Reverse Genetics*-Technik herzustellen [Parks et al., 2007], ist es auch möglich, dass sich ein Influenza A Reassortantenvirus auf natürliche Weise bildet (Abb.4).

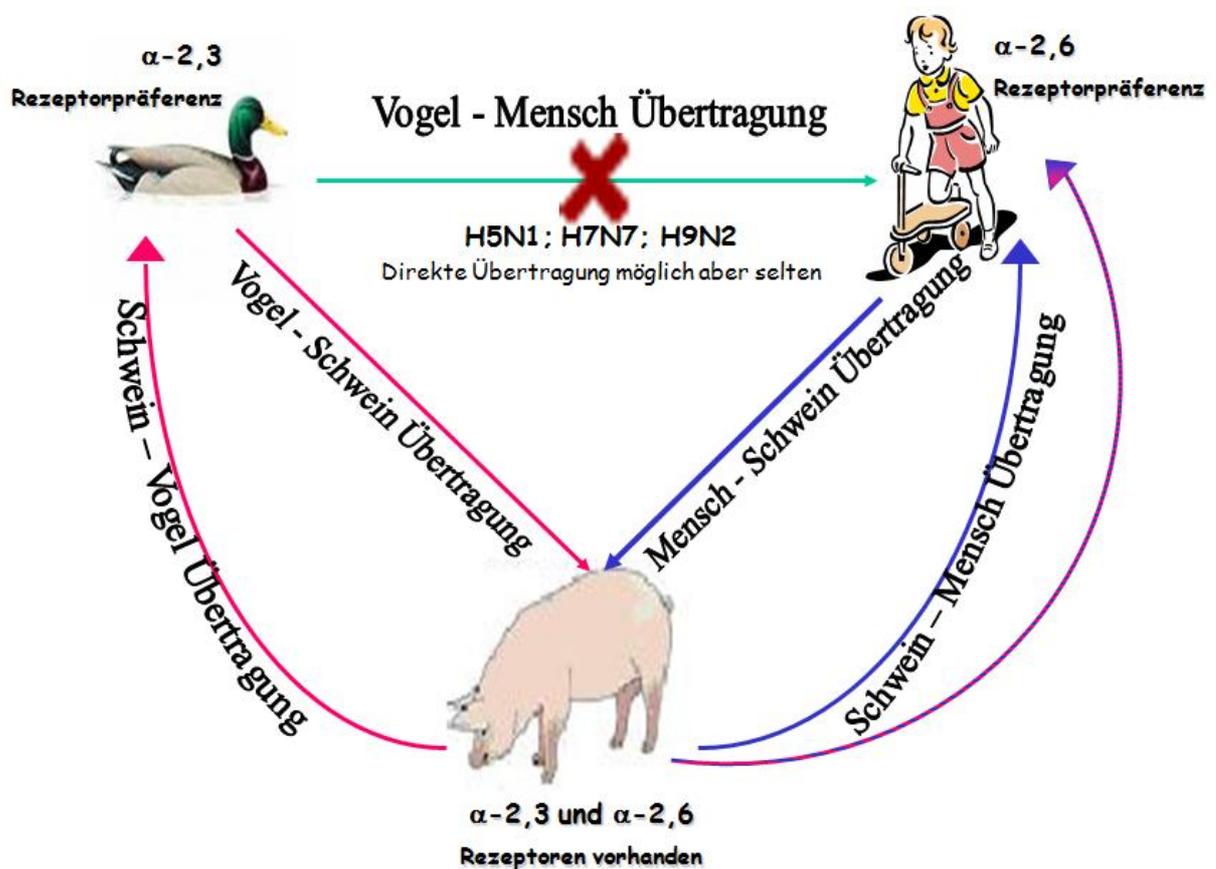


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Übertragungswege von Influenza A Viren über die Speziesbarriere hinweg mit möglicher Reassortantenbildung.

Auf natürlichem Weg entstehen Reassortantenviren nur durch mindestens eine Doppelinfektion mit unterschiedlichen Influenza A Subtypen in einem Wirt. Die häufigsten Doppelinfektionen treten in der Vogelpopulation auf, da dort alle Subtypen einen endemischen Status aufweisen [Nicholson et al., 2003]. Dies kann zur Bildung von neuen Influenza A Subtypen führen, die

überwiegend in der Vogelpopulation zirkulieren. Darüber hinaus ist es möglich, dass ein Reassortantenvirus aus einem aviären und einem nicht-aviären Virussubtyp gebildet wird.

1.1.6 Wirts- und Gewebespezifität

Die natürlichen Wirte für alle Influenza A Viren sind beim Wassergeflügel zu finden, vor allem Anseriformes (u.a. Gänse, Enten, Schwäne) und Charadriiformes (u.a. Möwen und Seeschwalben) sind asymptomatische Virusträger. An diese Wirtstiere konnte sich das Virus über lange Zeit anpassen, so dass es zu einer Koexistenz, eine Art evolutionäres Wirt-Virus-Gleichgewicht, mit diesen Vögeln kam [Louie, 2005]. Somit gibt es für Influenza A Viren, wie für viele andere Viren auch, geeignete Trägerwirte, die für die Sicherung der Virusreplikation und Verbreitung sorgen.

Von seinem natürlichen Trägerwirt (Carrier) kann das Virus jederzeit auf einen neuen Wirt übergehen, sich günstigstenfalls an diesen adaptieren und in der neuen Wirtspopulation einen endemischen Status erreichen. Das Virus wird damit von seinem ursprünglichen Reservoir unabhängig. Allerdings herrscht nicht sofort ein adaptiertes Gleichgewicht. Daher führen solche Infektionen häufig zu unterschiedlich schwerer klinischer Symptomatik. Tabelle 3 zeigt die natürlichen Wirte für alle bekannten HA- und NA-Subtypkomponenten der Influenza A Viren.

Tabelle 3: Hauptwirte der Influenza A Subtypenkomponenten

Hämagglutinin Komponente	Natürlicher Wirt	Natürlicher Wirt	Neuraminidase Komponente
H1	HU, WG, NG, SW	HU, WG, NG, SW	N1
H2	HU, WG, NG	HU, WG, NG, SW	N2
H3	HU, WG, NG, SW, EQ	WG, NG	N3
H4	WG, NG	WG, NG	N4
H5	WG, NG	WG, NG	N5
H6	WG, NG	WG, NG	N6
H7	WG, NG, EQ	WG, NG, EQ	N7
H8	WG, NG	WG, NG, EQ	N8
H9	WG, NG	WG, NG	N9
H10	WG, NG		
H11	WG, NG		
H12	WG, NG		
H13	WG, NG		
H14	WG, NG		
H15	WG, NG		
H16	WG		

HU: humane Influenza A Subtypkomponente

WG: Wassergeflügel

NG: Nutzgeflügel

SW: porcine Influenza A Subtypkomponente

EQ: equine Influenza A Subtypkomponenten, H3N8 auch bei Hunden [Crawford et al., 2005].

Einer der Hauptfaktoren der Wirtsspezifität ist die unterschiedliche Rezeptor-Bindenspezifität des Hämagglutinin [Hampson et al., 2006]. Als Rezeptor für das HA₁-Protein dienen endständige N-Acetyl-Neuraminsäuren auf der Zelloberfläche [Owen et al., 2007]. Die Rezeptorbindestelle auf dem HA₁-Protein wird durch die räumliche Anordnung des homotrimeren HA-Proteins

gegeben, erst dann befinden sich die entsprechenden AS in räumlicher Nähe zueinander. Die Interaktion erfolgt über Wasserstoffbrücken und van-der-Waal'sche-Kräfte [Modrow et al., 2003]. Je nach Art der glykosidischen Bindung der Sialinsäurereste mit der Galaktose werden die Zellrezeptoren eher von aviären oder humanen Influenza A Viren bevorzugt. Humane Influenza A Viren bevorzugen eine α -2,6 Bindung der N-Acetyl-Neuraminsäurereste mit der Galaktose. Diese Rezeptoren findet man in den menschlichen Atemwegen, vor allem in den Epithelzellen der Nasenschleimhaut, des Rachens, der Luftröhre und der Bronchien [Shinya et al., 2006; Baum et al., 1990]. Aviäre Influenza A Viren bevorzugen hingegen eher eine α -2,3 Bindung der N-Acetyl-Neuraminsäurereste mit der Galaktose [Harder et al., 2006]. Jedoch reicht z.T. schon der Austausch einer einzigen Aminosäure in der Rezeptorbinderegion aus, um die Bindungspräferenz soweit zu ändern, dass ein primär an aviäre Rezeptoren bindendes Virus nun auch an humane Zellrezeptoren binden kann [Matrosovich et al., 1997; Naeve et al., 1984]. Das humane Lungengewebe ist durchaus für AIV empfänglich. Da sich die entsprechenden Rezeptoren aber in den unteren Regionen des Respirationstraktes, und dort vor allem an nicht-bewimperten Zellen, befinden, können die dort replizierten Viren nur sehr schwer ausgeschieden werden. Dem gegenüber können humane Influenza A Viren, welche in den oberen Regionen des Respirationstraktes replizierten, sehr leicht durch Niesen und Husten ausgeschieden und verteilt werden [Shinya et al., 2006]. Schweine und Pferde sind für AIV empfänglich, da bei ihnen, wie bei den Vögeln, die N-Acetyl-Neuraminsäure α -2,3 mit der Galaktose verknüpft ist [Vahlenkamp et al., 2006]. Neben der von AIV bevorzugten α -2,3 Bindung der N-Acetyl-Neuraminsäure mit der Galaktose exprimieren Schweine auch die von porcinen und humanen Influenza A Viren bevorzugte α -2,6 Bindung der N-Acetyl-Neuraminsäure mit der Galaktose [Ito et al., 1998]. Somit können Schweine simultan von aviären und nicht-aviären Influenza A Viren infiziert werden, in deren Infektionsverlauf beide Viren repliziert werden [Hampson et al., 2006; Zambon, 1999]. Die Replikation von AIV im Schwein kann zu einer

Verschiebung der Bindungspräferenz hin zu α -2,6 Bindung der N-Acetyl-Neuraminsäure mit der Galaktose führen. Daher wird das Schwein als eine Art Zwischenwirt für die Bildung von humanen Pandemieviren angesehen [Bateman et al., 2008].

1.1.7 Immunreaktionen

Zu Beginn der Infektion reagiert das angeborene Immunsystem (innate immunity) über die Erkennung sog. PAMPs (pathogen associated molecular pattern) durch dendritische Zellen und Makrophagen [Si-Tahar et al., 2009]. Durch die Erkennung des Pathogens durch membranständige, keimbahnkodierte Rezeptoren kommt es zur Phagozytose, einem aktiven Prozess, bei dem das gebundene Pathogen zuerst von der Membran des Phagozyten (dendritische Zellen, Makrophagen) umhüllt und anschließend in einem Vesikel, Phagosom, aufgenommen wird. Durch die Ansäuerung des Phagosoms durch Lysosome wird dessen Inhalt mittels Enzyme und weiterer toxischen Substanzen zerstört und abgetötet. Dendritische Zellen sind primär nicht dazu da, die Krankheitserreger zu zerstören, sondern viel mehr besteht ihre Aufgabe darin, die Antigene von Pathogenen zu den peripheren Lymphknoten zu transportieren und dort den T-Lymphozyten zu präsentieren. Intravesikuläre Antigene, z.B. durch Phagozytose aufgenommene kleine virale Partikel oder in den Phagosomen abgetötete und prozessierte Pathogene, binden an MHC-II-Moleküle und werden mit diesen an der Zelloberfläche präsentiert [Janeway et al, 2005].

Darüber hinaus sezernieren sie eine Reihe antiviral und regulativ wirkender Zytokine, u.a. die Interleukine (IL) IL-1, IL-6 und IL-8, sowie die Interferone (IFN) IFN- α , IFN- β und IFN- γ . Influenza A Viren induzieren verstärkt die Synthese von IFN- α und IFN- β [Marcus et al., 2005]. Diese sind bereits kurze Zeit (~2-24h) nach der Infektion nachweisbar und induzieren einen antiviralen Status sowohl in bereits betroffenen, als auch in nicht-infizierten Zellen. Darüber hinaus aktivieren sie Natürliche Killer (NK)-Zellen, welche MHC-

unabhängig die Erkennung und effiziente Lyse infizierter Zellen durchführen können [Jewell et al., 2007, Chávez-Galán et al., 2009].

Während einer Influenza Infektion kommt es durch die Bindung von RIG-1 [Loo et al., 2008] an dsRNA viralen Ursprungs und viraler ssRNA ohne 5'-Cap-Struktur zur Konformationsänderung von RIG-1. Dies führt zur Initiation multipler Signalwege, welche u.a. die Expression von IFN und inflammatorischer Zytokine steigert [Yoneyama et al., 2004].

Das von infizierten Zellen sekretierte IFN steigert die antivirale Immunantwort indem es an membranständige IFN-Rezeptoren anderer Zellen bindet. Dadurch werden verstärkt antivirale Substanzen gebildet, welche wiederum die angeborene Immunantwort stimulieren und somit das Immunsystem gegenüber der viralen Infektion in Alarmbereitschaft setzen [Gongora et al., 1999].

Allerdings besitzen Influenza A Viren mit dem NS1-Protein einen wirksamen Mechanismus, um die Typ-I-IFN-Wirkung zu unterbinden [Zamarin et al., 2009, Solórzano et al., 2005, Hays et al., 2009]. Das virale NS1 Protein ist ein starker Virulenzfaktor, indem es das Vorhandensein der Influenza Viren maskiert und die Immunantwort durch mehrere Mechanismen unterdrückt [Fernandez-Sesma, 2007; García-Sastre et al., 1998; Hale et al., 2008]. NS1 bindet an den RIG-1/IPS-1 Komplex [Guo et al., 2006; Mibayashi et al., 2006; Opitz et al., 2007] und blockiert die downstream Signale. Dies resultiert in einer verringerten Expression von Typ1 IFN und inflammatorischer Zytokine. Darüber hinaus kann NS1 die Prozessierung zellulärer mRNA und den Nukleus-Zytoplasma-Transport unterbrechen, indem es an den zellulären mRNA-Prozessierungsfaktor (CPSF) bindet und somit die zelluläre Proteinsynthese auf einem post-transkriptionellen Level beendet [Chen et al., 1999; Kochs et al., 2007; Nemeroff et al., 2003; Noah et al., 2003].

Die Kontrolle der Virusinfektion durch adaptive Immunreaktionen erfolgt vor allem durch neutralisierende Antikörper und zytotoxische T-Zellen (Cytotoxic T-lymphocytes, CTL). Virusspezifische CD4⁺-Zellen induzieren und verstärken die humorale Immunantwort und die Bildung von neutralisierenden AK, die vor

allein gegen das HA gerichtet sind [Martinez et al., 2006]. Diese schützen lebenslang effektiv vor einer erneuten Infektion mit dem gleichen Virusstamm, ebenso wie IgA₁-AK von Nasenschleimhautzellen vor einer Reinfektion mit dem bereits im Organismus befindlichen Virus schützen [Bizanov et al., 2005]. AK gegen NA hingegen reduzieren die Ausbreitung im Körper, schützen aber nicht vor einer Infektion an sich [Hampson et al., 2006].

Durch die Vermehrung des Virus im Zytosol der infizierten Zelle kommt es zur Bindung viraler Peptidfragmente an MHC-I-Moleküle, die so beladen an der Zelloberfläche präsentiert werden. Inaktivierte Impfstoffe führen zwar zu einer Schutzwirkung, diese beruht aber vor allem auf der Bildung von Antikörpern gegen die Oberflächenproteine HA und NA und der Bildung von CD4⁺-T-Zellen. Durch das Fehlen der aktiven Vermehrung der Impfviren erfolgt die Präsentation der viralen Peptidfragmente ausschließlich in MHC-II-Molekülen. Die für die Bildung von CD8⁺-CTLs notwendige Präsentation der viralen Peptidfragmente in Kombination mit MHC-I-Molekülen bleibt aus.

Die Expression von MHC-I-Molekülen wird durch IFN- γ zusätzlich erhöht [Uetani et al., 2008]. Dies führt zu einer verbesserten Erkennung und Eliminierung infizierter Zellen durch CTL, da diese Antigene (AG) nur in Verbindung mit MHC-I-Molekülen erkennen. Nach Erkennung des Liganden und des AG auf der Zielzelle kommt es zu einer kurzen stabilen Paarung und gezielter Freisetzung von Effektormolekülen, wie z.B. Perforine und Granzyme. Perforine bilden Poren in der Zellmembran, Granzyme lösen den programmierten Zelltod aus, wobei die dabei aktivierten Nukleasen auch virale DNA/RNA zerstören und somit verhindern, dass bereits fertige oder halbfertige Viren freigesetzt werden und andere Zellen infizieren können [Pardo et al., 2009].

Influenza A Viren mit einer HPAI-Schnittstelle können von nahezu jeder Protease aktiviert werden [Hampson et al., 2006], wodurch sie nicht auf ein Gewebe restringiert bleiben und somit jedes Organ infizieren können. Durch diesen Umstand ist es den Viren möglich, sich innerhalb kurzer Zeit sehr stark zu vermehren und den infizierten Organismus mit Nachkommenviren zu

überschütten. Das Immunsystem kann dieser Menge an zu eliminierenden Viren und infizierten Zellen nicht mehr Herr werden, es kommt zu einer generalisierten Infektion [Hampson et al., 2006].

Influenza A Viren mit einer LPAI-Schnittstelle sind vor allem auf den Respirationstrakt beschränkt, in dem nur Trypsin-ähnliche Proteasen das Hämagglutinin spalten und somit das Virus aktivieren können [Hampson et al., 2006].

1.1.7.1 Impfung gegen Influenza A Viren bei Nutztieren

Die Impfung gegen Influenza A Viren ist bei Schweinen bivalent und gegen H3N2 und H1N1 gerichtet [Vahlenkamp et al., 2006]. Da Schweine ein ausgeprägtes Sozialverhalten haben und in engem Kontakt zueinander leben, kann sich eine Influenza A Virusinfektion sehr schnell in einem Bestand ausbreiten. Daher wäre eine vollständige Vaccinierung der gesamten Population von Nöten. Dies ist aber aus praktischer und ökonomischer Sicht nur sehr schwierig durchzuführen [Vahlenkamp et al., 2006].

Die Einschleppung von Influenza A Viren in einen Nutzgeflügelbestand führen zur Keulung des selbigen. Um einen falsch-positiven Befund auszuschließen, herrscht EUweit ein Impfverbot [BGBl, 2007] und wer impft, darf seine Tiere nicht mehr exportieren. Eine Ausnahmegenehmigung kann jedoch erteilt werden. Eine Impfung führt zu einer Reduzierung der Virusausscheidung und einer Verringerung der klinischen Symptome [Van der Goot et al., 2005]. Allerdings kann eine Virusausscheidung nicht komplett vermieden werden [Van der Goot et al., 2006]. Dies führt zu einer unkontrollierten Ausbreitung in der Geflügelpopulation, da geimpfte aber infizierte Tiere keine klinischen Symptome zeigen [Bruschke et al., 2007]. Mittels des DIVA- (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) Prinzips soll eine Unterscheidung zwischen infizierten und geimpften Tieren möglich werden. Dabei unterscheiden sich das Impfvirus und das Feldvirus z.B. im Neuraminidase-Subtyp. So kann ein geimpftes aber infiziertes Tier identifiziert werden und mittels weiterer Maßnahmen, wie z.B. Tötung aller Feldvirus infizierter Tiere, eine weitere Ausbreitung verhindert werden. Allerdings führt eine Änderung des NA-

Subtypes bzw. das Auftreten mehrerer Feldviren mit unterschiedlichen NA-Subtypen zu Problemen, wenn sich Feld- und Impfvirus darin nicht mehr über den NA-Subtyp unterscheiden lassen [Capua et al., 2004].

Pferde erhalten durch inaktivierte Vaccinien oder Spaltvaccinien einen kurzzeitigen Antikörper-induzierten Schutz vor einer Infektion durch equine Influenza A Viren [Paillot et al., 2008]. Alternative Impfstrategien umfassen den Einsatz von ‚immune-stimulating complex (ISCOM)-based vaccines‘ [Sjolander et al., 1998]. Diese ISCOM-Impfstoffe imitieren den Langzeitschutz, der durch eine natürliche Infektion mit dem Virus induziert wird. Geimpfte Tiere zeigten nach der zweiten Immunisierung nur geringe klinische Erscheinungen und keine Virusausscheidung.

1.2 Aviäre Influenza in verschiedenen Wirtsspezies

Infektionen mit aviären Influenza A Viren (AIV) verlaufen bei vielen Wildvögeln in der Regel klinisch inapparent. Selbst die potentiell hochpathogenen H5 und H7 Subtypen verursachten in der Wildvogelpopulation selten ernsthafte Erkrankungen mit Todesfolge [Webster et al., 2007], bis es 1997 zu einer Änderung dieser Situation kam. Ein aus Asien stammender hoch pathogener H5N1 Subtyp verursachte zuerst in Asien, dann in Europa und Afrika, vermehrt Todesfälle bei Schwänen, Enten und Gänsen [Sturm-Ramirez et al., 2004]. Dieses Virus erlangte schließlich speziesübergreifendes Infektionspotential.

1.2.1 Im Menschen

Der erste Fall von aviärer Influenza im Menschen wurde 1997 aus Hong Kong gemeldet. 18 Menschen infizierten sich mit einem H5N1 Subtyp, sechs davon starben [Conly, 2004]. Tabelle 4 zeigt die wichtigsten aviären Influenza A Subtypen im Menschen.

Tabelle 4: Aviäre Influenza A Virusinfektionen im Menschen

Subtyp	Auftreten	Erkrankte / Todesfälle
H5N1	1997, Hong Kong → A/Hong Kong/97 H5N1	18 / 6
	2003, Hong Kong → A/Hong Kong/213/03, H5N1	2 / 1
	Fälle weltweit gesamt (19.06.08, WHO)	385 / 246
H9N2	1998, Guandong, China	9 / 0
	1999, Hong Kong → A/Hong Kong/99 H9N2	2 / 0
H7N7	1980, Cape Cod, USA → A/Seal/Mass/1/1980 H7N7	4 / 0
	2003, Netherlands → A/Netherlands/219/2003 H7N7	86 / 1

Es konnte gezeigt werden, dass A/Hong Kong/97 seinen genetischen Ursprung allein im Vogel hat und nicht aus einem Reassortment von aviären und humanen Influenza A Viren hervorgegangen ist [Claas et al., 2003].

Die nächsten Fälle von H5N1 beim Menschen traten erst wieder 2003 auf. Allerdings handelte es sich 1997 und 2003 nicht um die gleichen Viren [Nicholson et al., 2003]. Das 1997 aufgetretene Virus wies noch zahlreiche Eigenschaften von Influenza A Viren von Wasserwildgeflügel auf. Dies zeigte, dass ein Influenza A Virus des Wassergeflügels ohne vorherige Anpassung an Land-/ Hausgeflügel im Menschen replizieren kann [Shinya et al., 2006]. Seit diesem Zeitpunkt wurden Fälle von H5N1 bei Haus- und Nutzgeflügel in zahlreichen Ländern in Asien, Europa und Afrika nachgewiesen. Nach dem Auftreten von H5N1-Infektionen im Menschen führte eine verstärkte Überwachung seit 1998 zur Entdeckung von neun humanen Infektionen mit dem Subtyp H9N2 in der Provinz von Guangdong, China. 1999 wurden zwei weitere Fälle bei Kindern aus Hong Kong gemeldet [Nicholson et al., 2003]. Keinerlei serologische Anzeichen einer Infektion im nahen Umfeld der Kinder

wiesen wie bei H5N1 darauf hin, dass Übertragungen von Mensch zu Mensch vorlagen [Conly et al., 2004]. Dennoch besteht nach wie vor die begründete Gefahr, dass es erneut zu einer Übertragung von AIV vom Subtyp H9N2 auf den Menschen kommt, da es zahlreiche H9N2 Genotypen gibt, welche sowohl die für AIV typische α -2,3 Rezeptorbindungspräferenz, als auch die von humanen und porcinen Influenza A Viren bevorzugte α -2,6 Bindung der N-Acetyl-Neuraminsäure mit der Galaktose als Rezeptor aufweisen [Matrosovich et al., 2001; Choi et al., 2004; Nagarajan et al., 2009].

Als dritter aviärer Influenza A Virussubtyp führte H7N7 zu Infektionen im Menschen. 1980 zeigten vier Personen eine eitrige Konjunktivitis nach Kontakt mit toten Seehunden, die an einer Infektion mit A/Seal/Mass/1/80 H7N7 gestorben waren [Webster et al., 1981].

Zwischen Ende Februar und Ende Mai 2003 gab es in den Niederlanden einen Ausbruch von Geflügelpest mit einem Influenza A Virus des Subtypes H7N7, in dessen Verlauf es zu einem schweren Fall von „acute respiratory distress syndrome“ mit Todesfolge kam. Das Virus hatte große Ähnlichkeiten zu einem LPAI H7N7, welches aus Wildenten isoliert worden war [Fouchier et al., 2004]. Das Virusgenom wurde bei 86 Personen nachgewiesen. Das Virusisolat, welches den Tod eines Tierarztes verursachte, unterschied sich an 14 AS-Positionen von den anderen Virusisolaten. Der Austausch von Glutaminsäure (E) durch Lysin (K) an Position 627 im PB2-Protein (PB2_{-E627K}) schien eine entscheidende Rolle zu spielen und könnte unter Beihilfe einer oder weniger Aminosäure-Austausche im HA-Protein den besonders schweren Infektionsverlauf erklären [Fouchier et al., 2003; Munster et al., 2007].

1.2.1.1 Therapie

Gängige Therapeutika bei einer Influenza A Virusinfektion sind Amantadin bzw. Rimantadin. Beide werden sowohl als Prophylaxe als auch in der Behandlung eingesetzt. Es handelt sich bei beiden Substanzen um trizyklische, primäre Amine, welche die Virusreplikation im Stadium der Partikelaufnahme und Freisetzung der Nukleokapside im Zytoplasma

hemmen. Angriffspunkt ist dabei das M2-Protein. Auf Grund der schnellen Entstehung von Resistenzen bleibt die Behandlung mit Amantadin und Rimantadin Hochrisikogruppen vorbehalten. Dennoch haben mittlerweile 96% der zirkulierenden H3N2 Virusstämme eine Resistenz gegenüber Amantadin und Rimantadin entwickelt [Deyde et al., 2007].

Andere Behandlungsansätze umfassen die Gabe von Neuraminidasehemmern wie z.B. Oseltamivir (Tamiflu®) und Zanamivir (Relenza®). Diese Substanzen dienen dazu, die Ausbreitung der Viren im Wirt zu vermindern, ein Schutz vor einer Infektion wird dadurch nicht gewährleistet. Indikationen für die Gabe von Oseltamivir und Zanamivir sind eine eindeutige Exposition von Influenza A Viren, ein frühes Erkennen der Infektion (die Gabe sollte spätestens 48h nach dem Auftreten der ersten Symptome erfolgen) oder wenn eine Impfung aus gesundheitlichen Gründen nicht ratsam ist [Fiore et al., 2007].

Impfstoffe gegen Influenza A Viren werden den jährlich zirkulierenden Stämmen angepasst und in bebrüteten Hühnereiern hergestellt. In der Regel enthalten sie drei Komponenten: einen H3N2 und einen H1N1 Subtyp sowie den zirkulierenden Influenza B Stamm [Gerdil et al., 2003, Sasaki et al., 2008, Paul-Ehrlich-Institut, 2009]. Personen, welche einmal einem Influenza A Virus ausgesetzt waren, sind immunologisch ‚geprimed‘, d.h. bei einer erneuten Infektion mit dem gleichen Subtyp kann ihr Immunsystem schneller reagieren und der Krankheitsverlauf ist deutlich schwächer. Auch eine gewisse Kreuzimmunität zwischen den Subtypen ist vorhanden [Epstein et al., 2006].

1.2.2 In anderen empfänglichen Wirten

Natürliche Influenza A Virusinfektionen bei Säugern treten neben dem Menschen noch bei Schweinen, Pferden und Meeressäugern (Wale und Seehunde), sowie bei Nerzen auf. 1930 erfolgte aus dem Schwein die erste Isolierung eines Influenza A Virus (A/Swine/Iowa/1930 H1N1). Diverse Subtypen zirkulieren in der Schweinepopulation, wobei sich in Europa und in den USA unterschiedliche Linien durchgesetzt haben [Heinen, 2003; Olsen, 2002]. Die Virusausscheidung dauert weniger als eine Woche, die

Übertragung verläuft über Tröpfcheninfektion oder direkten Kontakt. Alle porcinen Influenza A Virusstämme sind mit einem Krankheitsgeschehen assoziiert und es scheinen keine Unterschiede in der Virulenz der porcinen Influenza A Virusstämme zu geben. Dennoch sind subklinische Infektionen sehr verbreitet und ein Großteil der Schweine infiziert sich mit einem oder mehreren Influenza A Virusstämmen ohne klinische Symptome zu zeigen [Van Reeth et al., 2007]. Influenza A Virusinfektionen in Pferden erfolgen hauptsächlich durch zwei Subtypen, wobei sich, wie bei den Schweinen, zwei Linien durchgesetzt haben: H7N7 in Europa (A/equi-1 von 1956) und H3N8 in den USA (A/equi-2 von 1963). *Equidae* galten lange als sog. Dead-End-Wirte, da H3N8 Viren der Pferdeline in keinem anderen Wirt entdeckt wurden. Allerdings konnte inzwischen eine natürliche Infektion von Greyhound-Hunden mit H3N8 nachgewiesen werden, welche in Kontakt mit Virus-ausscheidenden Rennpferden standen [Crawford et al., 2005].

Experimentelle AIV Infektionen bei Schweinen und Pferden führen meist zu schweren Erkrankungen mit einer massiven Virusreplikation und Entzündungen in Epithelzellen des Respirationstraktes und dem Auftreten allgemeiner grippaler Krankheitssymptome. Die Virusausscheidung beginnt zwischen 18-72 h nach der Infektion. Virusausscheidungen, die nicht über den Respirationstrakt erfolgen sind ausgesprochen selten. Eine Genesung mit vollständiger Kontrolle der Infektion (Viruseliminierung) erfolgt in der Regel nach 7-10 Tagen [Van Reeth et al., 2007].

1.3 Pathogenität/Virulenz als Multi-Gen Ereignis

Da an der Replikation und der Virulenz pathogener Influenza A Viren mehrere Gene beteiligt sind, kann keinem Gen bzw. keinem Protein die entscheidende Rolle, einzig und allein die Ursache für Replikationseffizienz, die Pathogenität, das Wirtsspektrum oder die Virulenz zu sein, zugeteilt werden. Innerhalb einer Wirtsspezies und im infizierten Individuum gibt es zahlreiche Genomabschnitte eines zirkulierenden Influenza A Virus, die eine wichtige Rolle für die

Replikationseffizienz und die Virulenz spielen. So ist die viel beschriebene Spaltstelle des Hämagglutinin (HA) [Stech et al., 2005; Horimoto et al., 1995; Löndt et al., 2008] bei den nach Geflügelpestverordnung als besonders gefährlich genannten H5- und H7-Subtyp-Komponenten ausschlaggebend für die Definition der Virulenz als HPAI- und LPAI-Viren [Senne et al., 2006]. Darüber hinaus ist diese Spaltstelle auch mitverantwortlich dafür, ob die Infektion lokal auf den Gastro-Intestinaltrakt restringiert bleibt, oder ob es zu einem generalisierten Infektionsverlauf kommt [Pasick et al., 2005].

Außerdem spielt das HA auch für die Wirtsspezifität eine entscheidende Rolle [Hampson et al., 2006]. So kann der Austausch weniger oder sogar nur einer AS die Wirtsspezifität soweit verändern, dass aviäre Influenza A Viren nicht mehr nur an ihre bevorzugten Zellrezeptoren binden sondern nun auch humane Zellrezeptoren zum Andocken an die Zelle benutzen können. Jedoch können auch Influenza A Viren mit identischer HA-Sequenz eine unterschiedliche Infektiosität und Virulenz für Säuger aufweisen [Li et al., 2006; Jiao et al., 2008]. Die Neuraminidase ist das zweite bedeutende Virusoberflächenprotein. Hier kann der Austausch von AS einerseits die Neurovirulenz beeinflussen [Ward, 1995], oder andererseits Resistenzen gegen die momentan auf dem Markt befindlichen Influenza-Medikamente fördern [Wang et al., 2002; De Jong et al., 2005]. Darüber hinaus gibt es auch zahlreiche Genomabschnitte, die Virusproteine mit Einfluss auf das Wirtsspektrum kodieren. Die AS 627 im PB2-Protein spielt z.B. eine entscheidende Rolle in der Wirtsspezifität. Die Änderung von Glutaminsäure zu Lysin führt dazu, dass ein aviäres Influenza A Virus auch in Säugerzellen replizieren kann [Subbarao et al., 1993]. Die Mutation der AS an Position 701 im PB2-Protein ist ebenfalls mitverantwortlich dafür, dass H5N1-Viren mit Enten als originärem Wirt auch in der Maus mit tödlichem Verlauf replizieren können [Li et al., 2005].

Ein hypervariables immundominantes Epitop im Bereich der AS 418-426 des Nukleoproteins kann, abhängig von der AS-Sequenz, besser oder schlechter von zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt werden [Boon et al., 2006]. Somit

hat es Einfluss auf die Immunantwort und dadurch auf die Viruselimination in befallenen Wirtszellen.

Das M2-Protein spielt ebenfalls eine wichtige Rolle im Infektionszyklus und ist somit ein weiterer Angriffspunkt für Influenza-Medikamente, wie z.B. Amantadin und Rimantadin. Durch Mutationen in der hydrophoben Transmembranregion des M2 können jedoch sehr schnell Influenza A Virusstämme entstehen, die gegenüber Amantadin und Rimantadin resistent sind [Deyde et al., 2007].

AS-Austausche im NS1-Protein können zu einem dramatischen Anstieg der Virulenz von H5N1 Isolaten in Mäusen führen [Jiao et al., 2008]. Auch sind NS1-Proteine am Unterlaufen des Immunsystems der Wirtszelle beteiligt und wirken als Interferon-Antagonist [Krug et al., 2003]. Darüber hinaus führt eine Glutaminsäure (E) an Position 92 im NS1-Protein zur Ausbildung von Resistenzen gegenüber antiviralen Zytokinen im Schwein [Seo et al., 2002].

1.4 Zielsetzung

Influenza A Viren aviären Ursprungs haben große Bedeutung als Zoonoseerreger und haben auf Grund des Seuchenzuges des asiatischen H5N1-Subtyps sowohl aus gesundheitlicher als auch aus wirtschaftlicher Sicht eine zentrale Rolle in der infektionsmedizinischen Forschung eingenommen. Mit der vorliegenden Arbeit sollen biologische, immunologische und molekulare Eigenschaften von ausgewählten aviären Influenza A Virus Subtypen aus Stockenten vergleichend untersucht werden.

Zwei als hochpathogen (HPAI) charakterisierte Viren vom asiatischen Subtyp H5N1, A/Mallard/Bavaria/1/2006 H5N1 und A/Mallard/Bavaria/10/2007 H5N1, wurden für vergleichende Analysen ausgewählt da sie sich nach der diagnostischen Abklärung in der Hämagglutinin-Schnittstelle nur in einer Aminosäure unterscheiden und bei einem Virusisolat offensichtlich ein limitiertes, altersabhängiges Krankheitsgeschehen vorlag. Als Vertreter der in der Geflügelpestverordnung (Geflügelpestverordnung Bibl. I Nr. 51 vom

22.10.2007 S.2348) aufgeführten AIV mit H5 Komponente wurde das Virusisolat A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2 in die Untersuchung einbezogen, obwohl es nach der HA-Schnittstelle als LPAI einzustufen war. AIV vom H5N2 Subtyp haben in der Vergangenheit durch genetische Veränderungen nach Serienpassagen in Nutzgeflügel eine Virulenzsteigerung und Wandlung zu HPAI erfahren [Lee et al., 2005; Okamoto et al., 2007; Gaidet et al., 2008]. Dies wurde bislang in der Maus als Säugermodell noch nicht geprüft. Ein weiteres als LPAI eingestuftes Virusisolat A/Mallard/Bavaria/3/2006 H10N7, welches nach den einschlägigen Tierseuchenregularien keiner Risikogruppe (weder H5 noch H7 HA-Komponente) zugeordnet ist, sollte als Repräsentant der schwach pathogenen Subtypen vergleichend untersucht werden. Nach der diagnostischen Abklärung sollte für diese selektierten AIV zunächst eine Vermehrung im bebrüteten Hühnerei erfolgen, um ausreichend Virusmaterial für weitere *in vitro* und *in vivo* Experimente zur Verfügung zu haben. Die genaue molekulare Subtypisierung der gewählten AIV-Isolate, sowie die Charakterisierung einzelner Virulenzfaktor-kodierender Genbereiche sollten mit effizienten und schnellen Methoden (z.B. multiplex real-time RT-PCR) durchführbar sein. Mit Viruskonzentrat aus der Eivermehrung sollten *in vitro* verschiedene Zellen infiziert werden, um eine permissive oder abortive Situation und Unterschiede in der Virusvermehrung zu klären. Die Pathogenität für die BALB/c Maus sollte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Immunologie des Friedrich Löffler Instituts (FLI) in Tübingen untersucht werden. Ferner sollte getestet werden, ob sich das als schwach pathogen eingestufte H5N2 Isolat in der Maus, auch nach Blindpassagen, avirulent verhält. Klinische Erscheinungen bei infizierten Tieren waren zu kontrollieren und ferner sollte eine Virus-Reisolation versucht werden. In diesem Zusammenhang galt es auch, eine heterologe Schutzfunktion gegen die Infektion mit einem Mäuse-adaptierten virulenten Belastungsstamm (A/FPV/Bratislava/79 H7N7) zu prüfen.

Schweine gelten als Reservoir für AIV Reassortment und als Quelle für potentiell humanpathogene Influenza A Viren. Nachdem experimentelle

Infektionen mit Influenza A Viren vom Subtyp H5N1 bisher im Schwein klinisch inapparent oder nur mit milden Symptomen verlaufen sind, war zu klären, ob und welche Immunreaktionen beim Schwein unter Umgehung der natürlichen Eintrittspforten durch intramuskuläre Immunisierung mit inaktiviertem AIV der Subtypen H5N1 und H7N2 auftreten. Dies sollte durch einen Impfversuch mit naiven Ferkeln und adulten Schweinen getestet werden.

2 MATERIAL

2.1 Zelllinien

Caco-2 – Zellen	ATCC® Nr. HTB-37
CRFK – Zellen	ATCC® Nr. CCL-94
MDBK – Zellen	ATCC® Nr. CCL-22
MDCK – Zellen	ATCC® Nr. CCL-34
MA-104 – Zellen	ATCC® Nr. CRL-2378.1
PK-15 – Zellen	ATCC® Nr. CCL-33

2.2 Standardmedien

Minimal Essential Medium mit Earls Salzen (MEM Earls)	Gibco
RPMI mit stabilem L-Glutamin	PAA
Dulbecco's MEM (DMEM)	PAA

2.3 Nukleinsäuren und Oligonukleotide

2.3.1 Nukleinsäuren

DNA 100 bp Größenmarker	Invitrogen
DNA 50 bp Größenmarker	Invitrogen

2.3.2 Oligonukleotide

Name	Primer – Sequenz	Segment/ Subtyp
INF-1	5' – AAA GCA GGG GTC TGA TCT – 3'	Segment 4 H5
INF-2	5' – TTC TTT TTG ATA AGC CAT A – 3'	
INF-3	5' – GTG AGC TCA GCA TGT CC – 3'	
INF-4	5' – ATG GTG AGR GGG TGT AT – 3'	
INF-5	5' – ACC AAG TGT CAA ACT CCA – 3'	
INF-6	5' – TCG GAC CTT GTC GTA AAG – 3'	
INF-7	5' – GAT GTC TGG ACT TAY AAT – 3'	
INF-8	5' – ACA ATC TGA ACT CAC AAA T – 3'	
INF-9	5' – AGC AAA AGC AGG AGT GAA – 3'	Segment 6 N2
INF-10	5' – ATG AAA TGG AAC ACC CAA – 3'	
INF-11	5' – TGA CAC ART ACA TGA TAG – 3'	
INF-12	5' – TGG AAW CAA TGC TAT AAT – 3'	
INF-13	5' – CTG CAG AGA CAA CTG GAA – 3'	
INF-14	5' – TTC TAA AAT TGC GAA AGC – 3'	
INF-15	5' – CAG GGG ATA ATT CTA TYA A – 3'	Segment 4 H3
INF-16	5' – TAA GGR TAR CAR TTG CTG – 3'	
INF-17	5' – YTG CAC AYT RAT AGA TGC – 3'	
INF-18	5' – CAT TAY HGA GCT TTT CCC – 3'	
INF-19	5' – ATA AGC ATM TAY TGG AC – 3'	
INF-20	5' – CAT TTG TGG TAW ATY TTG A – 3'	
INF-21	5' – GAA ATA YTG HGA RGA CAC – 3'	
INF-22	5' – AGT AGA AAC AAG GGT GTT – 3'	
INF-23	5' – CAA AAG CAG GAG TTY AAA – 3'	Segment 6 N1
INF-24	5' – CAW GCR CTT GCY GAC CA – 3'	
INF-25	5' – TGA CAA RCA YTC HAA TGG – 3'	
INF-26	5' – ATT DGG RTC CCA AAT CAT – 3'	
INF-27	5' – GGA TAY ATM TGC AGY GG – 3'	
INF-28	5' – AGT AGA AAC AAG GAG TTT – 3'	
INF-29	5' – AAA AGC AGG GGA TAC GAA – 3'	Segment 4 H7
INF-30	5' – CAY TTC ATC TCT GCA TAG AA – 3'	
INF-31	5' – TTC ACM TAY AGY GGA ATA AG – 3'	
INF-32	5' – TGA TGY CTG AAR CCA TAC CA – 3'	
INF-33	5' – TTC AAT GGG GCW TTC ATA GC – 3'	
INF-34	5' – TTC CTT ATR CTS KCC ATT CA – 3'	
INF-35	5' – TAG CAA TGG AGA ATC AGC A – 3'	
INF-36	5' – AGT AGA GAA ACA AGG GTG TT – 3'	

INF-37	5' – AGC AAA AGC AGG GGT CAC AA – 3'	Segment 4 H10
INF-38	5' – CAY TTK AGY TCY GCA TAG AA – 3'	
INF-39	5' – GGG ATT GAC AAG ATA AGC AC – 3'	
INF-40	5' – GAW AGA TTY TGA AAA GGG AG – 3'	
INF-41	5' – AAY GGY GGA YTA ATA GCA CC – 3'	
INF-42	5' – TCT GAA TCA GCC ATG TCA AT – 3'	
INF-43	5' – ATA GAA TCT GAR TTG AGT GA – 3'	
INF-44	5' – AGT AGA AAC AAG GGT GTT TT – 3'	
INF-45	5' – AGC AAA AGC AGG GTG GTT GA – 3'	Segment 6 N7
INF-46	5' – CKW CCR ATR CCG TCA TGG CA – 3'	
INF-47	5' – GAT TYG GKG AAA GTG AAC AA – 3'	
INF-48	5' – TTC AAC ATY TCR AAW CCA CT – 3'	
INF-49	5' – GCC AGR CAY ATW GAG AAT G – 3'	
INF-50	5' – AGT AGA AAC AAG GGT GTT T – 3'	
NP1094-for.	5' – ATT GCT TCA AAT GAG AAC A – 3'	
NP1360-rev.	5' – CTG GAA WGA CAC ATC TTC – 3'	
PB2-1594-for.	5' – TCA TCR TCA ATG ATG TGG – 3'	PB2-HS
PB2-1982-rev.	5' – GCC TTR TTG TAR TTG AAC A – 3'	
NS1-74-for.	5' – AGA CAT GKG TGA TGC CCC – 3'	Segment 8
NS1-529-rev.	5' – ATT GCA TTT TTG ACA TCC TC – 3'	
NS1-1 for.	5' – AGC AAA AGC AGG GTG ACA A – 3'	
NS2-513-for.	5' – GAG GAT GTC AAA AAT GCA AT – 3'	
NS2-863-rev.	5' – AGT AGA AAC AAG GGT GTT TT – 3'	
PB1-462-for.	5' – TCT AAC AGC CAA TGA ATC – 3'	PB1-HS
PB1-1114-rev.	5' – TTT CTG CTG GTA TTG TG – 3'	
Uni12	5' – AGC AAA AGC AGG – 3'	RT
N1,2,4,5,8-for.	5' – AGC AAA AGC AGG AGT TT – 3'	Komponenten für N-Subtyp- ,Suchprimer'
N1,2,4,5,8-rev.	5' – AGT AGA AAC AAG GAG TTT – 3'	
N3-for.	5' – AGC AAA AGC AGG TGC GAG – 3'	
N3-rev.	5' – AGT AGA AAC AAG GTG CTT T – 3'	
N7-for.	5' – AGC AAA AGC AGG GTG ATT – 3'	
N6,7,9-rev.	5' – AGT AGA AAC AAG GGT STT TT – 3'	
N6,9-for.	5' – AAA AGC AGG GTS AAR ATG AAT – 3'	

CS-H7-for. CS-H7-rev.	5' – ACT TTY ASY TTC AAT GGG GC – 3' 5' – CCY TGT GCA TTT TGA TG – 3'	Spaltstelle H7
CS-H5-for. CS-H5-rev.	5' – GCT CCH GAA TAT GCR TAC AA – 3' 5' – GTG TTC ATT TTR TCA ATG ATT GA – 3'	Spaltstelle H5
NP-1 NP-2 NP-3 NP-4 NP-5 NP-6	5' – TAA TCA CTA CYG AGT GAC AT – 3' 5' – CCT TGC ATC AGA GAG CAC AT – 3' 5' – GAT GCC ACR TAY CAG AGA AC – 3' 5' – TCY TCA AAT GCT GCA GAG TG – 3' 5' – CCA AAT GAR AAT CCR GCA CA – 3' 5' – AGT AGA AAC AAC GGT ATT TT – 3'	Segment 5 NP
PB1-1 PB1-2 PB1-3 PB1-4 PB1-5 PB1-6 PB1-7 PB1-8 PB1-9 PB1-10	5' – AGC GAA AGC AGG CAA AC – 3' 5' – GCY AAW GCR GTT GCA GC – 3' 5' – AGT GGA YAA RCT GAC CCA – 3' 5' – TTT RGT RTT GTC TCC AGT – 3' 5' – TTG GAG GSA ATG ARA AGA A – 3' 5' – GCT TGT ATT CCC TCA TGA – 3' 5' – GAY GGA CTC CAA TCC TC – 3' 5' – CAA CRG CAT CAT ATT CCA T – 3' 5' – GAY GAA GAY TAY CAG GG – 3' 5' – GAA GGA CAA GCT AAA TTC A – 3'	Segment 2 PB1
PB2-1 PB2-2 PB2-3 PB2-4 PB2-5 PB2-6 PB2-7 PB2-8 PB2-9 PB2-10	5' – AAA GCA GGT CAA ATA TAT TC – 3' 5' – TTR GCA CTG AGR TCT GC – 3' 5' – GGT TRA AAC ATG GRA CCT – 3' 5' – CAT TGC TGC YTT GCA TAT – 3' 5' – AGA GCA ACR GTA TCA GC – 3' 5' – GAR TAT TCA TCY ACT CCC A – 3' 5' – ATG GGR ATG ATC GGA ATA – 3' 5' – CTC ATT CCT GAK CCT CT – 3' 5' – AAT AAA RCT KCT ACC MTT T – 3' 5' – TCG TTT TTA AAC AAT TCG AC – 3'	Segment 1 PB2
Mat-1 Mat-2 Mat-3 Mat-4 Mat-5 Mat-6	5' – AAG CAG GTA GAT ATT GAA AG – 3' 5' – AAT CTG CTC ACA WGT GGC – 3' 5' – CTY GCC AGT TGC ATG GG – 3' 5' – GCC TGC AAA TTT TCA AGA AG – 3' 5' – ATG GTG CAG GCA ATG AG – 3' 5' – AGT AGA AAC AAG GTA GTT TT – 3'	Segment 7 Matrix- protein

PA-1	5' – AGC GAA AGC AGG TAC TGA T – 3'	PA Segment 3
PA-2	5' – GCC AAC AAG ATA AAA TCC G – 3'	
PA-3	5' – CGA TTC ATT GAA ATT GGA GT – 3'	
PA-4	5' – TTT GAC CGC TGA GAG CA – 3'	
PA-5	5' – GGC TGC ATT GAG GGC A – 3'	
PA-6	5' – ATT CAC ATG CCT TGT TGA A – 3'	
PA-7	5' – AAC ATG AAG AAA ACA AGC CA – 3'	
PA-8	5' – AGG AGC ATG TCT CCT ATC CC – 3'	
PA-9	5' – TGT GAG TAT GGA ATT CTC – 3'	
PA-10	5' – GGA CAG TAT GGA TAG CAA – 3'	

2.4 Aviäre Influenza A Virus (AIV) -isolate

Subtyp	Stammbezeichnung	Abkürzung	Acc. No.
H5N2	A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2	H5N2	HA: DQ387854 NA: DQ402042 NP: DQ792925
H7N2	A/Mallard/Bavaria/1-R/2005 H7N2	H7N2	
H5N1	A/Mallard/Bavaria/1/2006 H5N1	H5N1-c265	HA: DQ458992 NA: DQ458993 NP: DQ792924
	A/Mallard/Bavaria/10/2007 H5N1	H5N1-lsm	HA: FJ183472 NA: FJ183473 NP: FJ213606
	A/Mallard/Bavaria/10/2007 H5N1 nach einer Passage in CRFK-Zellen	H5N1-lsm- CRFK	
H10N7	A/Mallard/Bavaria/3/2006 H10N7	H10N7	HA: FJ183474 NA: FJ183475 NP: DQ792927

2.5 Enzyme und Kits

2.5.1 Enzyme

HotStar <i>Taq</i> Polymerase	Invitrogen
<i>Pfx</i> -AccuPrime™ Polymerase	Invitrogen
SuperScript II Reverse Transkriptase	Invitrogen
Streptavidin gekoppelte alkalische Phosphatase	

	Invitrogen
Taq Polymerase	Invitrogen

Für Reaktionen mit diesen Enzymen wurden die vom jeweiligen Enzymhersteller mitgelieferten Puffer verwendet.

2.5.2 Kits, Puffer und Lösungen

5x RT-Puffer	Invitrogen
6x DNA-Ladepuffer	Sigma
10x PCR-Puffer	Invitrogen
50x TAE Puffer	Gibco
Hämalaun nach Mayer	Aqua dest. ^{ad 1l} 1g Hämatoxylin 0,2g Natriumjodat (NaIO ₃) 50g Kalialaun (KAl(SO ₄) ₂ * 12 H ₂ O) 50g Chloralhydrat 1g Zitronensäure
TE-Puffer	Applichem
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen

2.6 Antikörper und Konjugate

27100-1, mAK anti porcine IFN- α	PBL Biomedical Laboratories
37100-1 (Rabbit-anti-Pig) IFN- α	PBL Biomedical Laboratories
MP700, mAK anti porcine IFN- γ	Perbio Science
PP700, (Rabbit-anti-Pig) IFN- γ	Perbio Science
IFN- α Standard	Roche
OBT 1551 Gesamtpartikel (α -Influenza)	Immunologicals Direct
Kaninchen-Serum (α -Influenza H5N2)	Dr. Voigt, FLI Tübingen
Biotinylierter Sekundär-AK	Dako

(α -Ziege, Maus, Kaninchen)

Vector VIP Peroxidase Substrat Kit	Vector Laboratories
Peroxidase-gekoppelter Streptavidin – Biotin-Komplex	Dako
Anti-Rabbit Konjugat	Promega
Alkalische Phosphatase	Vector
F8 Mab Mouse anti Influenza NP	HyTest
Peroxidase-Konjugat Donkey anti Goat	Jackson Immuno Research
Anti-Kaninchen-HRP-POD	Promega

2.7 Chemikalien und Reagenzien

Agarose für Gelelektrophorese	Gibco BRL
Bromphenolblau	Serva
BSA	Sigma
Chlorophorm	Roth
Concanavalin A (ConA)	
Dithiothretinol 0,1M (DTT)	Invitrogen
DAB	Dako
EDTA, Dinatriumsalz	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Ficoll (Seperationsmedium, Dichte $\rho=1,077$)	PAA
Formamid, deionisiert	Gibco BRL
Glykogen	Qiagen
Nukleosidtriphosphate, dNTPs	Invitrogen
PBS	PAA
β -Propiolacton	Sigma
Protein Block Serumfree	Dako Cytomatic
RNase-Out	Invitrogen
TBS	PAA

Triton X-100	Sigma
TRIzol [®] Reagent	Invitrogen
Trypanblau	Roth
Tween [®] -20	Roth
Xylencyanol	Fluka
Zylexis [®]	Pfizer
<u>Zusätze für Zellkultur</u>	
Bikarbonat (Bik), 7,5%	PAA
FBS	PAA
Gentamycin	PAA
Nicht-essentielle AS	PAA
Penicillin G	Grünenthal
Streptomycin	Hefa Pharma
Wasserstoffperoxid	Merck

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Roth, Sigma oder Scharlau bezogen.

2.8 Verbrauchsmaterial

Elispot-Platten	Millipore
Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf
Mikrotiterplatten, Rundboden	Greiner
Mikrotiterplatten, Flachboden	Greiner
PCR-Tubes 0,2ml	Biozym
Pipettenspitzen	Eppendorf
Schutzhandschuhe	Kimberly-Clark
Schutzmasken, 3M 9332 FFP3	VWR
Stahlkugeln (5mm)	Qiagen
Zellkulturplastikwaren	Greiner

Zentrifugenröhrchen Beckman Instruments

2.9 Geräte und Laborhilfsmittel

Begasungsbrutschrank	Heraeus
Fluoreszenz-Mikroskop, Axioskop 2 plus	Zeiss
Einbettautomat Vip5	Sakura
EliSpot-Reader, Viruspot 04	AID
Fotoapparat AxioCam MRc2	Zeiss
Geldokumentationssystem	Biometra
Heißluftofen	Heraeus
Heizblock	Eppendorf
Horizontal-Elektrophoresekammern	Kisker, Bio-Rad
Laborwaage CP622-0CE	Sartorius
Mikroskop Labovert	Leitz
Microtom	Microm
Mikrowellengerät	Bosch
Minigel-Elektrophoreseapparatur	Kisker
Mx3000P [®]	Stratagene
Mx3005P [™]	Stratagene
Pipetten	Eppendorf, Abimed
Pipettenspitzen	Eppendorf
Photometer	Eppendorf
Power Supplies	Pharmacia, LKB, Bio-Rad
Sterilbank Lamin Air	Heraeus
Tissue Lyser	Qiagen
Tissuetek Ausgießstation	Sakura
Trio-Thermoblock	Biometra
Vortex Genie 2	Scientific Industries

2.9.1 Zentrifugen

2K15	Sigma
Biofuge A	Heraeus
Biofuge 13	Heraeus
Biofuge pico	Heraeus
Eppendorf Tischzentrifuge 5415	Eppendorf
Omnifuge 2.0 RS	Heraeus
Ultrazentrifuge Centrikon T-1055	Kontron Instruments
Zellzählkammer	Fuchs-Rosenthal
Zentrifuge J2-21	Beckman Instruments

2.9.2 Software

Die Analyse und der Vergleich der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen sowie die Entwicklung der sequenzspezifischen Primer wurde mit Hilfe der DNAMAN Software von Lyonnion BioSoft Version 5.2.9. durchgeführt.

Die Analyse der Agarosegelelektrophorese erfolgte mit der zum Gerät zugehörigen Software BioDocAnalyse (BDA) liveH Version 2.46.8.1 von Biometra.

Die real-time PCR Geräte (Mx3005P[®] und Mx3000P[™]) sind Produkte der Firma Stratagene und wurden mit der vom Hersteller mitgelieferten MxPro[™] QPCR Software betrieben.

Die Auswertung der EliSpot-Platten im EliSpot-Reader erfolgte mit der zum Gerät zugehörigen Software von AID.

Die immunhistologischen Bilder wurden mit dem Softwareprogramm Axio Vision Release 4.3 (11-2004) aufgenommen.

3 METHODEN

3.1 Zellkulturen

Die Kultivierung der adhärent wachsenden Zellen erfolgte standardmäßig in einem Zellkulturbrutschrank bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂. Die zur Kultur von eukaryotischen Zellen verwendeten Medien wurden gekauft und vor Gebrauch je nach Kulturbedingungen der Zellen, mit fötalem bovines Serum (FBS), nicht-essentiellen Aminosäuren (NEA), Bikarbonat (Bik), Pyruvat und Antibiotika komplementiert. Bis auf Caco-2-Zellen, die als Monolayer beimpft wurden, wurden alle anderen verwendeten Zellkulturen simultan bei der Zelleinsaat beimpft.

Bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 95 % wurden die Kulturen durch Ablösen mit Trypsin je nach Zelltyp 1:2 bis 1:8 geteilt und subkultiviert.

3.1.1 MDBK (*Bos taurus*, Madin Darby Bovine Kidney), MDCK (*Canis familiaris*, Madin Darby Canine Kidney) und CRFK (*Felis catus*, Crandell-Rees Feline Kidney) Zellen

MEM Earls-Medium wurde mit 10 % FBS und 1 % Bik komplementiert. Sobald der Zellrasen in der Regel nach ca. drei Tagen dicht gewachsen war, wurden die Zellen 1:8 geteilt.

3.1.2 MA-104 Zellen (*Cercopithecus aethiops*, Affennierenzellen)

MEM Earls-Medium wurde mit 10 % FBS, 1 % NEA und 1 % Bic. komplementiert. Sobald der Zellrasen in der Regel nach drei Tagen dicht war, wurden die Zellen 1:8 geteilt.

3.1.3 Caco-2-Zellen (Zellen eines Dickdarmkarzinoms)

RPMI-Medium wurde mit 12 % FBS und 0,5 % Bic. komplementiert. Nach ca. drei Tagen waren die Zellen so dicht gewachsen dass sie 1:2,5 – 1:3 geteilt werden konnten.

3.1.4 PK-15-Zellen (*Sus scrofa*, Schweinenierenzellen)

MEM Earls-Medium wurde mit 10 % FBS, 1 % NEA und 0,7 % Bic. komplementiert. Sobald der Zellrasen in der Regel nach drei Tagen dicht gewachsen war, wurden die Zellen 1:5 geteilt.

3.1.5 Periphere Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells, PBMC)

Ca. 6 ml EDTA-Blut wurden zur Dichtegradiententrennung auf 7 ml Ficoll in 15 ml-Bluecaps geschichtet und 35 min bei 1600 rpm und Raumtemperatur (RT) ohne Abbremsen der Zentrifuge zentrifugiert. Der über dem Trennmedium erscheinende weißliche Ring aus PBMC's wurde abgenommen und in ca. 40 ml steriles PBS (sPBS) gegeben, gemischt und erneut 10 min bei 1500 rpm und RT zentrifugiert. Falls nach einem weiteren Waschschrift in sPBS mit anschließender Zentrifugation noch Erythrozyten in dem PBMC-Pellet vorhanden waren, wurde das Pellet in 5 ml Lysepuffer gelöst und 10min inkubiert, erneut in sPBS resuspendiert und wieder zentrifugiert. Das Pellet wurde zur Herstellung einer Einzelzellsuspension und zur Bestimmung der Lebendzellzahl der PBMC in Abhängigkeit der Pelletgröße in 2-4 ml Anzuchtmedium (AZM) resuspendiert (Sedimentlösungsmenge in ml).

3.1.5.1 Bestimmung der Lebendzellzahl

Um die Zahl der lebenden PBMC-Zellen in der Zellsuspension bestimmen zu können, wurden 100 µl der in 3.1.5.1 beschriebenen Sedimentlösungsmenge (SLM) in einer 1:100 Verdünnung mit 500 µl Trypanblau und 9,4 ml sPBS eingesetzt. Lebende Zellen werden nicht durch das Trypanblau angefärbt und können daher im Lichtmikroskop von den blaugefärbten toten Zellen unterschieden werden.

Ausgezählt wurden die Zellen in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (Abb.6). Dabei wurden zwei mal 16 Kleinstquadrate diagonal (beide roten Linien) in der Zählkammer liegend ausgezählt und der Mittelwert ermittelt. Die gewünschte Lebendzellzahl pro zu bildendem ml Zellsuspension ergab sich aus der gezählten Zellzahl (GZ), der Zählkammerkonstanten (K), der Sedimentlösungsmenge (SLM) in ml und der gewünschten Zellzahl wie folgt:

$$\frac{GZ \times K \times SLM}{\text{Gewünschte Zellzahl}} = X \text{ ml AZM}$$

$$\frac{X \text{ ml AZM}}{SLM} = \text{Zusatz an Zellsuspension für die gewünschte Zellzahl in 1ml AZM}$$

3.2 Virologische Methoden

3.2.1 Virusvermehrung

3.2.1.1 In bebrüteten Hühnereiern

Die Virusvermehrung erfolgte standardmäßig in 10-12 Tage alten bebrüteten Hühnereiern von spezifisch pathogenfreien (SPF)-Hühnern der Firma Lohmann Tierzucht (Cuxhaven). 200 µl einer virushaltigen Lösung wurden in die Allantoishöhle injiziert. Nach Absterben des Embryos wurde die Allantoisflüssigkeit steril entnommen und über ein Zuckerkissen durch Ultrazentrifugation grob gereinigt. Die Titerbestimmung erfolgte wie in 3.2.1.2.1 beschrieben.

3.2.1.2 In Zellkultur

Die Virusvermehrung in Zellkultur erfolgte in unterschiedlichen Zelllinien (s. 2.1). Diese wurden wie in 3.1 beschrieben kultiviert und geteilt. Bis auf Caco-2-Zellen wurden alle simultan infiziert. Dabei wurden auf eine 50 ml-Zellkulturflasche 200 µl einer virushaltigen Lösung gegeben. Nach weitgehender Zellzerstörung (80-100 % zytopathogener Effekt. cpE) wurden die infizierten Kulturen mehrfach gefriergetaut und nach zehnminütiger Zentrifugation der Zelldetritus separiert und verworfen. Die virushaltigen Übersände wurden entweder bei -70°C eingelagert oder durch Ultrazentrifugation über ein Zuckerkissen grob gereinigt und konzentriert. Die Titer an infektiösem Virus und der Hämagglutinationstiter der Konzentrate wurden nach Resuspension der Pellets in den angegebenen Volumina TE-Puffer bestimmt.

Nach vollständiger Lyse der Zellen wurde der Überstand sowie das Zelllysat über Zucker gereinigt und der Titer bestimmt.

3.2.1.2.1 Titerbestimmung

Um den Titer einer virushaltigen Lösung zu bestimmen, wurde die gewünschte Zelllinie auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt und jeweils 0,5 ml dieser Zelllösung in die Näpfe einer 24-Loch-Platte eingesetzt. Jeweils vier Vertiefungen pro Verdünnungsstufe wurden mit 0,1 ml Viruslösung simultan beimpft (Ausnahme Caco-2-Zellen, siehe 2.1). Beginnend mit der unverdünnten (uv) Viruslösung wurde eine 1:10-Verdünnungsreihe bis 10^{-4} – 10^{-9} , entsprechend der zu erwartenden Endtiter, eingesetzt. Zur Kontrolle waren mindestens zwei Näpfe mit reiner Zellkultur notwendig.

Die Titerbestimmung erfolgte nach der Spearman [Spearman, 1908] und Kaerber [Kaerber, 1931] Methode:

$$\log_{10} \text{KID}_{50} - \text{Endpunktverdünnung} = X_0 - \frac{d}{2} + d \sum \left(\frac{r}{n} \right)$$

X_0 : \log_{10} des reziproken Wertes der Verdünnung, bei der alle Reagenten positiv sind;

d : \log_{10} des Verdünnungsfaktors ($d=0,3$ bei einem Verdünnungsfaktor von 1:2; $d=0,7$ bei 1:5; $d=1,0$ bei 1:10);

n : die Zahl der Reagenten, die für jede Verdünnung eingesetzt werden;

r : Anzahl der positiven Reagenten pro Verdünnungsstufe.

3.2.1.3 In der Maus

BALB/c-Mäuse wurden am FLI Tübingen von Emanuel Hassbach mit unterschiedlichen Virusdosen intraperitoneal infiziert. Für den Virusnachweis wurden die Mäuse nach vier Tagen euthanasiert und Lunge und Gehirn entnommen. Diese wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Virus-RNA Extraktion aufbewahrt.

3.2.2 Virusinaktivierung

Die Virusinaktivierung für den Impfversuch erfolgte nach Angaben aus Budowsky et al., 1993. Dabei wurde zu einer Lösung mit H5N1-c265 (A/Mallard/Bavaria/1/2006 H5N1), bzw. H7N2 (A/Mallard/Bavaria/1-R/2005 H7N2) beta-Propiolacton (PL) mit einer Endkonzentration von ~0,06% gegeben. Die Inkubation erfolgte zuerst unter Rühren und ständiger pH-Kontrolle mit Aufrechterhaltung von pH 7,4 durch Zugabe von NaOH bei Raumtemperatur für 2,5 h und anschließend über Nacht bei 4°C. Im Anschluss an die Inkubation wurde die Lösung bei 2000 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand bei 4°C gelagert. Die vollständige Virusinaktivierung der Lösung wurde durch dreimalige Blindpassagieren in CEF und MA-104-Zellen getestet.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Primerkonstruktion

Die Konstruktion der Primer erfolgte mit Hilfe der DNAMAN Software. Dabei wurden in der NCBI-Datenbank hinterlegte Influenza A Sequenzen miteinander verglichen. In hoch konservierten Bereichen konnte anschließend nach möglichen Regionen für die Bindungstelle der Primer gesucht werden. Für jedes zu amplifizierende Gensegment wurden, je nach Länge, zwei bis fünf Primerpaare gesucht, deren Amplifikate überlappende Bereiche hatten, um diese nach der Sequenzierung mittels Software zu einem kompletten Segment zusammen setzen zu können.

Damit die Primerpaare eine möglichst ähnliche Annealingtemperatur haben, wurde mittels der „4+2“-Regel (siehe 3.3.2.3) die Länge der Primer gewählt. Darüber hinaus wurde getestet, ob die Primersequenzen untereinander oder in Revers-Richtung binden können. Passende Primer wurden bei der Firma OPERON bestellt.

3.3.2 Präparation und Analyse von RNA und DNA

3.3.2.1 Gewinnung von Virusgenom aus Probenmaterial

Die Extraktion der viralen RNA aus Probenmaterial erfolgte mit dem TRIzol[®] Reagent von Invitrogen nach Angaben des Herstellers.

Organproben, ca. 30 mg, wurden mit Stahlkügelchen (5 mm Ø, Qiagen) und 1 ml TRIzol[®] in einem Tissue Lyser bei 25 Hz 90 sek geschreddert.

Tupferproben wurden in 500 µl MEM dreimal ausgewaschen. 200 µl der Tupferprobenlösung wurden mit 600 µl TRIzol versetzt.

200 µl Allantoisflüssigkeit wurden mit 600 µl TRIzol[®] und 1 µl Glykogen (20 µg/Ansatz; 20 mg/ml Gebrauchslösung) versetzt.

Die TRIzol[®]-Probenlösung wurde 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und anschließend mit 200 µl Chloroform je ml Ausgangsmenge TRIzol[®] versetzt, 15 sek kräftig geschüttelt, bei RT für 2-3 min inkubiert und anschließend 15 min bei 10000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die oberste, wässrige Phase wurde in ein frisches Eppendorf Reaktionsgefäß überführt, mit einem Volumen Isopropanol gemischt, sanft geschwenkt und 10 min bei RT inkubiert. Darauf folgte ein Zentrifugationsschritt von 20 min bei 4°C und 12000 U/min. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 500 µl 75%igem Ethanol gewaschen und anschließend für 10 min bei 4°C und 10000 U/min zentrifugiert. Das Ethanol wurde abgenommen und verworfen und der Waschschrift wiederholt. Nach dem Waschen wurde das Ethanol weitestgehend entfernt und die RNA bei 40°C im Thermoblock mit offenem Deckel ca. 10 min getrocknet. Die nun trockene RNA wurde in 40-100 µl H₂O_{DEPC} resuspendiert und für 10 min bei 60°C im Thermoblock inkubiert. Die resuspendierte RNA wurde bei -70°C gelagert oder sofort in die reverse Transkriptionsreaktion eingesetzt.

3.3.2.2 Reverse Transkription

Da für die Polymerase-Kettenreaktion DNA als Ausgangsmaterial benötigt wird, musste die gewonnene RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Für ein Ansatzvolumen von 20 µl wurden 8 µl RNA

(Gewinnung siehe 3.2.1) zusammen mit 2,5 µl Aqua_{DEPC}, 1 µl Uni12-Primer [Hoffman et al., 2001] und 0,5 µl dNTPs (je 12,5mM) in ein 0,2 ml PCR-Tube pipettiert. Der Ansatz wurde für 5 min bei 65°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gestellt. In der Zwischenzeit wurde der Reaktionsmix angesetzt: pro Probe 4 µl 5xRT-Puffer, 2 µl DTT, 1 µl RNase-Out und 1 µl Reverse Transkriptase. Der Reaktionsmix wurde dem Proben-Primer-Mix zugesetzt und das gesamte Volumen wurde 1h bei 42°C erhitzt. In den anschließenden 15 min bei 70°C wurde die Transkriptase deaktiviert. Die so erhaltene cDNA wurde später als Template für die PCR eingesetzt und bis dahin bei -20°C gelagert.

3.3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde in Thermocyclern (Biometra) mit beheizbaren Deckeln durchgeführt. Amplifizierte DNA-Fragmente, die nachfolgend für Sequenzierungen eingesetzt werden sollten, wurden mittels des AccuPrime™ Pfx DNA Polymerase PCR Systems (Invitrogen) hergestellt. Das in diesem System eingesetzte Enzym besitzt eine Proofreading-Aktivität und führt somit zu einer extrem niedrigen Fehlerrate in den Amplifikaten. Reaktionsansätze und -bedingungen, sowie die PCR-Zyklen wurden nach den Angaben des Herstellers gewählt. Die Annealingtemperatur (T_a) für die Hybridisierung der Primer an die Matrizen-DNA wurde in Abhängigkeit des GC-Gehaltes der Primersequenz entsprechend der „4+2“-Regel ($T_a = T_m - 2^\circ\text{C}$; $T_m = 4^\circ\text{C} (G+C) + 2^\circ\text{C} (A+T)$) bestimmt. Nach Reaktionsende wurde 1/10 des PCR-Ansatzes gelelektrophoretisch analysiert. Die zu sequenzierenden Fragmente, wurden aus präparativen Agarosegelen isoliert und gereinigt.

3.3.2.4 Agarosegelelektrophorese

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA wurden je nach Größe der zu trennenden Fragmente 0,7 – 2%ige horizontale Agarosegele mit 1x TAE-Puffer als Gel- und Elektrophoresepuffer eingesetzt [Sambrook, 1989]. Den Gelen wurde vor der Polymerisation Ethidiumbromid zur späteren Visualisierung der DNA zugesetzt: 3 µl Ethidiumbromid (1%ig in Wasser) auf

100 ml Gel. Die Auftrennung der DNA-Proben erfolgte nach Zugabe von 6x DNA-Ladepuffer bei einer konstanten Spannung von 5V/cm.

Die Detektion von DNA-Fragmenten, die aus dem Gel isoliert und weiterführend verwendet wurden, erfolgte auf einer Leuchtplatte mit langwelligem UV-Licht ($\lambda=360$ nm). Für photographische Aufnahmen wurde ein digitales Geldokumentationssystem (Biometra) eingesetzt, bei welchem die Gele bei kurzwelligem UV-Licht ($\lambda=254$ nm) analysiert wurden. Fragmente, die für weitere Arbeiten verwendet werden sollten, wurden mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aus den Agarosegelen extrahiert und die DNA bei -20°C aufbewahrt.

3.3.2.5 Sequenzierung und Analyse von DNA Fragmenten

Die Sequenzierung wurde bei der Firma Eurofins MWG (Martinsried) in Auftrag gegeben. Für die Sequenzierreaktion wurden die gleichen Primer wie für die PCR verwendet.

Die Analyse der erhaltenen Sequenzen erfolgte mit Hilfe der DNAMAN Software. Dabei wurden die kurzen, sich überlappenden Amplifikat-Sequenzen aneinander gelegt und somit die komplette Sequenz gebildet (Abb.5)

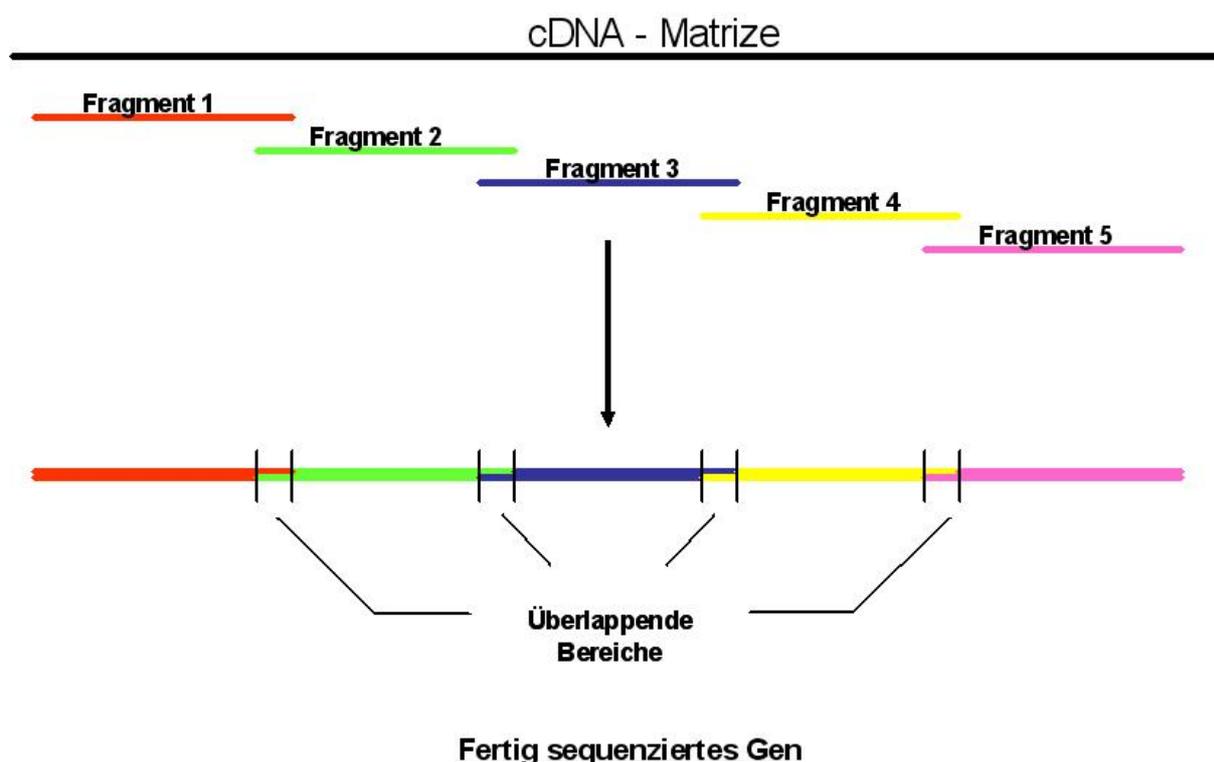


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Sequenzierstrategie für alle Influenza A Genomsegmente. Für PB2, PB1 und PA wurden fünf Primerpaare, für HA vier Primerpaare, für NA, NP und M je drei Primerpaare und für das NS-Protein zwei Primerpaare verwendet.

3.3.3 Entwicklung und Etablierung einer Multiplex-PCR

Um möglichst viele vermeintlich wichtige, Virulenzfaktoren codierende Genomereiche mit einem PCR-Ansatz zu erhalten, wurden die in der Literatur beschriebenen Genombereiche von zahlreichen, in der NCBI-Datenbank hinterlegten Sequenzen miteinander verglichen und Primer aus konservierte Genbereichen ausgewählt (verwendete Primer siehe 2.3.2.). In einem zweiten Schritt wurden die Fragmentlängen so gewählt, dass die Größenunterschiede ausreichend waren, um diese in einem Agarosegel deutlich unterscheiden und zuordnen zu können und um möglichst viele Amplifikate aus einem PCR-Ansatz zu erhalten. Die so ausgewählten Primer wurden mit der DNAMAN-Software getestet, um sicher zu stellen, dass sie nur einmal an gewünschter Stelle im Genom und nicht untereinander oder revers binden. Darüber hinaus wurde die Primerlänge so gewählt, dass alle Primer eine annähernd gleiche Annealingtemperatur besitzen. Da die zu amplifizierenden Genomabschnitte nicht die Oberflächenproteine HA und NA beinhalteten, sollte die PCR subtypunabhängig funktionieren.

Für die Optimierung der PCR-Reaktionsparameter wurden sowohl unterschiedliche Primerkonzentrationen und unterschiedliche Primerkombinationen, als auch die Konzentration von $MgCl_2$, dNTPs und *Taq*-Polymerase variiert und eingesetzt. Die PCR-Bedingungen wurden wie in 3.3.2.3 beschrieben gewählt.

3.4 Immunologische Methoden

3.4.1 Immunhistochemie

3.4.1.1 Vorbereitung der Gewebeproben

Die abgestorbenen, oder bei der Negativkontrolle abgetöteten Hühnerembryonen, sowie alle anderen zu untersuchenden Gewebeproben, wurden solange in 3,5 % Formalin eingelegt, bis das Formalin die Probe vollständig durchzogen hatte. Vor der Paraffineinbettung wurde die Probe mindestens eine Stunde unter fließendem Leitungswasser gewässert. Aus den Gewebeproben wurden je nach Fragestellung relevante ca. 2 mm dicke Stücke mit einem Skalpell oder einer Schere abgetrennt und in Kunststoffeinbettkassetten überführt. Die Fixierung und Entwässerung erfolgte in einem Gewebeeinbettautomaten nach den Betriebsanweisungen des Herstellers. Die Paraffinblöcke wurden an einer Ausgießstation (Sakura, Tissuetek-Ausgießstation) gegossen und auf einer Kühlplatte ausgehärtet. Mittels eines Rotationsmikrotoms wurden aus den ausgehärteten und gekühlten Paraffinblöcken ca. 6-7 µm dicke Paraffinschnitte hergestellt. Diese wurden in einem ca. 43-45°C warmen Wasserbad gestreckt, auf Objektträger gezogen und anschließend für mindestens eine Stunde im Brutschrank bei 37°C getrocknet.

3.4.1.2 Färbung der Gewebeproben

Nach dem Entparaffinieren und Rehydrieren der Gewebeschnitte wurden diese für 5 min in PBS (pH 7,4) eingelegt. Die Blockierung der endogenen Peroxidase erfolgte durch 10 min Inkubation in 3% Wasserstoffperoxid in PBS. Beendet wurde dieser Vorgang durch vorsichtiges Spülen der Gewebeschnitte und zweimaliges Waschen à 5 min in PBS. Um etwaige unspezifische Bindungen der AK zu verhindern, wurden die Gewebeschnitte für 20 min mit Normalserum geblockt und dieses danach vorsichtig mit Zellstoff abgesaugt. Die Inkubation mit den Primärantikörpern (Kaninchen-Serum, α -Influenza H5N2, Dr. Voigt FLI Tübingen) erfolgte mit einer 1:2000 Verdünnung über Nacht bei 4°C.

Nach dreimaligem Waschen der Schnitte in PBS erfolgte die Inkubation für 30 min mit einem biotinylierten Sekundärantikörper in einer 1:400 Verdünnung. Überschüssige, nicht-gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen à 5 min in TBS entfernt. Um die spezifisch gebundenen Antikörper in der später folgenden Reaktion mit dem DAB-Komplex sichtbar zu machen, wurden die Schnitte für 40 min mit einem Peroxidase-gekoppelten Streptavidin-Biotin-Komplex inkubiert. Der Streptavidin-Biotin-Komplex wurde 30 min vor Gebrauch nach Angaben des Herstellers (Dako) angesetzt. Überschüssiger, nicht-gebundener Komplex wurde durch dreimaliges Waschen à 5 min in TBS entfernt. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte durch die Inkubation der Schnitte mit einer Substrat-Chromogen-Lösung. Sobald die Schnitte eine Braunfärbung zeigten, wurde die Reaktion durch vorsichtiges Spülen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gestoppt. Die Gegenfärbung der Schnitte erfolgte mit Hämalaun nach Mayer mit anschließendem Bläuen unter Leitungswasser.

Die fertig gefärbten Schnitte wurden mittels aufsteigender Alkoholreihe bis zum Xylol dehydriert und mit Eukitt eingedeckelt.

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.4.2 Impfversuch mit inaktiviertem H5N1 und H7N2

3.4.2.1 Impfversuchskonzeption

Die Immunisierung der 10 Ferkel mit inaktiviertem H5N1-c265 erfolgte nach dem in Abbildung 6 dargestellten Impfschema. Zum Zeitpunkt Z_0 wurde die erste Vaccinierung mit inaktiviertem H5N1-c265 vorgenommen und die Null-Werte der PBMC nach Stimulation mit RPMI, MDCK-Überstand und ConA ermittelt. Einer Gruppe (Tiere Nr. 6-10) wurde zusätzlich zum Impfvirus ein Immunstimulans (Zylexis[®]) auf Basis von inaktiviertem Parapoxvirus ovis [Traeder et al., 2005] verabreicht.

An den angegebenen Zeitpunkten Z_0 bis Z_7 wurde von allen geimpften Tieren Blut entnommen. Zudem wurden die PBMC gewonnen und die Sekretion von Interferon- α und Interferon- γ gemessen.

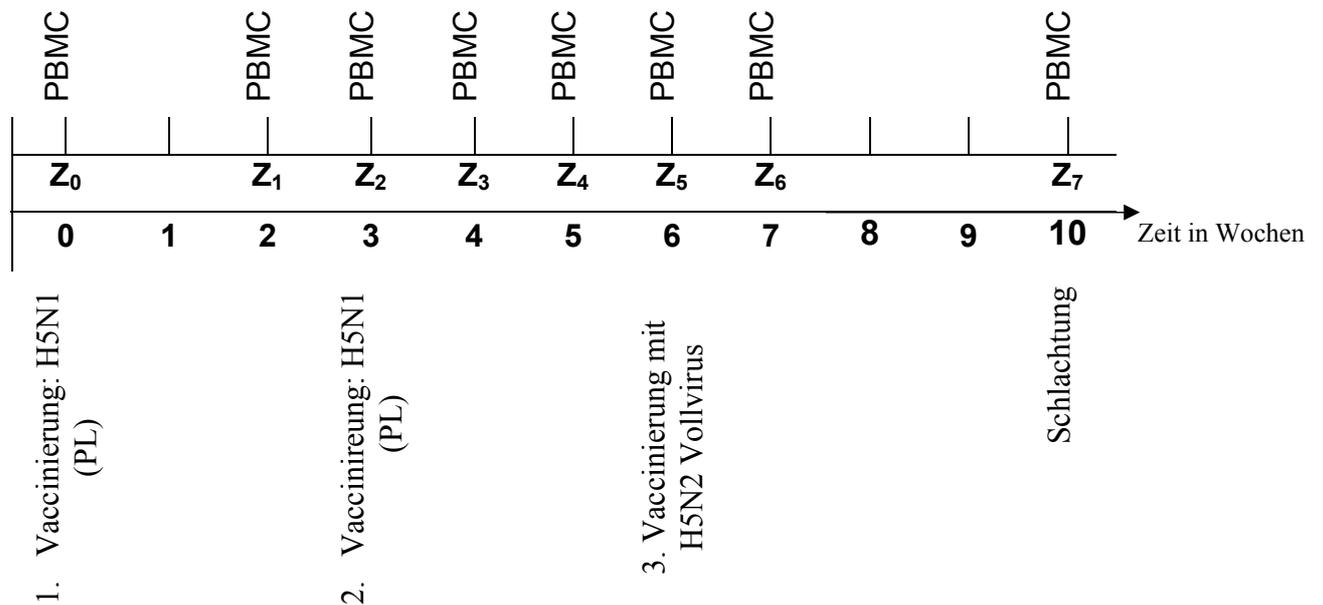


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Impfschemas zur Immunisierung der 10 Ferkel mit inaktiviertem H5N1-c265.

Der zweite Impfversuch wurde mit einer Gruppe von drei adulten weiblichen Schweinen nach dem Impfschema in Abbildung 7 durchgeführt. Als Impfvirus wurde inaktiviertes H7N2-Virus verwendet.

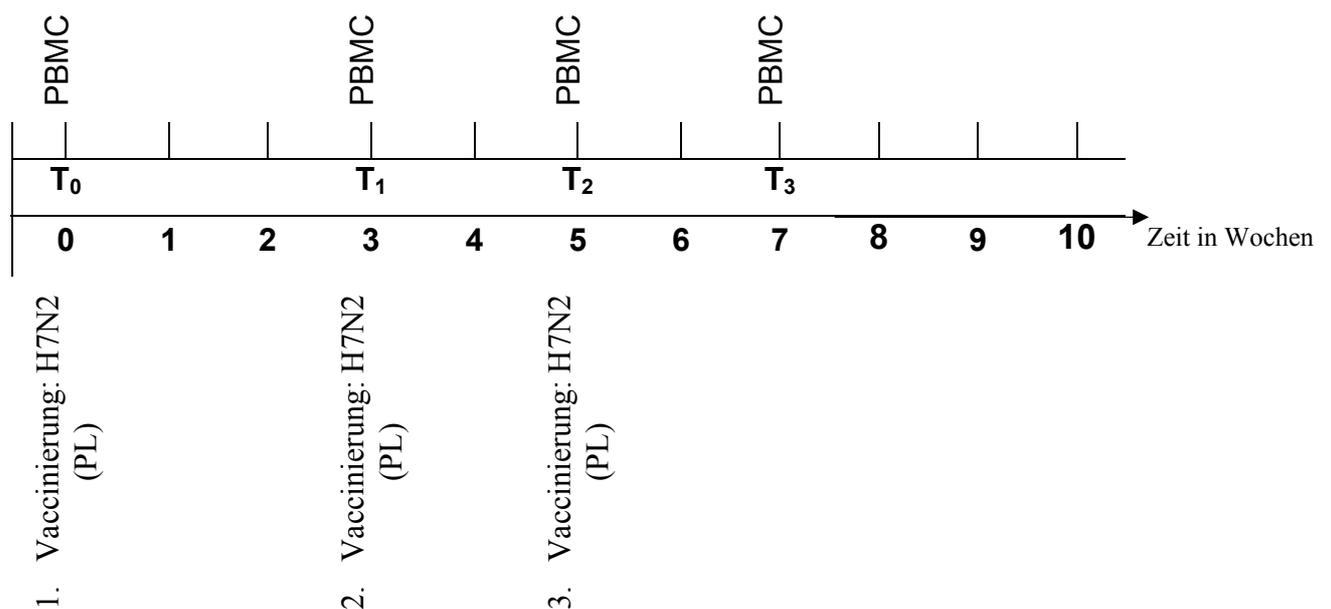


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Impfschemas für den zweiten Impfversuch zur Immunisierung der drei adulten weiblichen Schweine mit inaktiviertem H7N2-Virus.

Für beide Impfversuche wurde β -Propiolacton (PL) inaktiviertes Virus eingesetzt. Im ersten Impfversuch wurde der H5N1-c265 Virusstamm, im zweiten Impfversuch der H7N2 Virusstamm eingesetzt. Als Immunstimulans wurde in beiden Impfversuchen das Präparat Zylexis[®] (Pfizer) auf Basis des inaktivierten Orf Virus-Stammes D1707 als eine Großtierdosis eingesetzt.

Die 1. + 2. Vaccinierung im Ferkel-Impfversuch erfolgte mit dem H5N1-c265 Virusisolat (Ausgangstiter vor der Inaktivierung $10^{7,25}$ /ml), 1:5 in PBS bzw. 1:5 in Zylexis[®] verdünnt. Die 3. Vaccinierung im ersten Impfversuch erfolgte mit einer geringeren Dosis des H5N2-Virusisolats, ebenfalls in PBS, bzw. Zylexis[®] verdünnt.

Im zweiten Impfversuch wurde die neu erhaltene AIV Reassortante H7N2 verwendet. Die H7N2-Viruslösung hatte einen HA-Ausgangstiter-Titer von $> 1:64$ vor der Inaktivierung. Jeweils 2 ml der inaktivierten H7N2-Zylexis[®] Mischung (5 ml Virus + 1,5 ml Zylexis[®]) wurden in die Nackenmuskulatur injiziert.

3.4.2.2 Interferon- γ Nachweis mittels EliSpot-Analyse

Mit der EliSpot-Methode kann aus einer Zellsuspension von PBMC eines Tieres die Anzahl der Zellen bestimmt werden, welche ohne Stimulation bzw. nach einer Stimulation bestimmte Zytokine sezernieren. Dafür wurden EliSpot-Platten (Millipore) mit 15 μ l/Well 35% Ethanol benetzt und 1 min inkubiert. Das überschüssige Ethanol wurde abgekippt. Die Platten wurden dreimal mit sterilem PBS (sPBS) gewaschen und anschließend mit einem monoklonalen Antikörper gegen das zu untersuchende Zytokin beschichtet. Zum Nachweis der IFN- γ Sekretion wurden die Antikörper in sPBS (IFN- γ (MP700): 5 μ g/ml) verdünnt und je 100 μ l/Well auf die Platten gegeben. Bei jeder Platte wurde als Negativkontrolle Überstand der Zellen verwendet, in welchen das Stimulus-Virus vermehrt wurde. Als Positivkontrolle wurde immer eine Concanavalin A (ConA, 2,5 μ g/ml) Stimulation mitgeführt. Die so bestückten Platten wurden bei 4°C über Nacht inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die AK-Lösung abgekippt und die Platte zweimal mit je 150 µl/Well H₂O_{dest.} gewaschen. Anschließend erfolgte das Blocken der verbliebenen Bindungsstellen auf der Membran mit 150 µl/Well RPMI + 10% FBS für 2 h bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂. Das Blocking-Medium wurde abgekippt und 100 µl der auf die gewünschte Zellzahl eingestellten Zellsuspension mit dem gleichen Volumen des entsprechenden Stimulus auf die Platte gegeben und 18-48 h bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ inkubiert.

Der Inkubation folgte sechsmaliges Waschen mit PBS+0,01Tween[®]20 à 150 µl/Well und die Inkubation der Platten mit dem 2. AK, der in sPBS+0,5 % FBS in gewünschter Konzentration angesetzt wurde, bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit für 2 h. Im Anschluß folgte erneut sechsmaliges Waschen mit sPBS-0,01Tween[®]20 à 150 µl/Well. 100 µl/Well anti-Kaninchen AP-Konjugat in einer 1:1000 Verdünnung in PBS wurden für 45 min bei RT und Dunkelheit auf der Platte gelassen. Anschließend wurde das Konjugat abgekippt und die Platte dreimal mit je 150 µl/Well PBS-0,01Tween[®]20 und dreimal mit je 150 µl/Well sPBS gewaschen. Die Anfärbung der spezifisch gebundenen AK erfolgte durch Inkubation mit 100 µl/Well Substrat für ca. 5min bei RT in Dunkelheit. Angesetzt wurde die Substrat-Lösung 20 min vor Gebrauch nach Angaben des Herstellers. Sobald Spots zu erkennen waren wurde die Reaktion durch mehrmaliges Eintauchen in Wasser gestoppt. Nach Abnahme der Folienabdeckung am Boden der Platte wurde diese über Nacht getrocknet. Zur Detektion von IFN- γ sezernierenden Zellen wurden monoklonale Mäuse-AK MP700 als Fänger-AK (anti Pocine IFN- γ) und das polyklonale Kaninchenserum PP700 (Rabbit-anti-Pig IFN- γ) als Detektor-AK eingesetzt. Für die Visualisierung wurde ein anti-Kaninchen-AP-Konjugat in einer Verdünnung von 1:1000 und als Substrat die alkalische Phosphatase BCIP/NBT verwendet.

Die Auswertung erfolgte über das EliSpot-Messgerät (Viruspot 04) der Firma AID mit der dazu gehörenden Software.

3.4.2.3 Antivirale Wirkung von peripheren mononukleären (PBMC) Zellüberständen

Der Test auf antivirale Wirkung von PBMC-Überständen wurde nach Sasaki et al. (2008) durchgeführt. In 96-Loch Flachboden-Mikrotiterplatten wurden pro Vertiefung 50 µl Zellsuspension (1×10^6 Zellen/ml) von MDBK-Zellen zusammen mit 50 µl Testflüssigkeit eingesetzt. In den Zell- und Viruskontrollen wurde nur Anzuchtmedium (AZM) zugesetzt. Die zu testenden Zellkulturüberstände (ZKÜ) wurden in 1:2 Verdünnungsstufen in AZM angesetzt und jeweils im Doppelansatz der Zellsuspension beigefügt. Als IFN- α Kontrolle diente rekombinantes Interferon 2 der Firma Roche (Roferon[®], 1:10000000 Vorverdünnung einer 1,7 mg/ml Konzentration). Es wurde ebenfalls in einer 1:2 Verdünnungsreihe in AZM angesetzt und entsprechend der Zellsuspension beigefügt. Nach einer Inkubation von 4-6 h bei 37°C und 5 % CO₂ Sättigung (nach 6 h sollte der Zellrasen dicht sein), wurde das Medium steril abgenommen und 50 µl/Vertiefung einer Vesikuläres Stomatitis-Virus Stamm Indiana Gebrauchsverdünnung (VSV-GV, 1:800 mit einem Titer von $10^{7,75}$ /ml) zugegeben. Bei der Zellkontrolle wurde an Stelle der Virusverdünnung AZM beigefügt. Nach einer Stunde Virusadsorption bei 37°C und 5 % CO₂ Sättigung wurde die Viruslösung abgenommen und den Zellen 100 µl/Well Erhaltungsmedium (incl. 2 % FBS) zugesetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ Sättigung.

Sobald die Zellkontrolle einen cytopathogenen Effekt (CPE) von 100 % zeigte wurde die antivirale Wirkung der eingesetzten Zellkulturüberstände bezogen auf die IFN- α Kontrolle wie folgt berechnet:

$$\begin{aligned} \text{IFN-}\alpha \text{ /ml ZKÜ} &= \text{IFN-}\alpha \text{ Standard bei 50 \% CPE} \times \text{Faktor auf 1 ml} \times \\ &\quad \text{Verdünnung} \\ &= \text{IFN-}\alpha \text{ -St.}_{\text{CPE 50 \%}} \times \text{Verdünnung Probe}_{\text{CPE 50 \%}} \end{aligned}$$

3.4.2.4 Antikörpernachweis

Es wurde ein ELISA der Firma ID.Vet nach den Vorschriften des Herstellers eingesetzt. Es handelt sich um einen kompetitiven ELISA (ID_{SCREEN}[®]), der Antikörper gegen das Nukleoprotein des Influenza A Virus detektiert.

4 ERGEBNISSE

4.1 Virusisolierung und Selektion der AIV-Subtypen

Die Virusisolierung erfolgte zunächst zu Diagnostikzwecken entweder aus eingeschickten Tupferproben, zumeist von Jagdenten, oder aus gefundenen und angelieferten Vogelkadavern. Die Proben wurden nach festgelegten Standardbedingungen (QSA O 0751-1) aufbereitet und einem molekularen AIV-Screening auf Präsenz von AIV-Genom mittels real-time PCR unterzogen [Spackman et al., 2002]. AIV-positive Proben wurden zur Bestätigung sowohl an das Nationale Referenzlabor (NRL) des FLI auf der Insel Riems gesandt, als auch in einer weiteren real-time PCR auf H5, H7 und N1 hin untersucht.

Unter allen positiven Proben wurden folgende Stämme ausgewählt, in größerer Menge in embryonierten Hühnereiern vermehrt und molekularbiologisch definiert, sowie auf biologische Eigenschaften näher untersucht:

A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2

A/Mallard/Bavaria/1/2006 H5N1

A/Mallard/Bavaria/10/2007 H5N1

A/Mallard/Bavaria/3/2006 H10N7

Mit diesen Isolaten waren alle AIV Subtyp-Kategorien in den vergleichenden Untersuchungen enthalten: zwei HPAI-Isolate (beide H5N1-Isolate), ein LPAI-Isolat (H5N2), das den Subtypen zuzuordnen ist, die bekannterweise durch Antigenic Drift in ein HPAI-Isolat übergehen können und ein LPAI-Isolat (H10N7), welches nach der Geflügelpestverordnung keiner Risikogruppe angehört.

4.2 Subtypisierung ausgewählter Isolate

Um die durch das NRL bestätigte Vortypisierung zu vervollständigen und eine komplette Nukleotidsequenz verschiedener Genomsegmente der ausgewählten Isolate zu erhalten, wurden Vergleiche mit einer großen Anzahl von Sequenzen aus der NCBI-Datenbank durchgeführt. Dadurch konnten hochkonservierte Sequenzbereiche identifiziert werden, in denen die zu konstruierenden Primer liegen sollten, um so eine Amplifikation mit möglichst hoher Subtypspezifität zu erhalten (Abb.8).

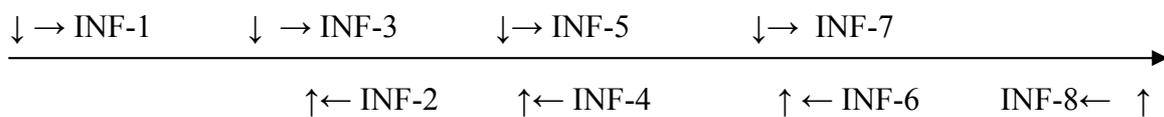


Abbildung 8: schematische Darstellung der Primeranordnung für die Amplifikation kurzer, sich überlappender Genomabschnitte von H5.

Bindeposition von INF-1: -23 = Nukleotid-Positionen vor ATG mit A als Position 1.

Für das Hämagglutinin wurden vier, für das Neuraminidasegen drei Primerpaare verwendet. Tabelle 5 gibt die ungefähre Bindestelle der Primer und die ungefähre Größe der zu amplifizierenden Fragmente wieder.

Tabelle 5: Binderegion der Primer und die zu erwartende Fragmentgröße des PCR-Produkts

Segment	Position der Primer	Fragmentgröße
Hämagglutinin	INF-1: ~ -23	S1: ~ 520 bp
	INF-2: ~ 500	
	INF-3: ~ 420	S2: ~ 490 bp
	INF-4: ~ 910	
	H5 INF-5: ~ 860	S3: ~ 520 bp
	INF-6: ~ 1380	
	INF-7: ~ 1330	S4: ~ 400 bp
	INF-8: ~ 1730	

Neuraaminidase	H10	INF-37: ~ -27	S1: ~ 440 bp	
		INF-38: ~ 420		
		INF-39: ~ 360	S2: ~ 530 bp	
		INF-40: ~ 895		
		INF-41: ~ 760	S3: ~ 590 bp	
		INF-42: ~ 1330		
		INF-43: ~ 1210	S4: ~ 500 bp	
		INF-44: ~ 1710		
	Neuraaminidase	N2	INF-9: ~ -20	S1: ~ 520 bp
			INF-10: ~ 500	
			INF-11: ~ 450	S2: ~ 450 bp
			INF-12: ~ 900	
			INF-13: ~ 950	S3: ~ 500 bp
			INF-14: ~ 1440	
N1		INF-23: ~ -20	S1: ~ 550 bp	
		INF-24: ~ 530		
		INF-25: ~ 430	S2: ~ 580 bp	
		INF-26: ~ 1100		
		INF-27: ~ 950	S3: ~ 490 bp	
		INF-28: ~ 1440		
N7		INF-45: ~ -25	S1: ~ 580 bp	
		INF-46: ~ 560		
	INF-47: ~ 340	S2: ~ 700 bp		
	INF-48: ~ 1140			
	INF-49: ~ 950	S3: ~ 490 bp		
	INF-50: ~ 1440			

Die auf diese Weise konstruierten Primer (s.2.3.2) führten in den entsprechenden PCRs zur Amplifikation der gewünschten Genbereiche (Abb.9).

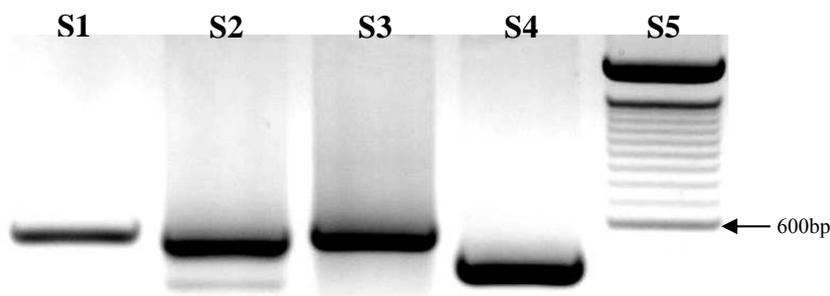


Abbildung 9: Agarosegelelektrophorese aller PCR-Fragmente des HA am Beispiel des H5N2-Isolates.

S1: Fragment 1, S2: Fragment 2, S3: Fragment 3, S4: Fragment 4, S5: 100bp-Größenmarker.

Da der Neuraminidase-Subtyp des H10-Isolates unbekannt war, wurden Primer für die Amplifikation eines Neuraminidase-Full-Length Genproduktes in Anlehnung an die Arbeit von Hoffmann et al., 2001 gesucht und synthetisiert. Mit deren Hilfe konnte eine Vorabdifferentierung in vier Gruppen gemacht werden: N1,2,4,5,8; N3; N7 und N6 und N9. Die Vorabtypisierung mit Hilfe der Suchprimer sprach für eine Neuraminidase des Subtyps N7 (Abb.10). Das so erhaltene Amplifikat konnte aus dem Agarosegel extrahiert und von den Enden kommend ansequenziert werden. Die erhaltenen Sequenzinformationen wurden über die BLAST-Funktion mit Sequenzen der NCBI-Datenbank verglichen und konnten so dem Neuraminidase-Subtyp N7 eindeutig zugeordnet werden. Daraufhin wurde ein vollständiger Satz von Primern für N7 konstruiert und die komplette Sequenz ermittelt.

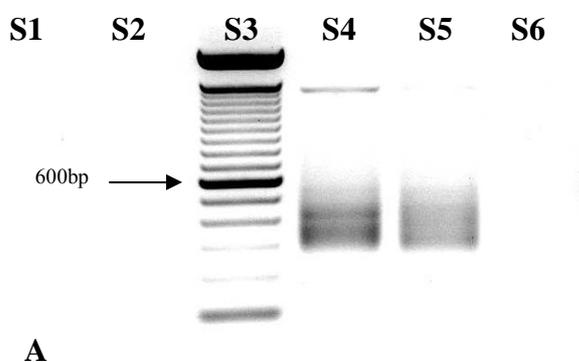


Abbildung 10: Agarosegelelektrophorese.

A: Vorabtypisierung der Neuraminidase des H10-Isolats mit den N-Suchprimern. S1: N1,2,4,5,8-Primer, S2: N3-Primer, S3: 100bp-Größenmarker, S4: N7-Primer, S5: N6,9-Primer, S6: Mastermix.

Eine Subtypisierung mit den kompletten Sequenzen des HA und der NA war somit für beide H5N1-Isolate, sowie für das H5N2- und das H10N7- Isolat möglich. Die Sequenzen wurden anschließend in der NCBI-Datenbank hinterlegt (s. Anhang).

4.2.1 Sequenzvergleiche

Um genetische Verwandtschaftsgrade zu ermitteln, wurden die in AS umgeschriebenen Sequenzdaten mit den in der NCBI-Datenbank hinterlegten Sequenzen verglichen.

4.2.1.1 A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2

Das italienische Isolat A/Mallard/Italy/4223-2/2006 H5N2 (Acc.No. CY034758) weist mit nur drei verschiedenen Aminosäuren (AS) den geringsten Unterschied in der AS-Sequenz des HA zum A/Mallard/Bavaria/1/2005 (H5N2) auf. Nur vier unterschiedliche AS im HA zeigen weitere drei Isolate, A/Mallard/Sweden/39/2002 H5N3 (Acc.No. AY995891), A/Mallard/Netherlands/3/1999 H5N2 (Acc.No. AY684894) und A/Mallard/Teal/Italy/3812/2005 H5N3 (Acc.No. CY022645.).

Die AS-Sequenz der NA eines Isolates aus Italien (A/Teal/Italy/3931-38/2005 H5N2 (Acc.No. CY022638) hat mit nur einer unterschiedlichen AS an Position 402 (nach initialem Methionin als Position 1) die größte Ähnlichkeit zur AS-Sequenz des Neuraminidasegens des bayerischen H5N2-Isolats.

4.2.1.2 A/Mallard/Bavaria/1/06 H5N1 und A/Mallard/Bavaria/10/07 H5N1

Die beiden H5N1-Isolate zeigen, insbesondere im HA, untereinander große Unterschiede auf (Abb.11A + B).

A) Hämagglutinin

H5N1 - Ism - HA	MEKIVLLLAITNLLVKSQDQICIGYHANNSTKQVDTIMEKNVTVTHAQDILEKTHNGKLCDDLGDGKPLILRDCSVAGWLLGN	80
H5N1 - c265 - HA	-----m-----vs-----e-----	80
H5N1 - Ism - HA	PMCDEFLNVPESYIVEKINPANDLCPGNFNNDYIELKHLISRINHFEKIQIIPKSSWSDHEASSGVSSACPYQGRSSFF	160
H5N1 - c265 - HA	-----	160
H5N1 - Ism - HA	RNVVWLIIKNDAYPTIKSYNNNTNQEDLLVLWGIHPNDAAEQTRLYKNPTTYISVGTSTLNQRLVPKIATRISKVNGQSG	240
H5N1 - c265 - HA	-----dn-----r-----q-----	240
H5N1 - Ism - HA	RMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPENAYKIVKKG DSTIMKSELEYGNCNTKCQTPIGAINSSMPFHNIHPLTIGECPK	320
H5N1 - c265 - HA	-----	320
H5N1 - Ism - HA	YVKS NRLVLATGLRNSPQEFERRKKRGLRGA IAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQGSYAADKESTQK AIDGVTNKVNS	400
H5N1 - c265 - HA	-----g-----	400
H5N1 - Ism - HA	IIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDN AKELG	480
H5N1 - c265 - HA	-----	480
H5N1 - Ism - HA	NGCFEFYHRCNECMESVRNGTYDYPQYSEERLKRREEISGVKLESIGTYQILSIYSTASSLALAIMVAGLSLWMC SNG	560
H5N1 - c265 - HA	-----a-----v-----	560
H5N1 - Ism - HA	SLQCRICI*	568
H5N1 - c265 - HA	-----*	568

B) Neuraminidase

H5N1 - Ism-NA	MNPNQKIIITIGSICMVIGIVSLMLQIGNMISIWVSHSIITLNQRQAEPISNTKFLTEKAVASVTLAGNSSLCPISGWAVY	80
H5N1 - c265-NA	-----g-----g-----	80
H5N1 - Ism-NA	SKDNSIRIGSRGDVVFVIREPFISCSHLECRTFFLTQGALLNDKHSNGTAKDRSPHRTLMSCPVGEAPSPYNSRFESVAWS	160
H5N1 - c265-NA	-----i-----	160
H5N1 - Ism-NA	ASACHDGTSWLTIGISGPDNGAVAVLKYNGIITDTIKSWRNNILRTQESEACVNGSCFTVMTDGPSSNGQASYKIFKMEK	240
H5N1 - c265-NA	-----s-----	240
H5N1 - Ism-NA	GKVVKSVELDAPNYHYEECSYPDAGEITCVCRDNWHGNSRNPVVSFNQNLEYQIGYICSGVFGDNPRPNDGTGSCGPVSS	320
H5N1 - c265-NA	-----p-----	320
H5N1 - Ismaning-NA	NGAYGVKGFSEFKYGNGLWIGRTKSTNSRSGFEMIWDPNGWGTDSSFSVKQDIVAITDWSGYSGSFVQHPPELTGLDCIRP	400
H5N1 - c265-NA	-----v-----	400
H5N1 - Ismaning-NA	CFWVELIRGRPEESTIWTSGSSISFCGVNSDTVSWSWPDGAELPFTIDK*	449
H5N1 - c265-NA	-----k-----*	449

Abbildung 11: Alignment beider H5N1-Isolate.

A: Alignment der HA-Sequenz auf AS-Ebene. Der rot unterlegte Bereich umfasst die HA-Spaltstelle, die nur an einer AS-Position einen Unterschied aufweist.

B: Alignment der NA-Sequenz auf AS-Ebene.

4.2.1.2.1 A/Mallard/Bavaria/1/2006 H5N1

Unterschiede auf AS-Ebene betreffen ausschließlich die HA-Sequenz. Mit jeweils einer unterschiedlichen AS, allerdings an verschiedenen Positionen, sind die Isolate A/Greyland Goose/France/06310/2006 H5N1 (Acc.No. AM498631), A/Tufted Duck/Bavaria/10/2006 H5N1 (Acc.No. EF165056) und A/Cygnus Olor/Czech Republic/5170/2006 H5N1 (Acc.No. EU443544) dem A/Mallard/Bavaria/ 1/2006 H5N1-Isolat am ähnlichsten. Für die NA-Sequenz gibt es aus Bayern aus dem gleichen Jahr 2006 diverse Isolate, u.a. A/Swan/Bavaria/6/2006 H5N1 (Acc.No. EF165573), A/Tufted Duck/Bavaria/4/2006 H5N1 (Acc.No. EF165571), A/Common Pochard/Bavaria/7/2006 H5N1 (Acc.No. EF165574), A/Eagle Owl/Bavaria/10/2006 H5N1 (Acc.No. EF165576), A/Common Buzzard/Bavaria/11/2006 H5N1 (Acc.No. EF165577) welche auf AS-Ebene eine identische Sequenz aufweisen.

4.2.1.2.2 A/Mallard/Bavaria/10/2007 H5N1

Das bayerische H5N1-Isolat aus dem Jahr 2007 unterscheidet sich in der AS-Sequenz des HA in drei AS-Positionen gegenüber einem Isolat aus Kuwait (A/Falcon/Kuwait/1019-7/2007 H5N1 (Acc.No. EU391537), in einer AS-Position gegenüber einem Isolat aus Krasnodar (A/Chicken/Krasnodar/300/2007 H5N1 (Acc.No. EU163431)) und in zwei AS-Positionen gegenüber weiteren Isolaten aus Kuwait, u.a. A/Chicken/Kuwait/KISR3/2007 (Acc.No. CY029956) H5N1.

Ein Isolat aus Krasnodar (A/Chicken/Krasnodar/300/07 H5N1 (Acc.No. EU163432)) aus dem Jahr 2007 unterscheidet sich in der AS-Sequenz der NA nur an Position 337 (ab initialem Methionin an Position 1). Somit weist dieses Isolat die größte Ähnlichkeit zum bayerischen A/Mallard/Bavaria/10/2007 H5N1 auf.

4.2.1.3 A/Mallard/Bavaria/3/2006 H10N7

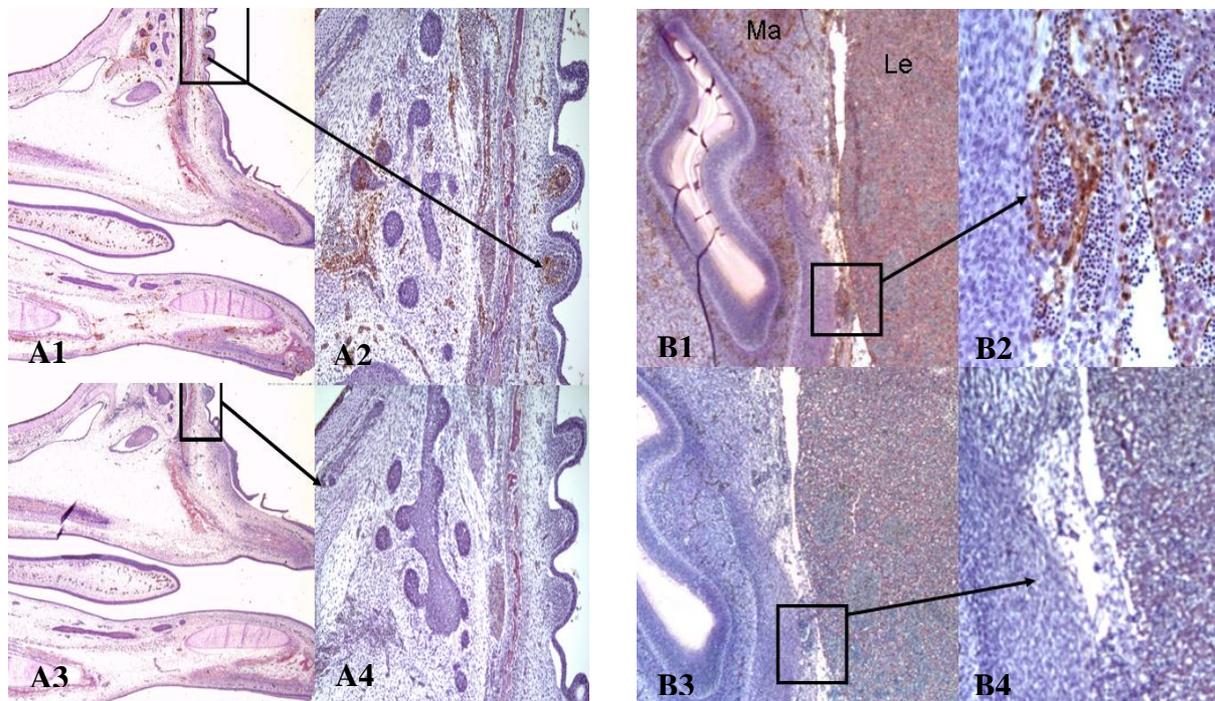
Das H10N7-Isolat hat in der AS-Sequenz des HA die größte Übereinstimmung mit einem Isolat aus dem Jahr 2003 aus der Mongolei (A/Duck/Mongolia/149/2003 H10N5 (Acc.No. AB450456). Dennoch unterscheiden sich beide Isolate an 10 AS-Positionen.

Die größte Übereinstimmung der AS-Sequenz der NA zeigen mit Unterschieden an jeweils vier AS-Positionen u.a. die Isolate A/Anser anser/Germany/R752/2006 H7N7 (Acc.No. AM933236) und A/Duck/Mongolia/583/2002 H4N7 (Acc.No. AB289334). Interessanterweise zeigen andere H10N7 Isolate weit mehr Sequenzunterschiede.

4.3 Immunhistochemischer Nachweis von AIV im Hühnerembryo

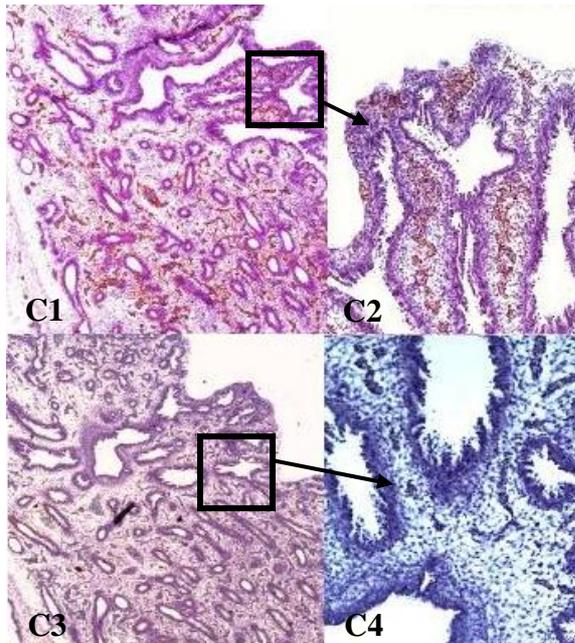
Um feststellen zu können, ob eine generalisierte oder örtlich restringierte Infektion vorliegt, kann über immunhistochemische Methoden das Vorhandensein von Viruspartikeln in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden.

Unter diesen Voraussetzungen wurden 10 Tage alte bebrütete SPF-Eiern wie unter 3.2.1.1 beschrieben mit A/Mallard/Bavaria/1/2006 H5N1 beimpft. Nach 24 Stunden waren die Hühnerembryos abgestorben. Die toten Embryonen wurden wie in 3.4 beschrieben weiter bearbeitet.



A: Schnabelbereich

B: Magen und Leber



C: Lungenausschnitt

Abbildung 12: Immunhistochemische Anfärbung von Influenza A Viruspartikel in unterschiedlichen Gewebearten. Die Übersicht erfolgte mit einer 10x2,5-Vergrößerung, die Detailansicht wurde mit einer 10x10-Vergrößerung aufgenommen.

A1: Übersichtsvergrößerung des Schnabels mit Zunge und Rand des Auges mit anfärbten Influenza Viruspartikel.

A2: Detailvergrößerung von A1. **A3** und **A4:** Negativkontrolle.

B1: Partielle Darstellung von Magen (Ma) und Leber (Le). **B2:** Detailvergrößerung von B1. **B3** und **B4:** Negativkontrolle.

C1: Übersichtsvergrößerung von Lungengewebe mit angefärbten Influenza Viruspartikeln. **C2:** Detailvergrößerung von C1. **C3** und **C4:** Negativkontrolle.

Wie in Abbildung 12 zu erkennen ist, führte die Infektion der Hühnerembryonen mit H5N1-c265 zu einer generalisierten Infektion. In Lunge, Leber, Magen und Gehirn konnten Influenza A Viruspartikel mittels Immunhistologie nachgewiesen werden.

4.4 Molekulare Analytik von Nukleo- und Matrixprotein

Da sowohl die NA als auch das HA einem starken Selektionsdruck ausgesetzt sind, ist die Variabilität hier besonders hoch. Daher wurden zur besseren Charakterisierung noch das Nukleo- und das Matrixprotein in die molekulare Analyse mit einbezogen.

Zu diesem Zweck wurden Primer für das Nukleo- und das Matrixprotein, unabhängig vom Virus-Subtyp, nach dem gleichen Prinzip wie für die Hämagglutinin- und die Neuraminidasesequenzen mit Hilfe einer Fülle von Sequenzvergleichen aus der NCBI-Datenbank, konstruiert. Die ungefähre Bindestelle in Subtyp-konservierten Nukleotidsequenzbereichen und die zu erwartende Größe der Fragmente sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Position der Primer und Größe der zu amplifizierenden Fragmente

Segment	Position der Primer	Fragmentgröße
Nukleoprotein	NP-1: ~ -20	S1: ~ 540 bp
	NP-2: ~ 520	
	NP-3: ~ 480	S2: ~ 580 bp
	NP-4: ~ 1050	
	NP-5: ~ 950	S3: ~ 520 bp
	NP-6: ~ 1465	
Matrixprotein	Mat-1: ~ -20	S1: ~ 500 bp
	Mat-2: ~ 475	
	Mat-3: ~ 370	S2: ~ 370 bp
	Mat-4: ~ 730	
	Mat-5: ~ 640	S3: ~ 390 bp
	Mat-6: ~ 1030	

In Abbildung 13 sind am Beispiel des H10N7-Isolats die Einzelfragmente und die Full-Length Amplifikate von Matrix- und Nukleoprotein nach der PCR im Agarosegel dargestellt. Zu erkennen ist ebenfalls, dass es zu keinen Mismatch-Bindungen und unspezifischer Amplifikation kam.

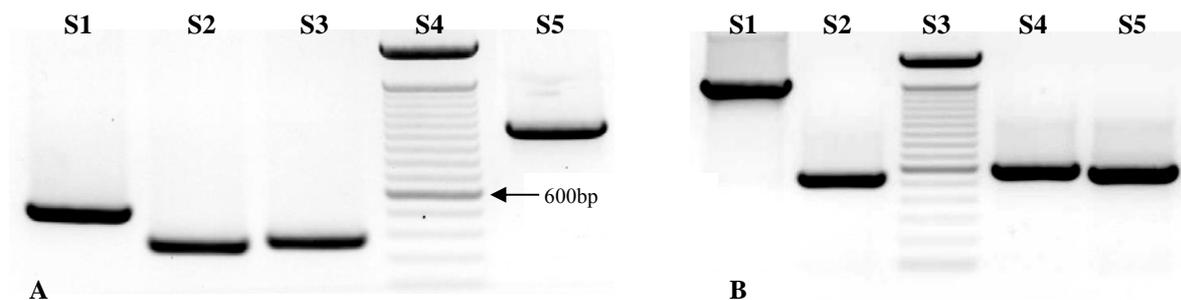


Abbildung 13: Agarosegelelektrophorese der PCR-Fragmente für das Matrix (A)- und das Nukleoprotein (B) am Beispiel des H10N7-Isolates.

A: S1: Fragment 1, S2: Fragment 2, S3: Fragment 3, S4: 100bp-Größenmarker, S5: Matrix-Full-length Amplifikat.

B: S1: NP-Full-length-Amplifikat, S2: Fragment 1, S3: 100bp-Größenmarker, S4: Fragment 2, S5: Fragment 3.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden wie in 3.3.2 beschrieben weiter bearbeitet und sequenziert. Die Sequenzergebnisse für das NP und das M wurden in der NCBI-Datenbank (Acc.No. s. Anhang) hinterlegt.

4.4.1 Homologievergleich der AS-Sequenzen der bayerischen Isolate

Beide H5N1-Isolate (H5N1-c265 und H5N1-Ism) weisen die gleiche AS-Sequenz sowohl im M1 als auch im M2 auf. H5N2 und H10N7 haben die gleiche AS-Sequenz im M1, weisen aber einen AS-Unterschied im M2 auf (Abb.14A + B). Der Sequenzunterschied zwischen den HPAI- und den LPAI-Isolaten (rot unterlegte AS für HPAI-Isolate bzw. gelb hinterlegte AS für LPAI-Isolate) umfasst mehrere AS: im M1 sind es zehn AS, im M2 sind es vier bzw. fünf AS.

Der Sequenzunterschied im NP (Abb.14C) betrifft ebenfalls mehrere AS, sowohl zwischen, als auch innerhalb der HPAI- und LPAI-Isolate. Hier ist ebenfalls zu sehen, dass die Unterschiede zwischen den HPAI- und LPAI-Isolaten größer sind als zwischen den beiden H5N1-Isolaten oder zwischen H5N2 und H10N7.

A) M1-Protein

H5N1-Ism-M1	MSLLTEVETYVLSI	PSGPLKAEIAQ	LEDVFAGKNTDLEALMEWLKTRPILSPLTKG	LG	FVFTLTVPSE	RGLQRRRFV	80			
H5N1-c265-M1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	80			
H5N2-M1	-----	v	r	-----	i	-----	80			
H10N7-M1	-----	v	r	-----	i	-----	80			
H5N1-Ism-M1	QNALNGNGDPNNMDRAVKLY	KLKREITFHGAKEVALSYSTGALASCMGLIYNRMGTVTTEVAFGLVCATCEQIADSQHR	160							
H5N1-c265-M1	-----	-----	160							
H5N2-M1	-----	r	-----	160						
H10N7-M1	-----	r	-----	160						
H5N1-Ism-M1	SHRQ	MT	TNPLIRHENRMVLASTTAKAMEQAGSSEQAAEAMEVAN	QARQ	VMQAMRTIGTHP	NS	SAGL	ED	NLLENLQAY	240
H5N1-c265-M1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	240	
H5N2-M1	v	c	-----	s	-----	s	-----	k	d	240
H10N7-M1	v	c	-----	s	-----	s	-----	k	d	240
H5N1-Ism-M1	QKRMGVQMQRFK*									252
H5N1-c265-M1	-----*									252
H5N2-M1	-----*									252
H10N7-M1	-----*									252

B) M2-Protein

H5N1-Ism-M2	MSLLTEVETPTRN EW EC R CSDSSDPLV A ASIIGILHLILWILDRLFFKCIYRRLKYGLKRG P STEGVPESMRE EY RQEQ	80
H5N1-c265-M2	-----	80
H5N2-M2	-----g-----k-----i-----	80
H10N7-M2	-----g-----k-----i-----	80
H5N1-Ism-M2	Q N AVDVDDGHFVNI E LE*	97
H5N1-c265-M2	-----*-----*	97
H5N2-M2	-----s-----v-----*	97
H10N7-M2	-----s-----*-----*	97

C) Nukleoprotein

H5N1-Ism-NP	MASQGT KRS E Q M ETGGERQ N ATEIRASVGR M S GIGRFYIQ M CTELKLSDYEGRLIQNSITIERMVL S AFDERR N LYLE	80
H5N1-c265-NP	-----y-----vg-----k-----	80
H5N2-NP	-----y-----vg-----k-----	80
H10N7-NP	-----y-----vg-----k-----	80
H5N1-Ism-NP	E H PSAGK D PK K TGGPIYRRR R NGKW V RELILYD K EEIRRIWRQANN G EDATAGL H LM I W H SNLNDATYQ R TRALV R T G MD	160
H5N1-c265-NP	-----d-----m-----	160
H5N2-NP	-----d-----m-----	160
H10N7-NP	-----d-----m-----	160
H5N1-Ism-NP	PRMCSLMQ G STLPRRS G AAGA A VK G VT M VMELIRMIK R GIND R N F WR G EN R TRIA Y ERM C NIL K G K FQ T AAQR A MM D	240
H5N1-c265-NP	-----	240
H5N2-NP	-----	240
H10N7-NP	-----	240
H5N1-Ism-NP	Q V RES R NP G NA E IEDL I FLARSAL I LR G SV A HK S CL P AC V YGL A V A SG D Y F ER E GY S LV G ID P FR L L Q NS Q VF S L I RP N E	320
H5N1-c265-NP	-----	320
H5N2-NP	-----	320
H10N7-NP	-----	320
H5N1-Ism-NP	N P A H KS Q L V WM A CH S AA F ED L R V SS F IR G TR V PR G Q L STR G V Q IAS N EM E M DS N TL E LR S RY W A I R T RS G GN T S Q R	400
H5N1-c265-NP	-----n-----s-----n-----	400
H5N2-NP	-----n-----s-----n-----	400
H10N7-NP	-----n-----s-----n-----	400
H5N1-Ism-NP	AS A G Q IS L Q P TF S V Q R N LP F ER A T I MA A FT G N T E G R T S D M R T E I I R MM E S A R P ED V S F Q R G R V F EL S DE K AT N P I V P S F D	480
H5N1-c265-NP	-----v-----k-----k-----L-----	480
H5N2-NP	-----v-----k-----k-----L-----	480
H10N7-NP	-----v-----k-----k-----L-----	480
H5N1-Ism-NP	M N EG S Y F FG D NA E E Y D N *	498
H5N1-c265-NP	-----*-----*	498
H5N2-NP	-----s-----*-----*	498
H10N7-NP	-----s-----*-----*	498

Abbildung 14: Alignment der AS-Sequenz für das NP, M1 und M2 beider H5N1-Isolate, sowie der Isolate von H10N7 und H5N2.

A: Alignment von M1; B: Alignment von M2; C: Alignment des NP.

Grün/türkis: nur in einer Sequenz vorhanden; Rot: nur in HPAI-Sequenz; Gelb: nur in LPAI-Sequenz. H5N1-Ism: A/Mallard/Bavaria/10/2007 H5N1,

H5N1-c265: A/Mallard/Bavaria/1/2006 H5N1

H5N2: A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2, H10N7: A/Mallard/Bavaria/3/2006 H10N7

4.5 Infektionsverlauf in Zellkulturen

Zur weiteren Charakterisierung der beiden HPAI-Stämme A/Mallard/Bavaria/1/2006 H5N1 und A/Mallard/Bavaria/10/2007 H5N1 und der beiden LPAI-Stämme A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2 und A/Mallard/Bavaria/3/2006 H10N7 wurden das Zellspektrum und der Infektionsverlauf in Zellkultur der einzelnen Isolate getestet.

Der Infektionsverlauf der Virusisolate in Zellkulturen verschiedener Herkunft unterschied sich deutlich unter den HPAI- und den LPAI-Isolaten. Während die LPAI-Isolate nur in MDCK- und Caco-2-Zellen einen zytopathogenen Effekt („cytopathic effect“, CPE) aufwiesen, verursachten die HPAI-Isolate auch nach weiteren Passagen und noch in hohen Titrations-Verdünnungsstufen in allen getesteten Zellen einen CPE. Nach Infektion mit den LPAI-Subtypen war der CPE in CRFK und Ma-104-Zellen nach spätestens drei Zellkultur-Passagen völlig verschwunden. Jedoch zeigten beide LPAI-Isolate in der ersten Passage, sowohl in MDCK als auch in Caco-2-Zellen, bis in hohe Verdünnungsstufen eine deutliche Virusvermehrung (Abb.15 und 16).

Das H10N7-Isolat verursachte nach der ersten Passage in MDCK- und in Caco-2-Zellen einen CPE auf (Abb.15). In höheren Passagen waren ein CPE bzw. eine Virusvermehrung auch durch Immunhistochemie nicht mehr nachweisbar

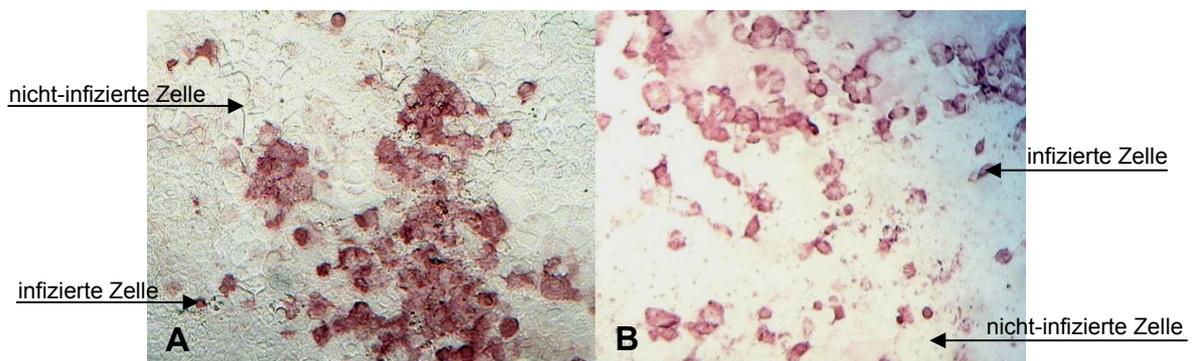


Abbildung 15: Erste Passage nach Infektion von Zellkulturen mit dem H10N7-Isolat.

A: Caco-2-Zellen

B: MDCK-Zellen.

Für das H5N2-Isolat konnte nach MDCK, Ma-104 und CRFK-Zellinfektion ebenfalls ab der dritten Passage lichtmikroskopisch kein CPE mehr festgestellt werden. Die Virusvermehrung zeigte nach der ersten Passage einen abortiven Verlauf. In Caco-2-Zellen hingegen kam es zu einer produktiven Virusvermehrung, die auch in der 10. Passage durch log₁₀ Titration und Immunhistochemie in den hohen Verdünnungen (Abb. 16) noch eindeutig nachweisbar war (10. Viruspassage: M-PCR positiv, Titer 10^{9,5}/ml).

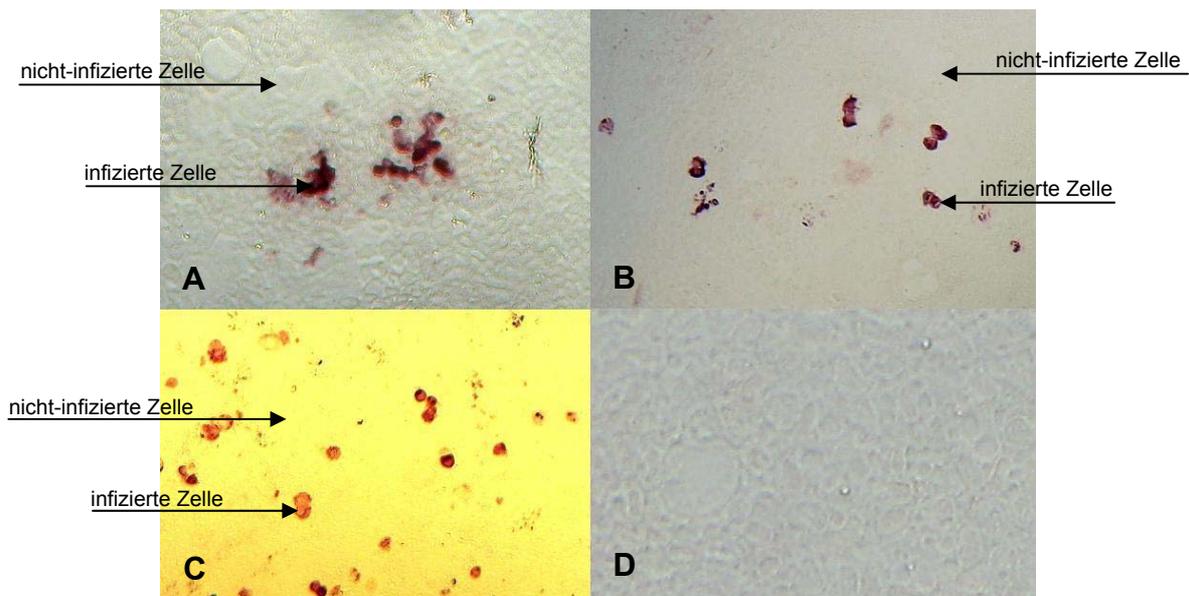


Abbildung 16: Infektion von Zellkulturen mit dem H5N2-Isolat.
 A: Caco-2-Zellen (10. Viruspassage)
 B: CRFK-Zellen (1. Viruspassage, dann abortiv)
 C: MDCK-Zellen (1. Viruspassage, dann abortiv)
 D: MDCK-Zellkulturkontrolle

Beide H5N1-Isolate führten in allen getesteten Zelllinien zu einer produktiven Virusvermehrung. Um einen direkten Vergleich ziehen zu können, wurden beide Virusisolate auf MDCK-Zellen austitriert, um so eine äquivalente Animpfmenge Virus in den anderen Zelllinien als Ausgangsinfektion (multiplicity of infection, MOI) einsetzen zu können. Dazu musste der MDCK-Ausgangstiter von H5N1-Isol 1:100 verdünnt werden, um in gleicher Dosis (MOI) zu H5N1-c265 in den anderen getesteten Zellkulturen eingesetzt zu werden. Die so ermittelten Endpunkttiter sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Die beiden bayerischen H5N1 HPAI-Isolate konnten ein breites Zellkulturspektrum (Primaten, canine, feline und porcine Zellen) zur produktiven Virusvermehrung nutzen. Für beide H5N1-Isolate konnte somit ein ähnliches Replikationsverhalten in den getesteten Zellkulturen nachgewiesen werden.

Tabelle 7: Auflistung der Virustiter^a nach der ersten Passage.

Zelllinie	MDCK		MA-104		Caco-2		CRFK		PK-15	
Beimfung	simultan		simultan		Monolayer		simultan		simultan	
Isolat	c265 ^b	Ism ^c	c265	Ism	c265	Ism	c265	Ism	c265	Ism
Titer /ml	10 ⁸	10 ¹⁰	10 ^{7,5}	10 ⁸	10 ⁸	10 ^{6,75}	10 ^{8,5}	10 ^{7,75}	10 ^{7,5}	10 ^{7,5}

^a Die Titerbestimmung erfolgte über die Beurteilung des CPE und mittels Färbung. Berechnet wurde der jeweilige Endpunkttiter über die Spearman- [Spearman 1908] und Kaerber- [Kaerber 1931] Methode (siehe 3.2.1.2.1).

^b c265: A/Mallard/Bavaria/1/2006 H5N1;

^c Ism: A/Mallard/Bavaria/10/2007 H5N1.

4.6 Natürlichen Reassortantenbildung in der Maus mit den Stämmen A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2 und A/FPV/Bratislava/1979 H7N7

Infektionen mit HPAI-Stämmen können BALB/c-Mäuse in der Regel sehr schnell töten [Evseenko et al., 2007]. Das als LPAI eingestufte H5N2-Isolat hingegen zeigte zumindest in den Caco-2-Zellen einen produktiven Infektionsverlauf über zehn Viruspassagen. AIV H5N2 Subtypen zeigten im Hausgeflügel schon mehrmals eine Virulenzsteigerung zu HPAI mit Krankheitssymptomen und Todesfälle [Okamoto et al., 2007; Gaidet et al., 2008]. Aus diesem Grund wurde das H5N2-Isolat gewählt um seine Pathogenität in der BALB/c-Maus zu prüfen und ferner seine Eignung als Immunisierungsvirus gegen Mäuse-pathogenes HPAI zu testen. Als BALB/c Maus-pathogenes Belastungsvirus wurde dafür A/FPV/Bratislava/1979 H7N7 (FPV-H7N7) gewählt [Neumann et al., 1995].

Die beiden Ausgangsviren A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2 (Mallard-H5N2) und A/FPV/Bratislava/1979 H7N7 (FPV-H7N7) unterscheiden sich in grundlegenden Eigenschaften. FPV-H7N7 (von A/Fowl/Dobson/1927 H7N7 abgeleitet) wird auf Grund seiner Spaltstelle den HPAI-Viren zugeordnet, ist an Mäuse adaptiert und führt bei einer Infektion zu klinischen Erscheinungen. Mallard-H5N2 dagegen konnte aus einer gesunden Jagdente isoliert werden und wird nach seiner HA-Spaltstelle den LPAI-Viren zugeordnet.

Um das Auftreten von klinischen Erscheinungen bei Mäusen nach der Belastung mit FPV-H7N7 einem der Virusisolate zuordnen zu können, bzw. um abzuklären, ob noch Genom des H5N2-Virus in den Mäusen vorhanden ist oder ob die Vermehrung des H7N7-Isolats dominant das Impfvirus verdrängt hat, wurde von den Lungen der infizierten Mäuse eine H5/N7/N1 multiplex RealTime-PCR durchgeführt (Abb.17).

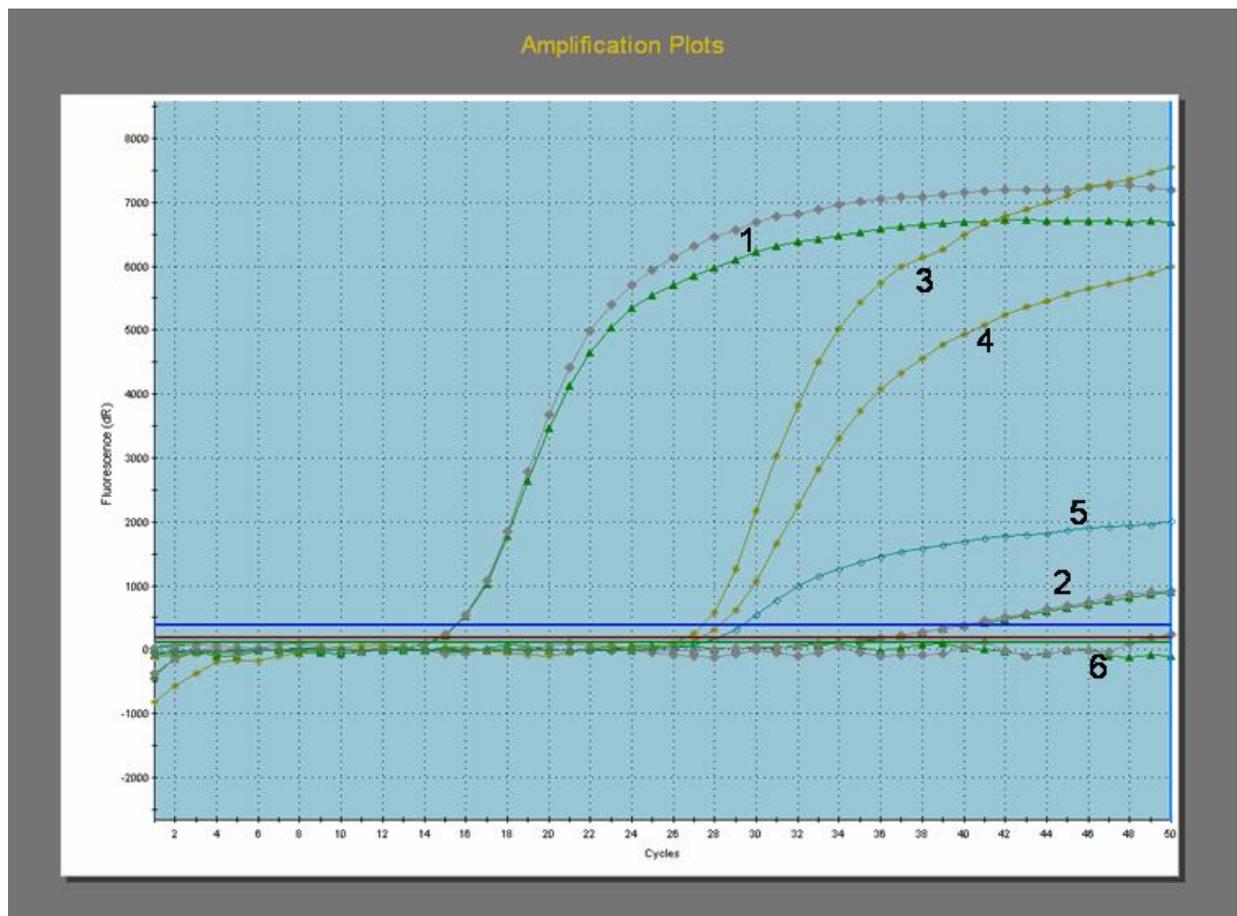


Abbildung 17: H5H7N1 RealTime-PCR nach Gewinnung und reverser Transkription von Gesamt-RNA aus Lungenverreibungen infizierter und erkrankter Mäuse.

1: Doppelprobe mit H7-spezifischen Primern; 2: Doppelprobe mit H5-spezifischen Primern; 3: Positivkontrolle N1; 4: Positivkontrolle H7; 5: Positivkontrolle H5; 6: Doppelprobe mit N1-spezifischen Primern.

Das stark positive Ergebnis für H7 (C_T -Wert 14,79) und das schwach positive Ergebnis für H5 (C_T -Wert 44) zeigen das Vorhandensein von zwei verschiedenen HA-Virussubtypen, da sowohl H5- als auch H7-spezifische DNA nachgewiesen werden konnte. Über Plaquertitration in Ma-104-Zellen erfolgte eine Selektion des H7-Virussubtyps. Das Virus aus den Plaques wurde anschließend weiter in MA-104-Zellen vermehrt und aufgereinigt. Bei

einer weiteren H5H7N1 real-time PCR war in dem gereinigten H7-Virus keine spezifische H5-DNA mehr detektierbar. Damit wurde evident, dass das Maus-adaptierte Belastungsvirus FPV-H7N7 den LPAI Subtyp H5N2 verdrängt hatte, nachdem zumindest die H5-Hämagglutininkomponente mit der RealTime-PCR nicht mehr nachweisbar war. Nach der genannten Triplex-RealTime-PCR war jedoch der NA-Subtyp noch unklar. Weil auch kein N1-spezifisches Signal mehr zu erkennen war, obwohl die N1-Positivkontrolle einwandfrei funktioniert hatte (Abb 17, Nr. 4) lag der Verdacht nahe, dass ein Reassortantenvirus entstanden war.

4.6.1 Charakterisierung des Reassortantenvirus

Für eine erste Charakterisierung eines möglichen Reassortantenvirus wurde nach der Plaquereinigung Gesamt-RNA des Virus gewonnen und jedes Segment mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die Vorabtypisierung von HA und NA erfolgte wiederum über eine H5/H7/N1-RealTime-PCR und führte nur zu einem positiven Ergebnis für H7. Die Präsenz von H5- und N1-spezifischer DNA konnte nicht nachgewiesen werden (Abb.18).

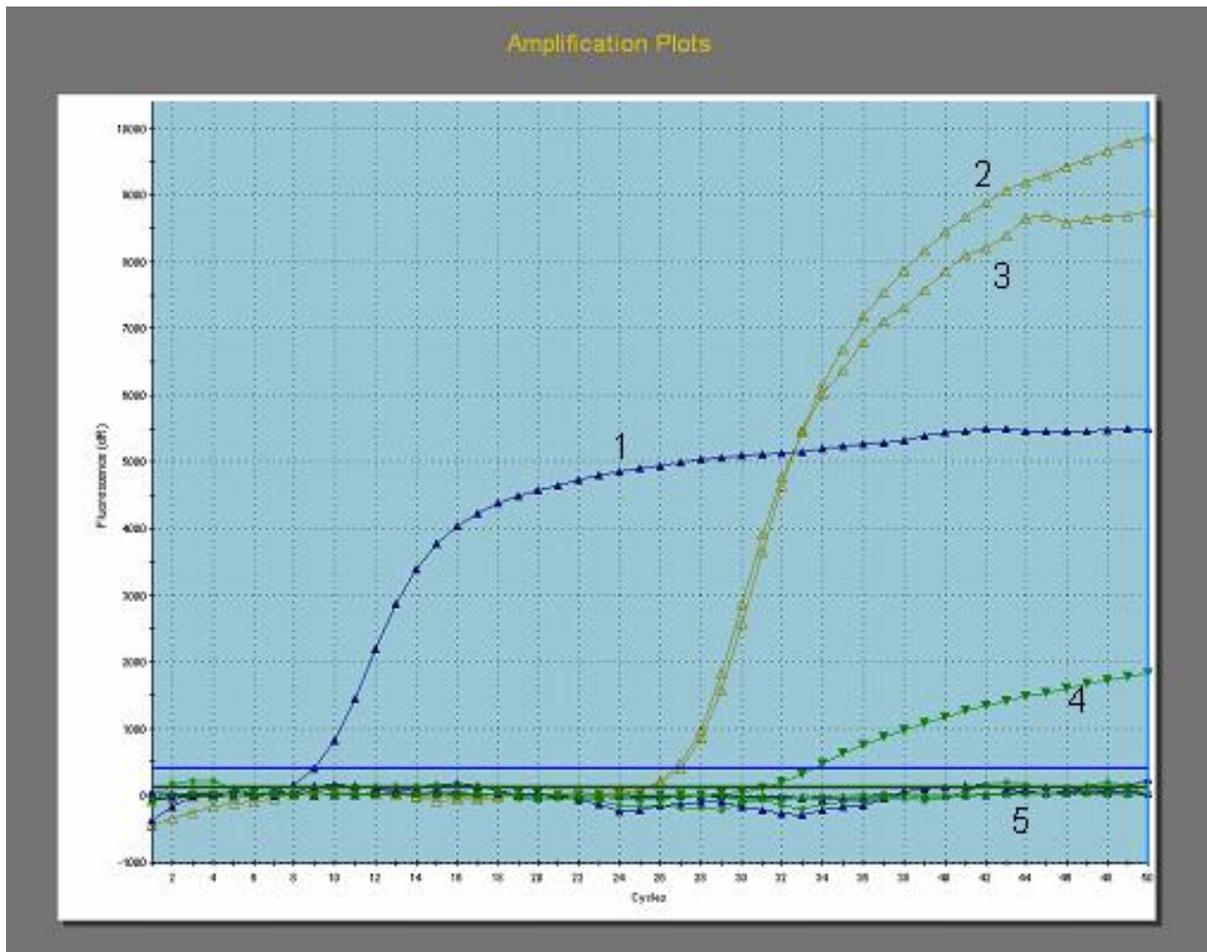


Abbildung 18: RealTime-PCR des H7N2-Virusisolats nach Plaquereinigung über Ma-104-Zellen. Ausschließlich H7-spezifische DNA konnte nachgewiesen werden, H5- und N1-spezifische DNA war nicht nachweisbar.

1: Probe mit H7-spezifischen Primern; 2: Positivkontrolle mit H7-spezifischen Primern; 3: Positivkontrolle mit N1-spezifischen Primern; 4: Positivkontrolle mit H5-spezifischen Primern; 5: Negativkontrollen und H7-Virusisolat mit H5- und N1-spezifischen Primern.

Um den NA-Supty des H7-Virus eindeutig zuzuordnen zu können, wurde mittels spezifischer Primer für N1 (INF-23/24), N2 (INF-11/12) und N7 (INF-47/48) in einer konventionellen PCR der NA-Subtyp ermittelt (Abb.19). Das Ergebnis war die spezifische PCR-Amplifikation eines NA-Fragmentes des Subtyps N2. Weder N1- noch N7-spezifische DNA konnte nachgewiesen werden (Abb. 19).

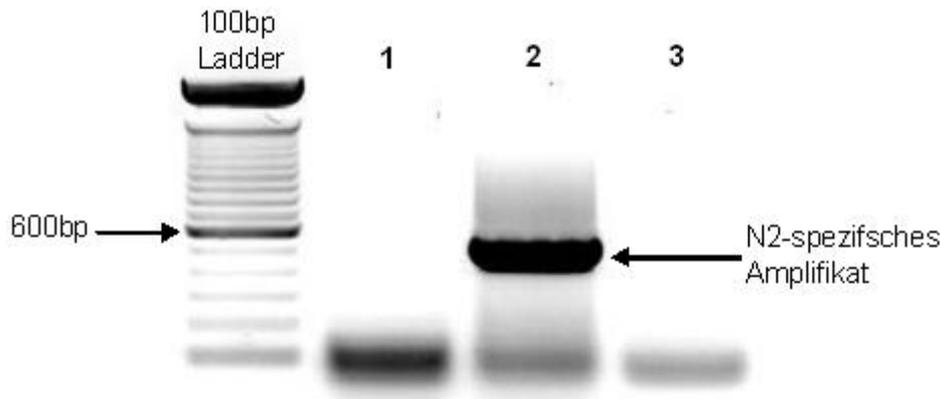


Abbildung 19: Agarosegelelektrophorese nach einer konventionellen PCR zur Amplifikation N1-, N2- und N7-spezifischer DNA aus den Lungenverreibungen der erkrankten Mäuse. 1: N1-spezifische Primer INF23/24; 2: N2-spezifische Primer INF-11/12; 3: N7-spezifische Primer INF-47/48.

Die RNA aus allen so geprüften Virusplaques (n=20) ergab in der konventionellen RT-PCR für die drei NA-Subtypkomponenten das in Abb. 18 gezeigte Ergebnis. Somit hatte sich in der BALB/c-Maus ein Reassortantenvirus vom Subtyp H7N2 auf natürlichem Wege gebildet und hatte zumindest im hier untersuchten Lungengewebe alle anderen evtl. aufgetretenen Reassortantenviren, sowie das H5N2-Impfvirus als auch das H7N7-Belastungsvirus, verdrängt.

4.6.1.1 Gesamtgenom-Vergleich von H7N2, H5N2 und H7N7

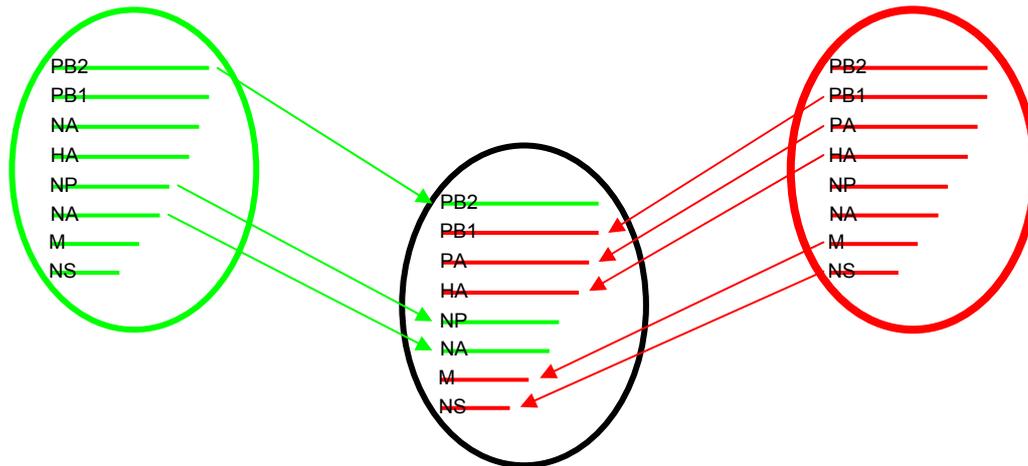
Um eine exakte molekulare Charakterisierung des Reassortantenvirus vorzunehmen wurde durch direkten Vergleich sowohl der Nukleotid-, als auch der AS-Sequenzen der Ausgangsviren mit dem Gesamtgenom des in der BALB/c-Maus neu entstandenen Subtyps H7N2 (Siehe Anhang 7.3) die Herkunft der einzelnen Gensegmente des neuen H7N2 nachgewiesen.

Das entstandene Reassortantenvirus weist somit eine 5:3 Verteilung der Segmente auf, wobei fünf Segmente von dem HPAI-Belastungsvirus H7N7, und drei Segmente von dem LPAI-Virus H5N2 stammen. PB2, NP und NA stammen von dem für die BALB/c-Maus apathogenen H5N2 A/Mallard/Bavaria/1/2005. Die restlichen fünf Genomsegmente sind A/FPV/Bratislava/79 H7N7 zuzuordnen. Die Abbildung 20 zeigt schematisch nach dem Ergebnis des Gesamtgenom-Vergleichs die Zuordnung der

Genomsegmente aus den beiden ursprünglich zur Infektion der BALB/c-Mäuse verwendeten AIV Subtypen zur neu entstandenen Reassortante. Das maßgeblich für die molekulare Einteilung in HPAI und LPAI verantwortliche HA (Spaltstelle) stammt von dem HPAI-Virus H7N7 (Anhang 7.3). Damit kann man das Reassortantenvirus H7N2 ebenfalls den HPAI-Viren zuordnen.

A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2 LPAI

A/FPV/Bratislava/79 H7N7 HPAI



A/Mallard/Bavaria/1-R/2005 H7N2 HPAI

Abbildung 20: Schematische Darstellung der Segmentverteilung im Reassortantenvirus H7N2.

4.6.1.2 Zellspektrum des Reassortantenvirus H7N2

Es galt die Frage zu klären, ob das neue HPAI A/Mallard/Bavaria/1-R/2005 H7N2 Reassortantenvirus einen ähnlichen Infektionsverlauf in Zellkultur aufweist wie andere HPAI-Isolate, insbesondere die hier geprüften beiden bayerischen HPAI-H5N1-Isolate. Unklar war umgekehrt, ob das Reassortantenvirus, wegen der Genomsegmente des LPAI H5N2-Isolats, eventuell einen den LPAI-Viren ähnlichen abortiven Infektionsverlauf zeigt.

Der Infektionsverlauf in Zellkultur des Reassortantenvirus H7N2 war vergleichbar mit dem Infektionsverlauf in Zellkultur der beiden H5N1-Isolate. In allen getesteten Zelllinien (MDCK, MA-104, Caco-2 und CRFK) konnte eine Virusvermehrung mit Ausbildung von CPE nachgewiesen werden (Tab.8 und Abb.21).

Das Ergebnis der Zellkultur-Infektionsversuche entsprach den Ergebnissen mit den HPAI-H5N1-Viren, die in allen Zellen zu einer produktiven Infektion fähig waren.

Tabelle 8: Virustiter^a des Reassortantenvirus H7N2 (KID_{50} /ml) nach der ersten Passage.

Zelllinie	MDCK	MA-104	Caco-2	CRFK
Beimpfung	Simultan	Simultan	Monolayer	Simultan
Titer 1. Passage	10^9 /ml	$10^{8,1}$ /ml	10^8 /ml	$10^{9,5}$ /ml

^a Titerberechnung siehe 3.2.1.2.1

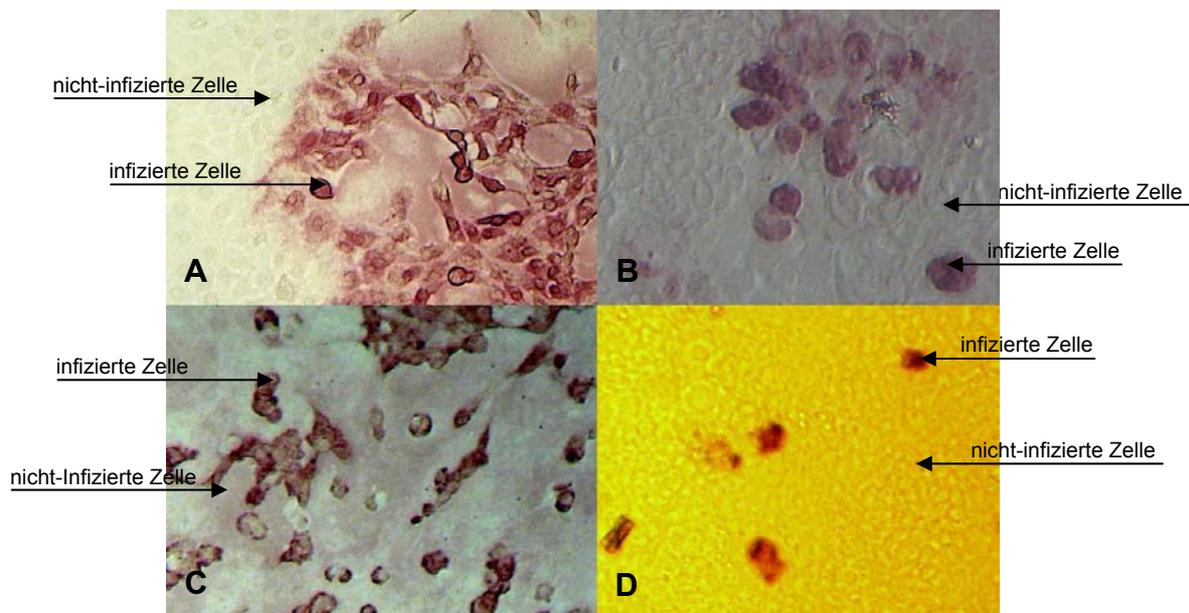


Abbildung 21: Darstellung von Infektionen des Reassortantenvirus H7N2 in verschiedenen Zelllinien.

A: Ma-104-Zellen, B: Caco-2-Zellen, C: MDCK-Zellen, D: CRFK-Zellen.

4.7 Kodierende Genbereiche der AIV-Isolate mit Virulenzbezug

Neben der Spaltstelle, deren AS-Sequenz die Einteilung in HPAI und LPAI bedingt, gibt es noch weitere Virulenzfaktoren. Diese sind meist an eine einzige oder wenige AS gebunden und geben ebenfalls Auskunft über die potentielle Gefahr, die vor allem von einem nach der HA-Spaltstellensequenz als HPAI definierten Virus ausgehen kann.

4.7.1 Vergleich der Virulenz zweier H5N1-Viren in der Maus

H5N1-c265, H5N1-Ism und H5N1-Ism-CRFK gehören auf Grund der HA-Spaltstelle zu den HPAI-Viren. Im Bereich HA-Spaltstelle unterscheiden sie sich nur in einer AS-Position (Abb.22).

H5N1-c265	RMEFFWWTILKPNDAINFESNGNFIAPENAYKIVKKG DSTI	280
H5N1-Ism-Ei-----	4
H5N1-Ism-CRFK-----	4
H5N1-c265	MKSELEYGNCNTK C Q T P I G A I N S S M P F H N I H P L T I G E C P K	320
H5N1-Ism-Ei	-----	44
H5N1-Ism-CRFK	-----	44
H5N1-c265	YVKS N R L V L A T G L R N S P Q E R R R K K R G L F G A I A G F I E G G W	360
H5N1-Ism-Ei	----- e -----	84
H5N1-Ism-CRFK	----- e -----	84
H5N1-c265	QGMVDGWYGYHHSNEQGSYAADKESTQKAIDGVTNKVNS	400
H5N1-Ism-Ei	-----	124
H5N1-Ism-CRFK	-----	124
H5N1-c265	I I D K M N T Q F E A V G R E F N N L E R R I E N L N K K M E D G F L D V W T Y	440
H5N1-Ism-Ei	-----	129
H5N1-Ism-CRFK	-----	129

Abbildung 22: Alignment der Spaltstellenregion von H5N1-c265, H5N1-Ism-Ei und H5N1-Ism-CRFK.

Nachdem der Austausch einzelner Aminosäuren in verschiedenen Genen der AIV mit Auswirkungen auf die Virulenz in der Maus beschrieben wurde [Katz et al., 2000, Chen et al., 2007] stellte sich die Frage, ob der Unterschied in einer Aminosäure in der HA-Spaltstellenregion evtl. von Bedeutung ist. Die mit H5N1-c265 infizierten BALB/c-Mäuse starben auch mit geringen Infektionsdosen sehr schnell (Abb.23). Im Gegensatz dazu war H5N1-Ism nach der Eivermehrung nur in hohen Dosen (1×10^6 pfu) relativ schwach virulent in der Maus mit einer Letalität von 20% (Abb.24). Interessant war,

dass sich das Isolat H5N1-Ism nach nur einer Passage in CRFK-Zellen (H5N1-Ism-CRFK) als hoch virulent für BALB/c-Mäuse erwies, mit nur 40% Überlebensrate bei Applikation von 1×10^5 pfu (Abb.24).

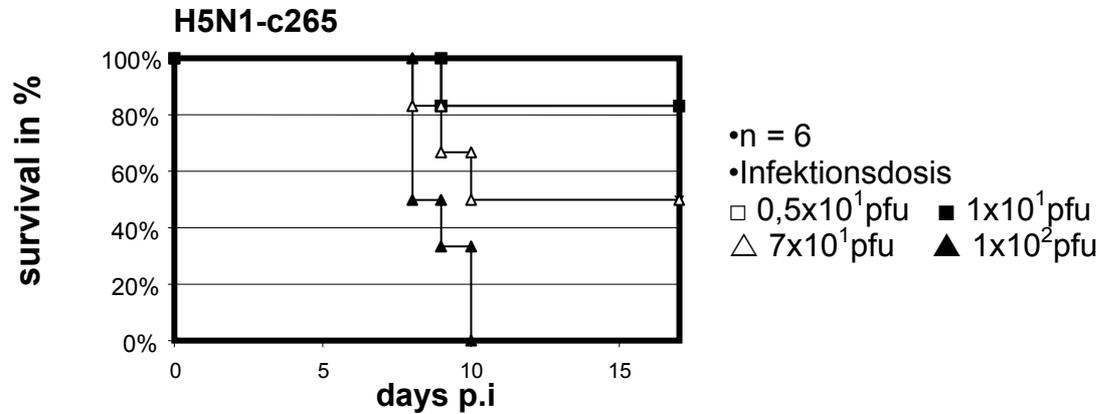


Abbildung 23: Überlebensrate von BALB/c-Mäusen nach Infektion mit H5N1-c265.

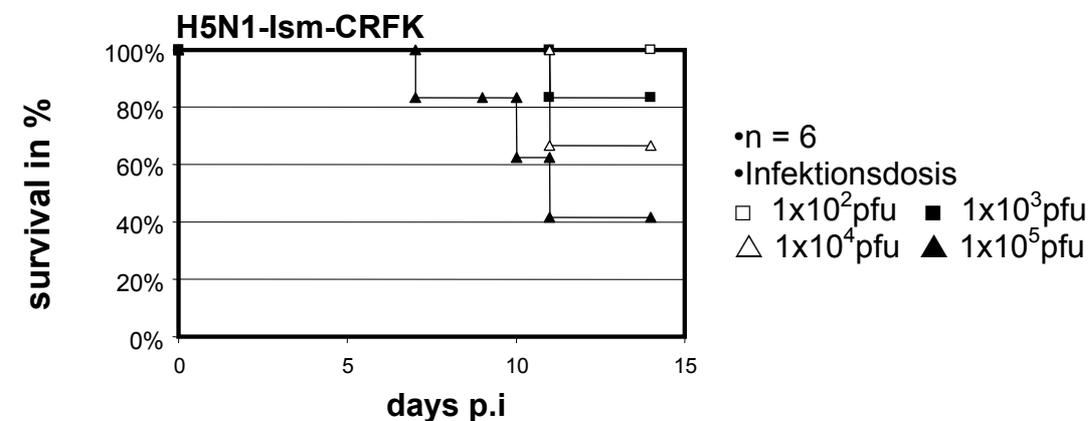
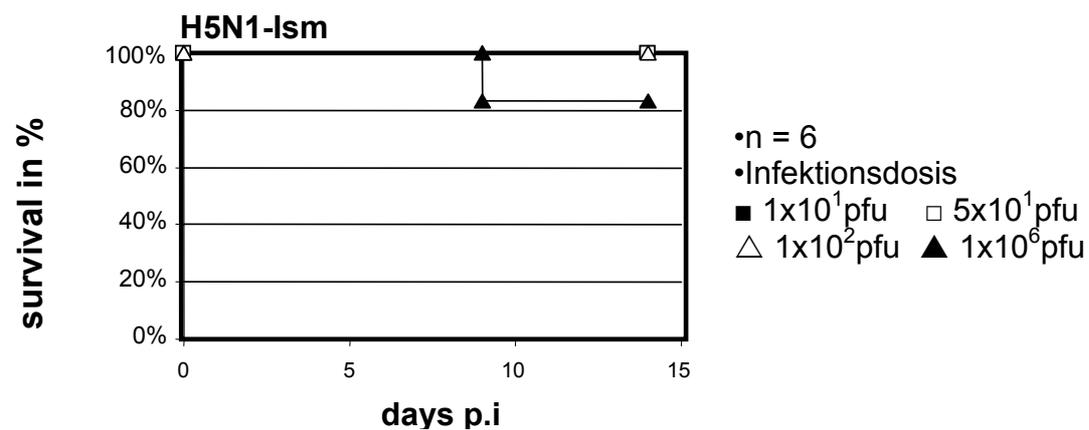


Abbildung 24: Überlebensrate von BALB/c-Mäusen nach Infektion mit H5N1-Ism und H5N1-Ism-CRFK.

Der Vergleich der Viruslast (Abb.25) von Lungen und Gehirnen von BALB/c-Mäusen nach der Infektion mit H5N1-Ism-CRFK zeigte deutlich, dass H5N1-Ism-CRFK keinen Neurotropismus aufweist. Stattdessen wird als klassischer Manifestationsort das Lungengewebe bevorzugt.

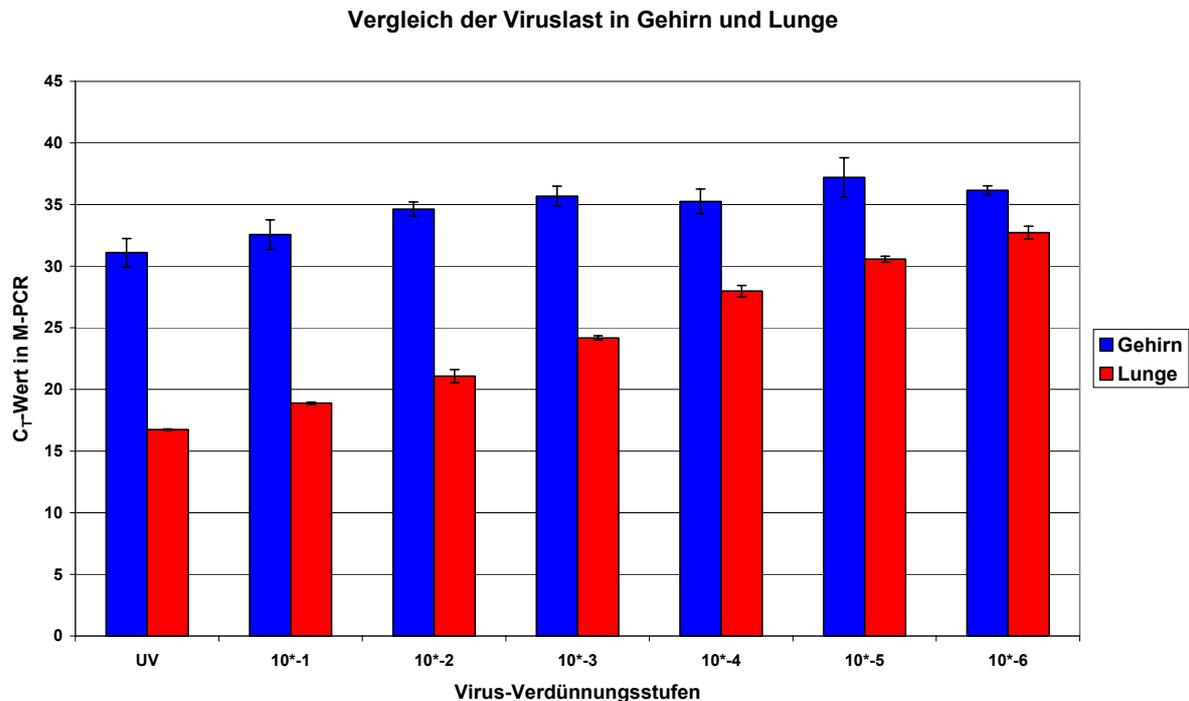


Abbildung 25: C_T-Werte der M-PCR von Lungen- bzw. Gehirnverreibungen von, mit H5N1-Ism-CRFK infizierten, BALB/c-Mäusen. Die Mäuse wurden am vierten Tag nach der Infektion euthanasiert.

uv = unverdünnt, 10⁻¹ = 10⁻¹ verdünnt, etc.

Wenn man davon ausgeht, dass eine Verschiebung von 3,33 C_T-Werten nach oben bei einer optimalen Vervielfältigung, d.h. eine Verdopplung der vorhandenen Amplifikate pro Zyklus, einer 1:10 Verdünnung entspricht, befindet sich in den unverdünnten Lungengeweben der infizierten Mäuse eine ca. 10000-fach höhere Viruslast als in den unverdünnten Gehirnverreibungen derselben Mäuse. Da die Virusgenomlast in den Gehirnverreibungen auch unverdünnt schon recht gering ist, erkennt man keinen Verdünnungseffekt in den C_T-Werten der real-time PCR.

Infektionsversuche mit CRFK- bzw. MDCK-Zellen erbrachten ein vergleichbares Ergebnis wie die real-time PCR. Die Virustiter der

Lungenverreibungen waren in beiden Zellkulturen ähnlich hoch und lagen im Durchschnitt bei $10^{6,17}$ /ml in MDCK-, bzw. bei $10^{6,42}$ /ml in CRFK-Zellen. Eine Virusvermehrung hingegen war, nach Inokulation von Gehirnverreibungen, in beiden Zellkulturen nicht nachweisbar. Neben der HA-Spaltstellensequenz sind noch verschiedene andere Genombereiche der Influenza A Viren als molekulare Indikatorbereiche für Virulenz beschrieben [Carr et al., 2006, Fechter et al., 2003, Li et al., 2006, Cononello et al., 2007]. Aus diesem Grund sollte eine schnelle und einfache Methode zur Erfassung und molekularen Charakterisierung einiger dieser Genombereiche entwickelt werden.

4.7.2 Funktion einer Multiplex-PCR

Zur Charakterisierung und um besseren Screening der Influenza A Viren wurde zusätzlich eine Multiplex-PCR etabliert.

Um möglichst viele, vermeintlich wichtige, Virulenzfaktoren-kodierende Bereiche mit einem PCR-Ansatz zu erhalten, wurden die in der Literatur beschriebenen Genombereiche von zahlreichen, in der NCBI-Datenbank hinterlegten Sequenzen, miteinander verglichen und die Primer in hoch konservierte Sequenzregionen gelegt (verwendete Primer s. 2.3.2).

Da die zu amplifizierenden Genomabschnitte nicht die Oberflächenproteine HA und NA beinhalteten, sollte die PCR subtypunabhängig sein und wurden mit Isolaten folgender Subtypen getestet (Abb.26):

A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2	H5N2
A/Mallard/Bavaria/1-R/2005 H7N2	H7N2
A/Mallard/Bavaria/1/2006 H5N1	H5N1-c265
A/Mallard/Bavaria/10/2007 H5N1	H5N1-Ism
A/Mallard/Bavaria/3/2006 H10N7	H10N7
A/Swine/Belzig/2/2001 H1N1	Sw-H1N1
A/Equine/Prag/1/1956 H7N7	Eq-H7N7

Die Kombination von vier Primerpaaren, benannt nach den Zielregionen (PB2, NP, PB1 und NS1), erwies sich als besonders günstig.

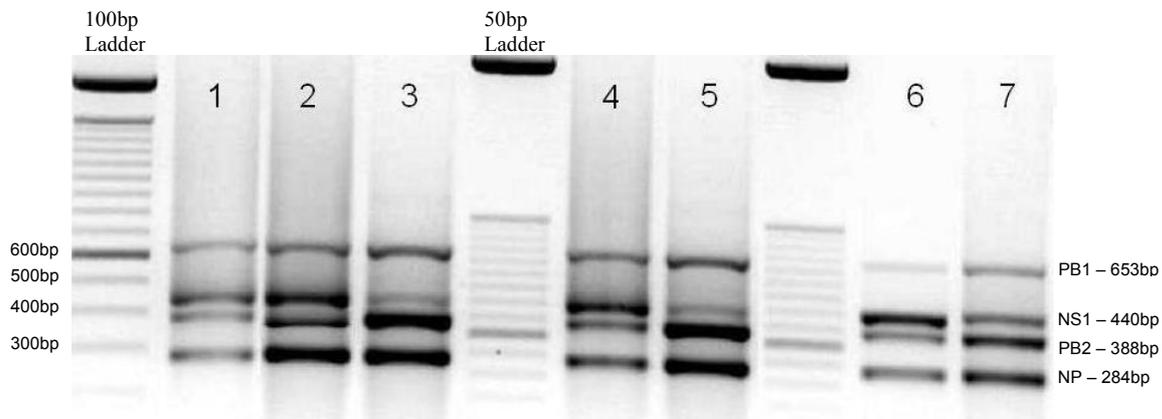


Abbildung 26: Agarosegelelektrophorese nach Multiplex-PCR.

1: H5N2; 2: H7N2; 3: H5N1-c265; 4: H10N7; 5: H5N1-Ism; 6: Sw-H1N1; 7: Eq-H7N7.

Alle PCR-Produkte der eingesetzten Isolate zeigten das erwünschte Bandenmuster, allerdings in unterschiedlicher Stärke. Darüber hinaus gelang es auch nicht-aviäre Isolate zu testen, die ebenfalls die erwarteten DNA-Fragmente aller vier zu amplifizierenden Genomabschnitte zeigten. Eine direkte Gewinnung der amplifizierten DNA aus dem Gel zur anschließenden Sequenzierung war für alle Fragmente der Isolate möglich.

4.7.2.1 Vergleich kritischer Genombereiche beider H5N1 Viren

Unabhängig von der unterschiedlichen Pathogenität in der Maus, unterscheiden sich die beiden H5N1-Isolate A/Mallard/Bavaria/1/2006 (H5N1-c265) und A/Mallard/Bavaria/10/2007 (H5N1-Ism) auch in anderen kritischen Genombereichen. Da sich H5N1-Ism-CRFK im Vergleich zu H5N1-Ism als virulent in BALB/c-Mäusen erwies, wurde H5N1-Ism-CRFK mit in den Vergleich einbezogen um mögliche Unterschiede von H5H1-Ism und H5N1-Ism-CRFK zu erkennen.

In Tabelle 9 sind in der Literatur beschriebene wichtige AS-Positionen in Genombereichen aufgelistet, die mit bekannten Virulenzfaktoren korrelieren.

Tabelle 9: Sequenzunterschiede auf AS-Ebene zwischen H5N1-c265^a, H5N1-Ism^b und H5N1-Ism-CRFK^c mit Angabe der kritischen Aminosäure-position nach den Literaturhinweisen zu Virulenzauswirkungen

Kritische AS-Position nach Literaturangaben	A/Mallard/Bavaria/1/2006 H5N1 H5N1-c265	A/Mallard/Bavaria/10/2007 H5N1 H5N1-Ism	A/Mallard/Bavaria/10/2007 H5N1 H5N1-Ism-CRFK
PB2 ₆₂₇	E	K	K
PB1 ₁₉₈ PB1 ₃₁₇ PB1 ₃₇₂	K M M	K M V	K M V
PB1-F2 ↓N66S↑	S	S	S
PA ₅₁₅	T	T	T
PA ₄₀₀	S	S	S
*465	V	I	I
HA-Schnittstelle	PQ G E RRR KKR GLF	PQ G E RRR KKR GLF	PQ G E RRR KKR GLF
HA-Signalpeptid	MEK I MLLLAI V SLVKS	MEK I VLLLAI I NLVKS	MEK I VLLLAI I NLVKS
HA ₅₃₂	V	A	A
NP ₄₁₈₋₄₂₆	LPFERATIM	LPFERATIM	LPFERATIM
*10	Y	H	H
*101	D	N	N
*379	N	S	S
NA ₁₄₆ (126)	N	N	N
NA ₁₄₉ (129)	I	V	V
NA ₂₄₇ (228)	S	N	N
NA ₃₃₄ (312)	T	T	T
NA ₄₃₀ (410)	R	R	R
*39	P	L	L
*41	G	R	R
*228	S	N	N
*320	P	L	L
*337	V	A	A
*412	K	E	E
NS1 ₁₄₉	A	A	A
NS2 ₁₀₀	M	M	M

^a A/Mallard/Bavaria/1/2006 H5N1

^b A/Mallard/Bavaria/10/2007 H5N1

^c A/Mallard/Bavaria/10/2007 H5N1 nach einer Passage in CRFK-Zellen.

Das Numbering im NA bezieht sich auf das N2-Numbering mit A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2 als Referenzstamm und gibt auch die N2-Position an (in Klammern steht die interne Position). AS mit * richten sich nach der Sequenz-internen Nummerierung.

Rot unterlegte AS bezeichnen AS in einem für die Maus pathogenen Stamm, blau unterlegte AS bezeichnen das Vorkommen in für Mäuse apathogenen Stämmen. Schwarz unterlegte AS können nicht eindeutig mit Pathogenität assoziiert werden.

Obwohl das A/Mallard/Bavaria/10/2007 (H5N1-Ism) Isolat bei der für die Pathogenität in Mäusen und Menschen wichtigen AS PB2₆₂₇ die

virulenzindikative Variante K aufweist, war das Isolat für Mäuse apathogen. Hingegen zeigte das A/Mallard/Bavaria/1/2006 (H5N1-c265) Isolat bei PB2₆₂₇ die apathogene AS E, war aber für Mäuse hoch virulent.

Im PB1-Protein besitzt das H5N1-c265 an Position 372 ein Methionin, welches sich als relevant für die Pathogenität in Mäusen erwiesen hat [Li et al., 2005]. Alle anderen beschriebenen Aminosäuren im PB1-Protein unterscheiden sich in den beiden H5N1-Isolaten nicht.

Die PA-Proteine beider H5N1-Isolate unterscheiden sich in keiner beschriebenen Aminosäure.

Die HA-Proteine beider H5N1-Isolate unterscheiden sich an insgesamt 11 Positionen. Drei dieser AS-Unterschiede liegen im Signalpeptid (SP) am N-Terminus an Position 5, 11 und 12. Direkt in der Spaltstelle an Position 323 besitzt das H5N1-c265 Isolat ein Glycin, das H5N1-lsm Isolat hingegen eine Glutaminsäure.

Eine weitere beschriebene AS mit Virulenzbezug [Hulse-Post et al., 2007] liegt an Position 532 (Positionsbezeichnung nach Abspaltung des SP). H5N1-c265 besitzt an dieser Position die für hohe Virulenz indikative Aminosäure Valin, während das H5N1-lsm Isolat an dieser Position ein Alanin besitzt. Weitere beschriebene AS sind in beiden Isolaten identisch. Die restlichen unterschiedlichen AS befinden sich an nicht weiter beschriebenen Positionen.

Die NP beider H5N1-Isolate unterscheiden sich nur in nicht weiter beschriebenen AS an Position 10, 101 und 379 (mit initialem Methionin an Position 1). Weitere beschriebene AS mit Hinweisen auf Virulenzunterschiede sind in beiden Isolaten identisch [Pantin-Jackwood et al., 2007, Gabriel et al., 2007, Li et al., 2005].

Die NA beider H5N1-Isolate weisen sieben Unterschiede in ihren AS-Sequenzen auf. Zwei dieser Unterschiede, an Position 146 (129) und 247 (228), sind beschrieben [Ward, 1995]. Die weiteren fünf Unterschiede liegen an nicht näher beschriebenen Positionen. In der Literatur für molekulare Identifikation von Pathogenität und Virulenzunterschiede beschriebene AS befinden sich an den Positionen 146 (126), 334 (312) und 430 (410). Sie unterscheiden sich innerhalb beider Isolate aber nicht.

Sowohl die M1- als auch die M2-Proteine sind auf AS-Ebene bei beiden H5N1-Isolaten vollkommen identisch. Sie unterscheiden sich lediglich in ihrer Nukleotid-Sequenz. Daher gibt es auch bei beschriebenen AS in diesen Proteinen keine Unterschiede.

Die NS1-Proteine beider H5N1-Isolate sind auf AS-Ebene identisch. Das NS2-Protein weist im Vergleich innerhalb beider H5N1-Isolate drei Unterschiede in der AS-Sequenz an den Positionen 34, 50 und 60 auf. Beschriebene AS an Position 48 und 100 [Li et al., 2005, Dubrovina et al., 1995] sind in beiden Isolaten gleich.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Unterschiede an manchen AS-Positionen vorhanden sind, diese aber nicht mit den in der Literatur definierten Virulenz-assoziierten Loci bekannter Stämme übereinstimmen.

4.8 Ergebnisse der Impfungen beim Schwein

Da eine intranasale HPAI-H5N1-Infektion bei Schweinen im Versuch bislang kaum klinische Erscheinungsbilder hervorrief [Lipatov et al., 2008], wurden hier mit inaktiviertem HPAI-H5N1 Ferkel immunisiert, um die Immunantwort nach Umgehung der natürlichen Eintrittspforten (intramuskulär) zu prüfen. Die Sekretion von Interferon- α (IFN- α) und Interferon- γ (IFN- γ) durch PBMC wurde nach *in vitro* Re-Stimulation mit unterschiedlichen aviären und nicht-aviären Influenza A Viren untersucht. Die Blutentnahme und Gewinnung der PBMC erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten während des Impf- und Boostverlaufs. H7N2-Infektionen bei Schweinen sind ausschließlich experimenteller Natur und kommen unter natürlichen Bedingungen nicht vor. Daher sollte in einem zweiten Impfversuch getestet werden, ob die Zahl IFN- γ sekretierenden Zellen vergleichbar mit denen bei einer experimentellen H5N1-Infektion ist, bzw. ob es nach Restimulation der porcinen PBMC zur Sekretion von IFN- α in den Zellkulturüberstand kommt.

4.8.1 H5N1-Impfversuch mit naiven Ferkeln

4.8.1.1 Interferon- γ Sekretion von porcinen PBMC

Um möglichst genau aussagen zu können, ab wann es zu einer vermehrten Sekretion von IFN- γ kommt, wurden die PBMC zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewonnen (Abb.6). Darüber hinaus sollte getestet werden, ob es einen Unterschied in der Sekretion gibt, wenn dem inaktivierten Impfvirus ein Adjuvans beigefügt wird. Als Stimulus für die gewonnenen PBMC wurden die in Tabelle 10 aufgeführten Virusstämme und Substanzen eingesetzt.

Abbildung 27 zeigt den Verlauf der IFN- γ Sekretion der PBMC von Schweinen in den beiden untersuchten Gruppen (n=5/Gruppe).

Tabelle 10: eingesetzte Stimuli

Virusstamm / Stimulus	Abkürzung
A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2	S-52
A/Mallard/Bavaria/1/2006 H5N1 (Impfvirus)	S-51
A/Mallard/Bavaria/ H11N1	S-111
A/Swine/Belzig/2/2001 H1N1	S-11
A/Swine/Belzig/54/2001 H3N2	S-32
A/Mallard/Bavaria/1-R/2005 H7N2	S-72
ORF D1701 (Adjuvanskontrolle)	ORF
Concanavalin A (ConA) (Positivkontrolle)	ConA
RPMI-Medium	RPMI
MDCK-Zellkulturüberstand	MDCK-ÜS

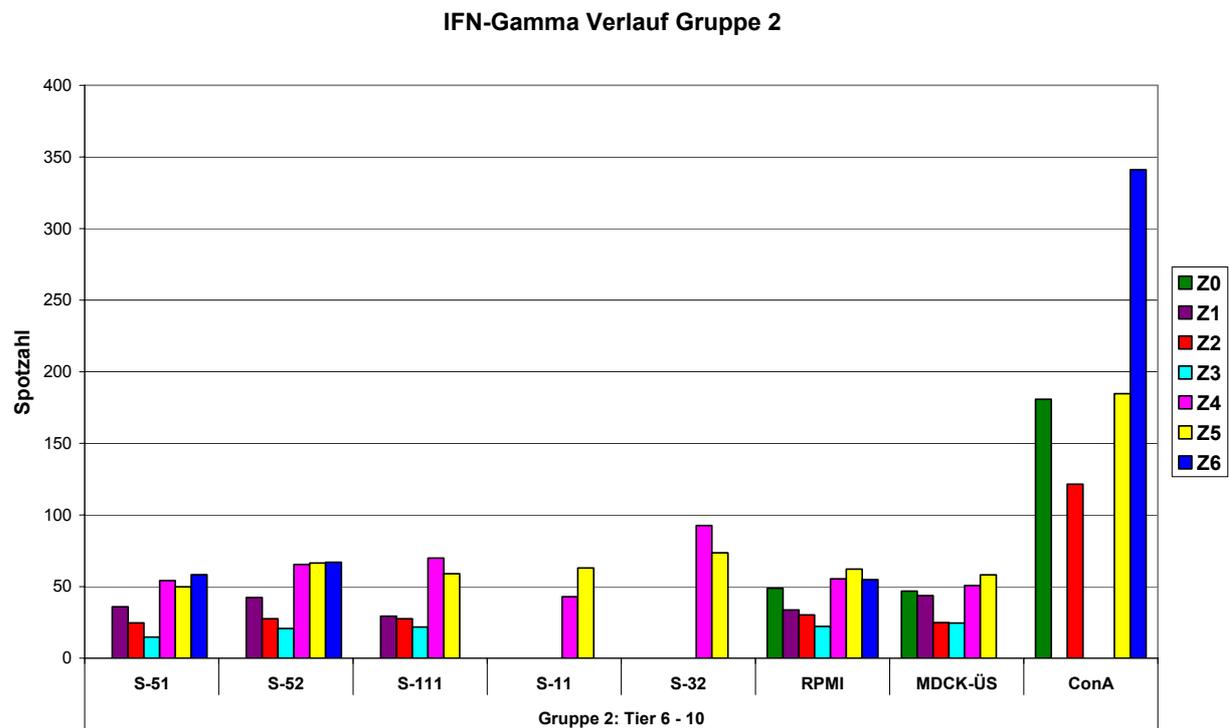
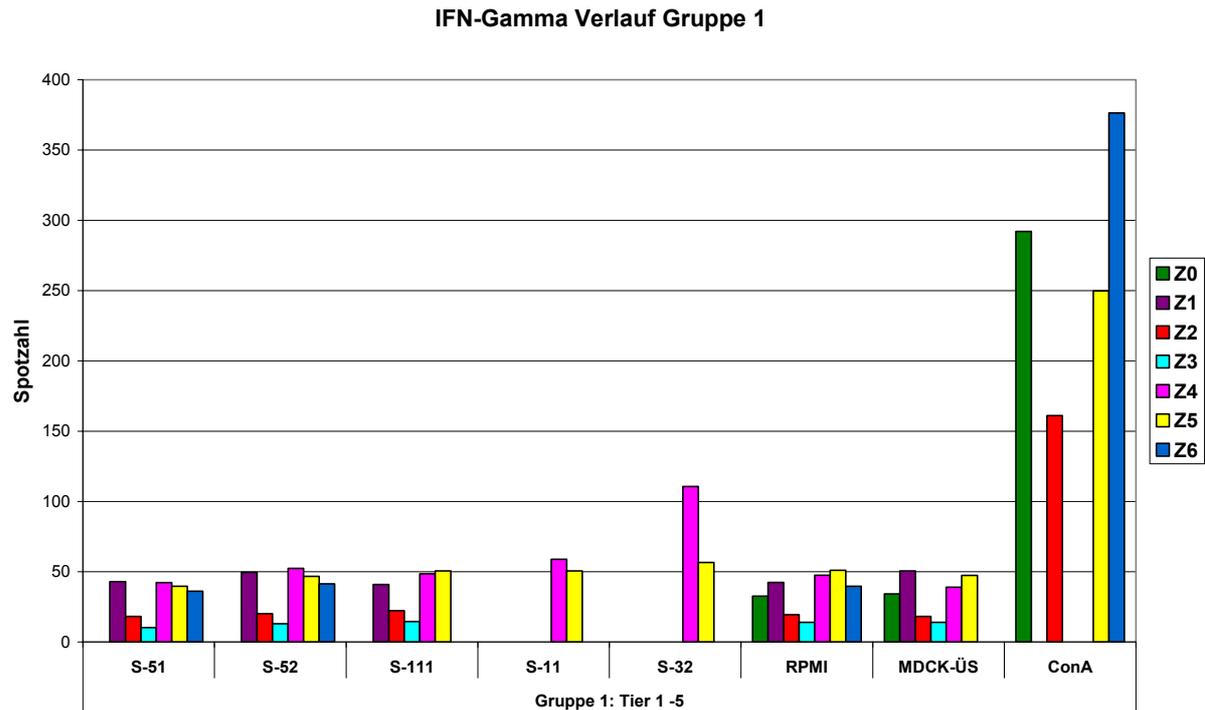


Abbildung 27: Schematischer Verlauf der IFN- γ Sekretion der PBMC nach Stimulation mit unterschiedlichen Influenza A Subtypen. Dargestellt ist auch der Vergleich der beiden Gruppen: Verabreichung des Impfvirus ohne Immunstimulus (Gruppe 1), bzw. Verabreichung des Impfvirus mit Immunstimulus (Gruppe 2). Z0 – Z6 siehe Abb. 6.

Es ist deutlich erkennbar, dass im Vergleich zur Stimulation mit RPMI-Medium oder mit MDCK-Zellkulturüberstand, keine deutlich höhere Menge an IFN- γ sekretiert wird, wenn die PBMC mit anderen Influenza A Virusstämmen stimuliert werden. Bei den PBMC der Tiere aus Gruppe 1 zeigt ausschließlich die Stimulation mit dem H3N2-Isolat am Zeitpunkt Z_4 (zwei Wochen nach der 2. Vaccinierung) eine deutlich höhere Menge an IFN- γ sekretierenden Zellen als die Kontrolle. Die Spotzahlen nach ConA-Stimulation zeigen zwischen Z_0 und Z_2 ebenfalls einen starken Abfall. Allerdings kommt es nach Z_2 zu keinem weiteren Abfall der Zahl von IFN- γ sekretierenden Zellen, sondern sogar wieder zu einem Anstieg über den Wert von Z_0 hinaus.

Bei den Tieren der Gruppe 2 ist der Verlauf der Spotzahlen nach Stimulation der PBMC mit dem H3N2-Virusisolat sowie mit RPMI-Medium, MDCK-Zellkulturüberstand und ConA nahezu identisch zum Verlauf der Spotzahlen bei Gruppe 1. Bei Gruppe 2 erfolgte bei der Stimulation der PBMC mit dem H1N1-Virusisolat kein Abfall der Spotzahlen zwischen Z_4 und Z_5 . Auch die Spotzahlen nach einer Stimulation mit dem H5N2-Virusisolat nehmen ab dem Zeitpunkt Z_4 weiter zu. Ein Anstieg der Spotzahlen ist ebenfalls zwischen Z_5 und Z_6 nach der Stimulation der PBMC mit dem H5N1-Virusisolat zu erkennen. Zwischen Gruppe 1 und Gruppe 2 ist kein signifikanter Unterschied in der IFN- γ Sekretion der PBMC der Schweine zu erkennen. Bei allen Tieren kam es zwischen Z_1 und Z_3 zu einem Abfall der Spotzahlen und zu einem starken, sprunghaften Anstieg zum Zeitpunkt Z_4 . Dieser sprunghafte Anstieg ist vermutlich auf die Boost-Wirkung der zweiten Vaccinierung zurück zu führen.

4.8.1.2 Antikörperbildung von H5N1-immunisierten Ferkeln

Obwohl es nach der Immunisierung mit inaktiviertem H5N1-c265 Virus und Vaccinierung mit aktivem H5N2-Vollvirus an Zeitpunkt Z_5 mit anschließender *in vitro* Re-Stimulation der PBMC mit unterschiedlichen Stimuli zu keinem deutlichen Anstieg an IFN- γ sekretierenden Zellen kam, ist eine Veränderung der ELISA-Antikörper-Titer zu erkennen (Abb.28+29).

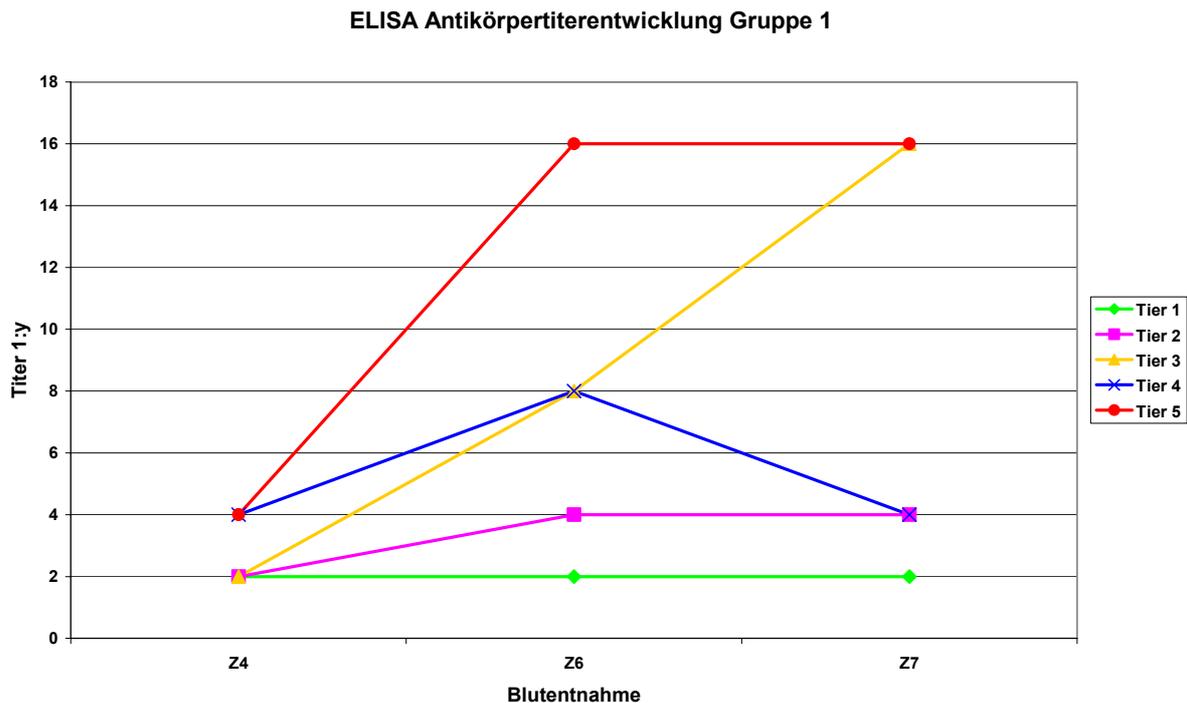


Abbildung 28: Dargestellt ist der Verlauf der Serum-Antikörpertiter der Tiere aus Gruppe 1

Die Titerentwicklung in Seren der Tiere aus Gruppe 1 (Abb.28) zeigt keinen einheitlichen Verlauf. Tier 1 zeigt keinerlei Veränderung, Tier 2 und Tier 5 verzeichnen zwischen Z_4 und Z_6 einen Anstieg, zeigen aber anschließend keine Veränderung mehr im Titer. Tier 4 hat einen Titeranstieg zwischen Z_4 und Z_6 , zeigt aber zwischen Z_6 und Z_7 einen Abfall des H5-Titers. Ausschließlich Tier 3 zeigt einen kontinuierlichen Anstieg des Antikörpertiters.

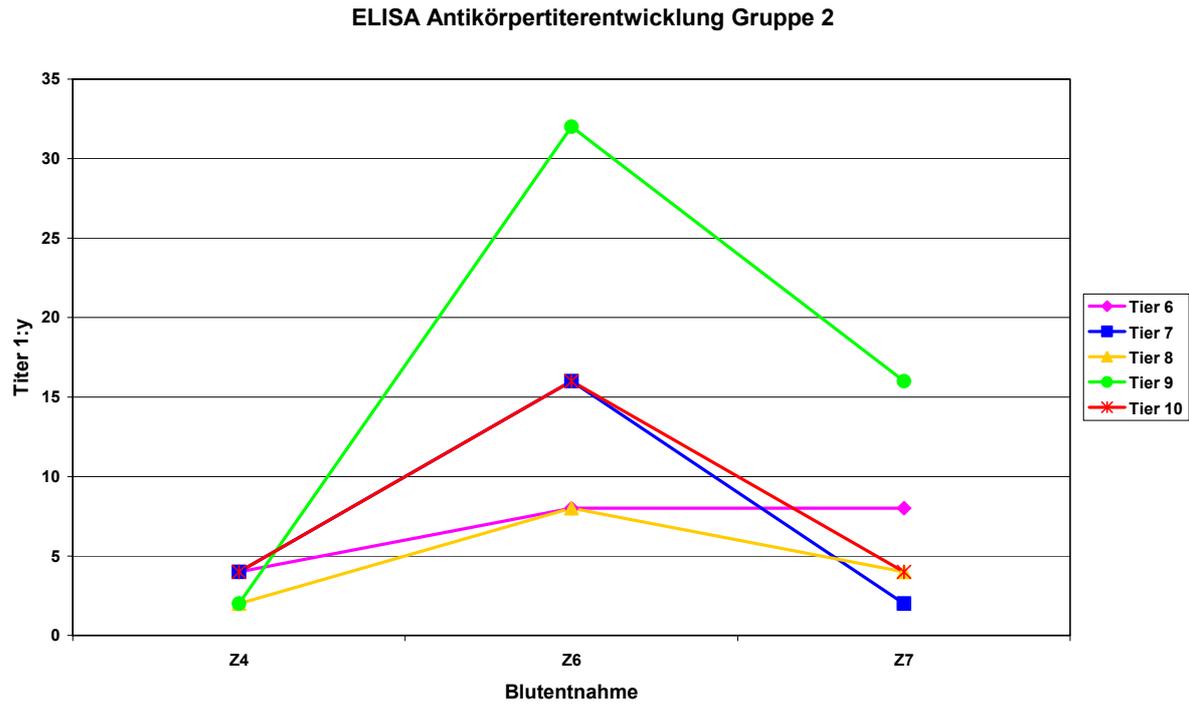


Abbildung 29: Verlauf der Serum-Antikörpertiter bei den Tieren aus Gruppe 2.

Bei den Seren der Tiere aus Gruppe 2 (Abb.39) ist im Unterschied zu Gruppe 1 eine mehr oder weniger einheitliche Entwicklung der ELISA-Antikörpertiter zu erkennen. Mit Ausnahme von Tier 6, zeigen alle anderen Tiere nach einem anfänglichen Titeranstieg zwischen Z_4 und Z_6 einen Titerabfall zwischen Z_6 und Z_7 . Tier 6 zeigt nach einem Titeranstieg zwischen Z_4 und Z_6 keine weitere Veränderung der Serumantikörper.

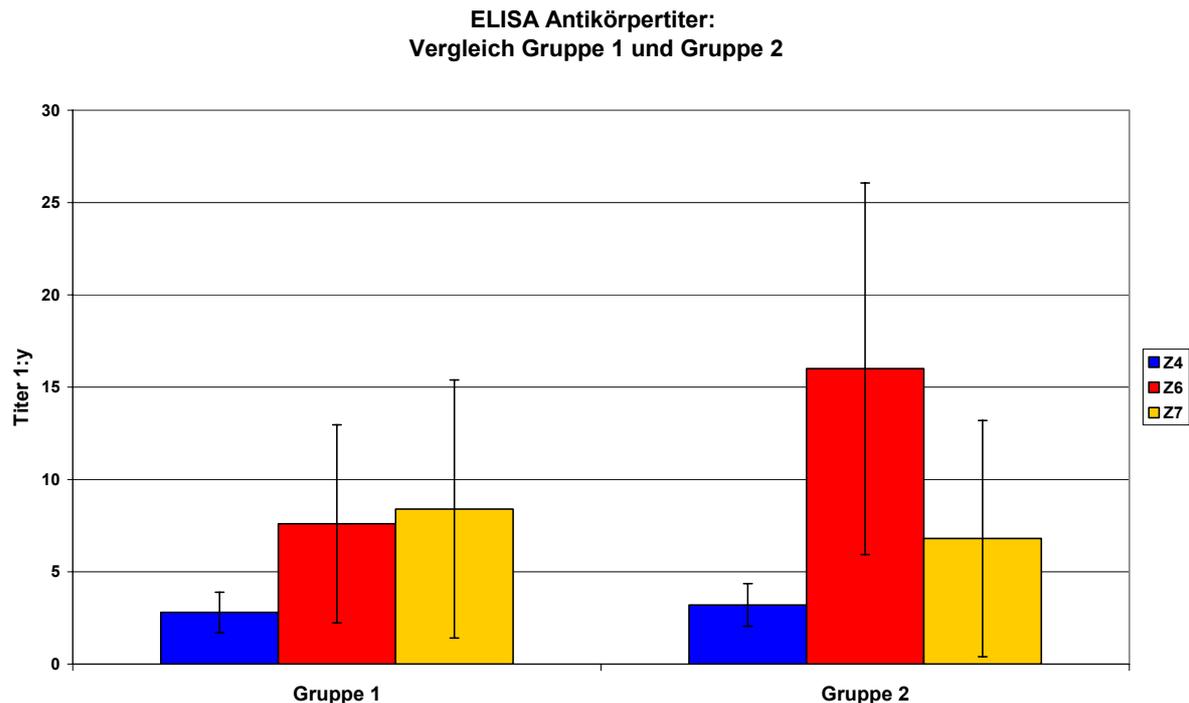


Abbildung 30: Vergleich der ELISA-Antikörper der Tiere beider Impfgruppen (Gruppe 1 H5N1 inaktiviert; Gruppe 2 H5N1 inaktiviert mit Immunstimulans)

Im direkten Vergleich der Serumantikörper der Tiere beider Gruppen (Abb.30) ist vor allem zu erkennen, dass es, im Gegensatz zu Gruppe 1, bei den Tieren aus Gruppe 2 zu einem starken Anstieg zwischen Z_4 und Z_6 , zwischen Z_6 , danach jedoch (Z_6 zu Z_7) zu einem starken Abfall der Antikörpertiter kam. Alle Antikörpertiterunterschiede waren nicht spezifisch.

4.8.2 H7N2-Impfversuch mit adulten Schweinen

Um einen Vergleich zwischen H5N1- und H7N2-immunisierten Schweinen machen zu können, wurden drei Tiere nach folgendem Schema immunisiert. Neben der Anzahl an $\text{INF-}\gamma$ sekretierenden Zellen, sollte in diesem Versuch auch die antivirale Wirkung von Zellkulturüberständen getestet werden. Das Impfschema und die Blutentnahme zur Gewinnung der PBMC erfolgte wie in Abbildung 7 gezeigt.

4.8.2.1 Interferon- γ Sekretion durch PBMC der H7N2-immunisierten Schweine

Die Anzahl an INF- γ sekretierenden Zellen wurde, wie bei 4.7.1, mit der EliSpot-Methode bestimmt. Um möglichst genau aussagen zu können, ob und wann es zu einer veränderten Anzahl von INF- γ sekretierenden Zellen kommt, wurden die PBMC zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewonnen (Abb.31).

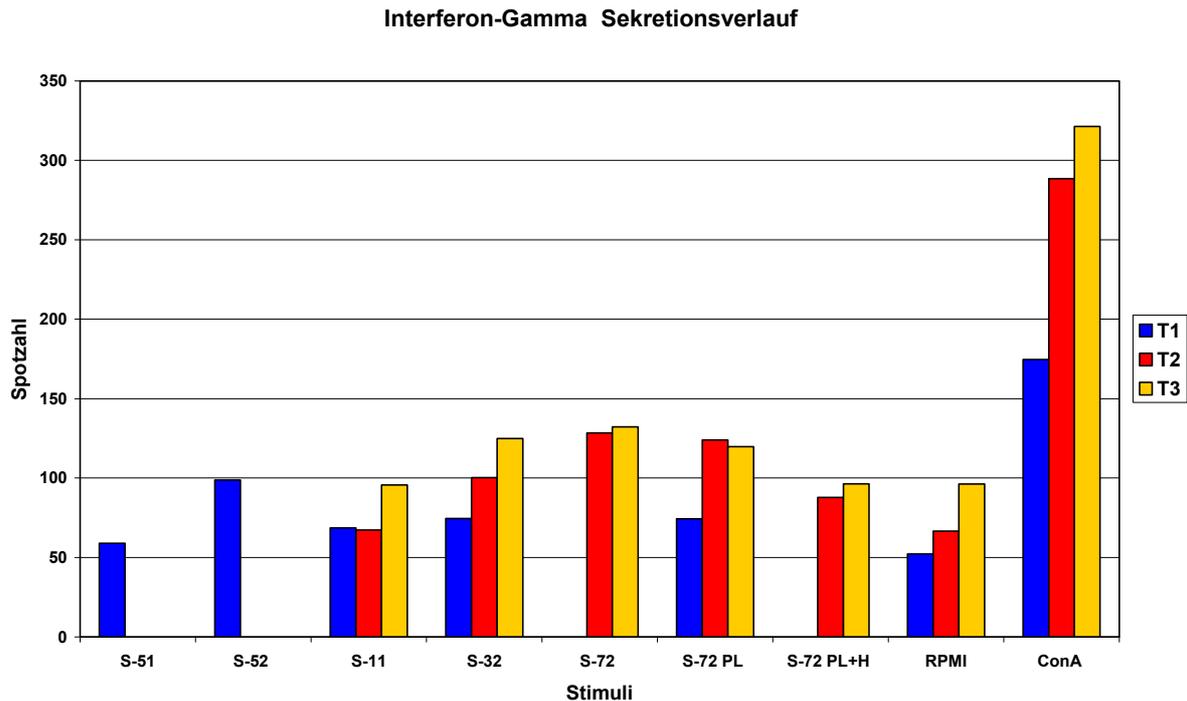


Abbildung 31: Schematischer Verlauf der IFN- γ Sekretion der PBMC der H7N2-immunisierten Schweine nach Stimulation mit unterschiedlichen Influenza A Virusstämmen (siehe Tab. 10).

Im Vergleich zu den H5N1-immunisierten Ferkeln ist bei den H7N2-immunisierten adulten Schweinen ein Anstieg der Interferon- γ Sekretion bei fast allen eingesetzten Stimuli zu erkennen. Bei allen Stimuli kommt es zwischen der ersten und der zweiten Messung zu einem Anstieg von IFN- γ sekretierenden Zellen gegenüber der RPMI-Kontrolle. Lediglich bei Stimulation mit dem PL-inaktivierten Impfvirus (S-72 PL) erfolgt bei T₃ eine Abnahme der Spotzahlen. Alle anderen eingesetzten Stimuli führen auch bei T₃ zu einem Anstieg der Spotzahlen. Dennoch ist auch bei den H7N2-immunisierten Schweinen zu erkennen, dass es im Vergleich der Stimulation mit RPMI oder

anderen Influenza A Virusstämmen keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl an IFN- γ sekretierenden Zellen gibt.

4.8.2.2 Antivirale Wirkung von Zellkulturüberständen

Um zu untersuchen, ob es einen Unterschied in der VSB antiviralen Wirkung gibt, welche stimulierte PBMC in den Zellkulturüberstand sekretierten, wurden PBMC der H7N2-immunisierten Schweine mit unterschiedlichen Stimuli angeregt und die Menge an IFN- α äquivalente Wirksamkeit der Überstände bestimmt.

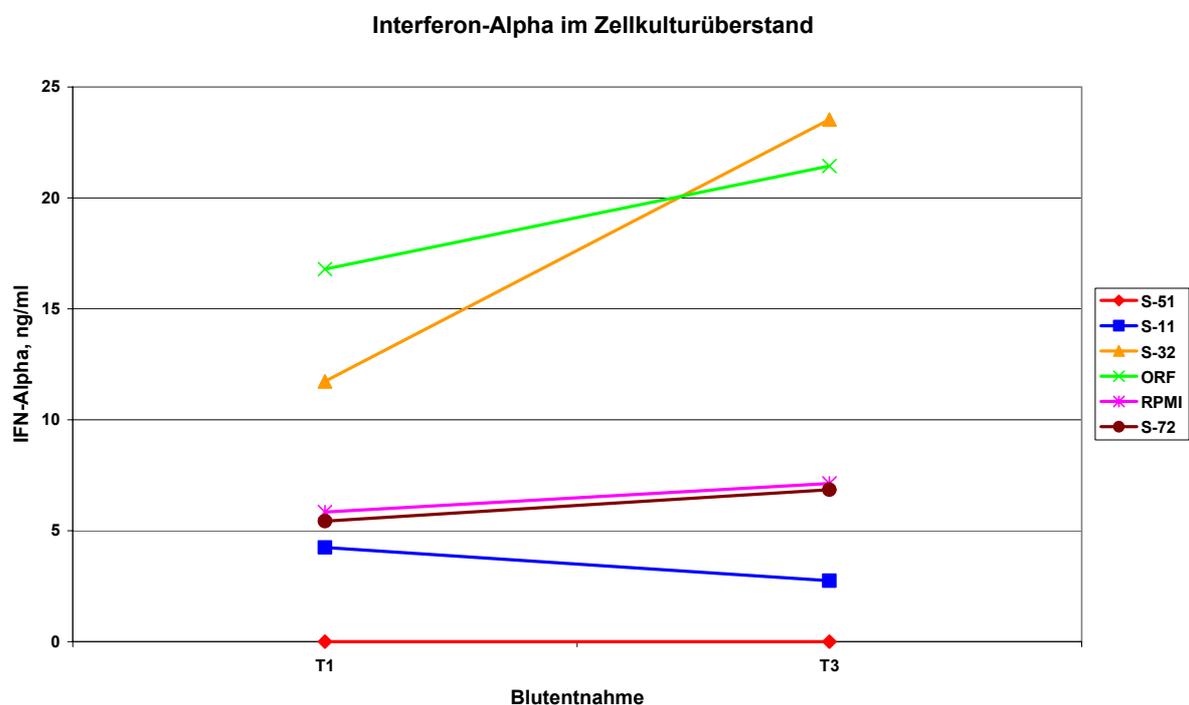


Abbildung 32: Darstellung der sekretierten Menge an IFN- α durch Stimulation der PBMC mit unterschiedlichen Stimuli zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

In Abbildung 32 zeigt sich, dass S-51 als Stimulus verwendet zu beiden Zeitpunkten die PBMC nicht zu einer Sekretion von IFN- α anregt. S-11 führt zwar zur Sekretion von IFN- α , allerdings ist die Ausschüttung geringer als bei Stimulation der PBMC mit RPMI. S-32 (H3N2) ist der einzige Stimulus, der zu antiviraler Aktivität der PBMC-Überstände führt (ausgedrückt in IFN ng/ml gemessen an der Roferon[®] Wirkung).

5 DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung neuer Isolate aviärer Influenza A Viren aus Bayern. Der Wahl der Isolate, die in die vergleichenden Untersuchungen einbezogen wurden, lagen mehrere Kriterien zu Grunde: Zwei H5N1-HPAI Isolate, welche ein unterschiedliches Krankheitsgeschehen auslösen sollten, ein potentiell pathogenes H5-Isolat mit einer LPAI-Spaltstelle und ohne Neuraminidase Subtyp N1, sowie ein nach allen Richtlinien als LPAI einzustufendes Isolat. H5N1-c265 und H5N1-lsm erfüllten diese Bedingungen für die HPAI-Isolate: H5N1-c265 war in der Maus pathogen, H5N1-lsm hingegen nicht. Das H5N2-Isolat besaß eine LPAI-Schnittstelle und erfüllte somit die Voraussetzungen. Darüber hinaus werden H5N2-Viren oftmals als Impfviren eingesetzt [Phillippa et al., 2007; Van Goot et al., 2008], wodurch dieses Virusisolat noch interessanter war. Das H10N7-Isolat war nach allen Kriterien als LPAI-Isolat einzustufen und somit als Vergleichsisolat bestens geeignet.

Die Entwicklung von Primern für das Hämagglutinin und die Neuraminidase ermöglichte eine vollständige Subtypisierung für alle in die Studie einbezogenen Isolate. Durch die NA-Suchprimer war es auch möglich, den Neuraminidase-Subtyp des H10-Isolats zu bestimmen und Primer für eine vollständige Sequenzierung zu konstruieren. Da H10N7-Isolate in der Literatur bisher nicht viel beschrieben wurden, bestärkte dies die Wahl dieses Isolates für die Studie.

Durch Sequenzvergleiche mit in der NCBI-Datenbank hinterlegten Sequenzen konnte für alle Isolate eine vermeintliche Herkunft bestimmt werden. Die beiden H5N1-Isolate unterschieden sich unter einander und zu verschiedenen Stämmen, u.a. *A/Duck/Switzerland/V389/2006* [Hofmann et al., 2008], *A/Cygnus olor/Czech Republic/10732/2007* [Nagy et al., 2009] neben der Spaltstelle noch in zahlreichen anderen Aminosäuren im Hämagglutinin. Der BLAST-Vergleich zeigte für beide Isolate unterschiedliche Ursprünge an. Dies bestätigte die Vermutung, dass es in den Jahren 2006 und 2007 zu

mindestens zwei unabhängigen Viruseinträgen nach Bayern kam [Starick et al., 2008; Rinder et al., 2007]. Das H5N2-Isolat könnte durchaus aus einem Reservoir in Bayern stammen. Die größte Ähnlichkeit im Hämagglutinin zeigten Isolate aus Italien, den Niederlanden [Fouchier et al., 2005] und Schweden [Munster et al., 2005] (Stand Okt. 2008). Große Ähnlichkeit in der Neuraminidase zeigte ein, ebenfalls aus einer in Bayern geschossenen, gesunden Jagdente isoliertes, H5N2-Virus aus dem Jahr 2007 [Acc.No. FJ648284]. Dabei unterschieden sich die NA-Sequenzen beider Isolate in lediglich drei Aminosäuren. Dies legt den Schluss nahe, dass für dieses Virus ein Reservoir in der bayerischen Wassergeflügelpopulation zu finden ist. LPAI-Viren existieren häufig in einem ausgewogenen Gleichgewicht mit adaptierten Wirten, aus denen sie in regelmäßigen Abständen erneut in Erscheinung treten. In Gegenden mit kalten Wintern können Influenza A Viren gut überwintern und in den folgenden Jahren in Gewässern mit reichem Wildvogelaufkommen immer wieder Ausgangspunkt für neue Infektionen über den fäkal-oralen oder fäkal-kloakalen Infektionsweg darstellen [Ito et al., 1995]. Dies würde den Umstand erklären, dass eine Jagdente aus Bayern (Öttingen) aus dem Jahr 2008 (Jagd September 2008) einen H5N2-Subtyp aufweist, dessen N2, nach einem Sequenz-Vergleich, der Neuraminidase des H5N2-Isolates am ähnlichsten ist.

Die HA-Spaltstelle des H5N1-Ismaning Isolats zeigte eine Besonderheit auf, da die Aminosäure-Sequenz PQEERRRKKR GLF, mit einer Glutaminsäure (E) an Position 3 nach dem initialen Prolin (P), bisher nicht in der Datenbank bekannt war. Eine BLAST-Suche in der NCBI-Datenbank, sowie in der „Influenza Sequence Database, ISD“ (www.flu.lanl.gov) erbrachte keine Übereinstimmungen mit anderen hinterlegten Sequenzen. Dennoch besteht die Möglichkeit, dass diese Aminosäure-Sequenz der HA-Spaltstelle bei einem Geflügelpestausbuch im Oktober 2008 in Sachsen im Hämagglutinin vorlag. Diese Vermutung wird durch das Vorhandensein einer Wobblebase an der für diese Aminosäure kodierenden Nukleotid-Sequenz bestärkt [AIV, Lagebericht 4, Oktober 2008].

Die molekulare Analyse weiterer ausgewählter Influenza A Virus Genombereiche umfasste neben der vollständigen Sequenz von Hämagglutinin und Neuraminidase, auch die vollständigen Sequenzen des Matrix- sowie des Nukleoproteins. Beide Proteine spielen eine wichtige Rolle im Infektionsverlauf und der Pathogenität, sind aber nicht dem gleichen hohen Selektionsdruck wie das Hämagglutinin und die Neuraminidase ausgesetzt [Boon et al., 2006; Hui et al., 2003]. Der Sequenzunterschied von NP und M1, bzw. M2 war innerhalb der LPAI-Viren (H5N2 und H10N7) und der HPAI-Viren (H5N1-Isolate) geringer als zwischen den LPAI- und HPAI-Viren. Dies könnte sich dadurch erklären, dass sich die Infektionsverläufe von HPAI- und LPAI-Viren stark unterscheiden [Mo et al., 1997; Hsieh et al., 2006]. Da jedoch nicht alles von den Oberflächenproteinen Hämagglutinin und Neuraminidase abhängt, müssen sich auch die internen Gene zwischen LPAI- und HPAI-Viren unterscheiden und die Proteine einen Einfluss auf den Infektionsverlauf (lokal begrenzt für LPAI oder generalisiert bei HPAI) und die Schwere der Infektion ausüben, bzw. Resistenzen und somit schwerer Infektionsverläufe bedingen können [Schnell et al., 2008; Jiao et al., 2007]

Im Infektionsverlauf der untersuchten aviären Influenza A Virusisolate in unterschiedlichen Zellkulturen zeigten sich große Unterschiede zwischen den LPAI- und den HPAI-Viren. Das H10N7-Isolat war auf MDCK- und Caco-2-Zellen in der ersten Passage noch vermehrungsfähig und führte zu einem deutlichen CPE, konnte jedoch in weiteren Passagen auch nach Anfärbung mit spezifischen Antikörpern nicht mehr nachgewiesen werden. Dies könnte daran liegen, dass H10-Viren, oder allgemein LPAI-Viren ohne H5- oder H7-Komponente, einen abortiven Infektionsverlauf in den meisten nicht-aviären Zellkulturen haben [Avery, 1975; Portincasa et al., 1990; Gujuluva et al., 1994].

Das H5N2-Isolat war, wie das H10N7-Isolat, in der ersten Passage sowohl auf MDCK-, CRFK- als auch auf Caco-2-Zellen vermehrungsfähig, in weiteren Passagen konnte es jedoch in MDCK- und CRFK-Zellen nicht mehr nachgewiesen werden. Im Gegensatz zum H10N7-Isolat war das H5N2-Isolat jedoch auch nach der 10. Passage in Caco-2-Zellen noch mit einem sehr

hohen Titer vorhanden. Die Caco-2-Zelllinie ist die einzige humane Zelllinie, die in dieser Untersuchung eingesetzt wurde und die erste humane Zelllinie, die eine stete Replikation von Influenza A Viren erlaubt [Zhirnov et al., 2007]. Es handelt sich dabei, anders als bei den anderen eingesetzten Zelllinien, um Intestinalzellen und nicht um Nierenzellen. Da LPAI-Viren auch gut im Intestinaltrakt replizieren [Alexander, 2007], könnte dies erklären, warum das LPAI-H5N2-Isolat besser in den Caco-2- als in den Nierenzellen replizieren kann. Darüber hinaus konnten Studien zeigen, dass Caco-2-Zellen 100-mal empfänglicher für Influenza A Viren sind als MDCK-Zellen oder Hühnerembryozellen [Zhirnov et al., 2007]. Es erklärt allerdings nicht, warum das H10-Virusisolat nicht ebenfalls auf Caco-2-Zellen weiter replizieren konnte.

Beide H5N1-Isolate (H5N1-c265 und H5N1-lsm) zeigten in den Zellkulturen im Vergleich ein ähnliches Verhalten und replizierten mit vergleichbar hohen Endtitern in allen getesteten Zelllinien. HPAI-Viren sind in der Regel in der Lage, sowohl in aviären, als auch in nicht-aviären Zelllinien zu replizieren [Yao et al., 2001; Ollier et al., 2004]. Allerdings kommt es vor allem bei nicht-aviären Zelllinien häufig bereits nach wenigen Passagen zu einer Veränderung im Genom, bevorzugt im Hämagglutinin und im PB2. Auch ein avirulentes Feldisolat kann sich nach wenigen Passagen zu einem HPAI-Virus entwickeln [Ito et al., 2001] oder ein HPAI-Virus kann sich abschwächen [Steel et al., 2009; Nicholson et al., 2003]. Dies liegt vor allem daran, dass das Hämagglutinin eine entscheidende Rolle in der Wirtsspezifität spielt [Hampson et al., 2006; Neumann et al., 2006] und dass dem PB2 (vor allem angezieht durch AS Position 627) ebenfalls eine wichtige Rolle für die Vermehrungsfähigkeit in nicht-aviären Zellen zugesprochen wird [Subbarao et al., 1993; Gabriel et al., 2005].

Für die natürliche Erzeugung eines Reassortantenvirus muss mindestens eine Doppelinfektion mit unterschiedlichen Influenza A Viren in einem Wirt vorliegen. Für gewöhnlich treten solche Doppelinfektionen in der Vogelpopulation auf [Wan et al., 2008]. Diese rein aviären Reassortantenviren zirkulieren anschließend vorwiegend in der Vogelpopulation. Die natürliche

Bildung eines Reassortantenvirus mit aviären und nicht-aviären Elternviren erfolgte primär in Schweinen, da Schweine sowohl für aviäre, als auch nicht-aviäre Influenza A Viren empfänglich sind [Karasin et al., 2004; Webster et al., 1992].

Bisher gibt es in der Literatur keine Angaben über eine natürliche Bildung eines Reassortantenvirus in einem anderen Säugetier als dem Schwein. Bei unseren Infektionsversuchen war es möglich, in der Maus eine Doppelinfektion mit einem aviären, für Mäuse apathogenen LPAI-Impfvirus und einem an die Maus adaptierten HPAI-Belastungsvirus auszulösen. Das dabei entstandene Reassortantenvirus verdrängte wahrscheinlich alle anderen Viren in den BALB/c-Mäusen, sowohl das Impf- als auch das Belastungsvirus. Dies legt den Schluss nahe, dass die Kombination von PB2, NA und NP des für Maus apathogenen Impfvirus mit den Gensegmenten für PB1, PA, HA, M und NS des Belastungsvirus den entstandenen Reassortantenvirus optimale Bedingungen für eine effiziente Replikation gab und es somit Vorteile gegenüber allen anderen möglicherweise sonst noch entstandenen Reassortantenviren hatte [Zambon, 1999]. Das HPAI-Hämagglutinin des Mäuse-adaptierten Belastungsvirus ermöglichte dem Reassortantenvirus in der Maus optimal zu replizieren und war somit gegenüber jenen Viren im Vorteil, die das Hämagglutinin des Impfvirus besaßen [Yao et al., 2001]. Die vorhandenen Daten lassen den Schluss zu, dass das Reassortantenvirus u.a. Dank des NS-Genomsegment gegenüber jenen Reassortantenviren einen Vorteil hatte, die das NS-Segment des für die Maus apathogenen Impfvirus im Genom hatten [Seo et al., 2004; Hayman et al., 2007]. Durch das Vorhandensein von drei LPAI-Segmenten war das Reassortantenvirus vermutlich soweit abgeschwächt, dass es die Mäuse nicht zu schnell tötete, sondern eine effektive Replikation stattfinden konnte und es dem Virus leichter durch Langzeitausscheidung ermöglicht wird, einen neuen Wirt zu infizieren. Wie die beiden H5N1-Isolate konnte auch das H7N2-Reassortantenvirus, da es sich um ein HPAI-Virus handelte, in allen eingesetzten Zelllinien mit vergleichbaren Endtitern wie die H5N1-Isolate replizieren [Ollier et al., 2004].

Die Pathogenität eines Influenza A Virus ist ein Multigen-Ereignis. Es sind mehrere verschiedene Faktoren beteiligt und auf nahezu jedem Genomsegment finden sich solche Faktoren bzw. einzelne Aminosäuren, die einen Einfluss auf die Pathogenität, Wirtsspezifität und Virulenz haben [Jiao et al., 2008; Donelan et al., 2003; Rimmelzwaan et al., 2004].

Um wichtige, in der Literatur beschriebene, Aminosäuren näher untersuchen und vergleichen zu können, wurde eine Multiplex-PCR entwickelt, die mehrere Genomabschnitte in einem Ansatz amplifizieren sollte. Diese Amplifikate sollten sich soweit in der Größe unterscheiden, damit eine klare Zuordnung der Fragmente in einem Agarosegel möglich wird. Durch die Sequenzierung dieser kurzen Fragmente konnte dann auf die zu untersuchende Aminosäure bzw. den zu untersuchenden Genomabschnitt geschlossen und mit anderen bekannten Sequenzen verglichen werden. Die internen Genomsegmente unterliegen keinem so starken Selektionsdruck wie z.B. die beiden Hautoberflächenproteine Hämagglutinin und Neuraminidase [Boon et al., 2006; Hui et al., 2003]. Dennoch üben gerade die Proteine des Polymerase-Komplexes einen zum Teil starken Einfluss auf die Pathogenität und Virulenz von einzelnen Influenza A Virusstämmen aus [Hara et al., 2006; Gibbs et al., 2003; Fechter et al., 2003; Gabirel et al., 2008; Gabriel et al., 2007]. Nicht zuletzt spielt das PB2 eine wichtige Rolle in der Wirtsspezifität, bzw. in der Fähigkeit eines aviären Influenza A Virus auch in nicht-aviären Wirten replizieren zu können [Shinya et al., 2003; Hulse-Post et al., 2007]. Um eine genauere Aussage über die potentielle Gefahr eines Influenza A Virus machen zu können, in der nicht nur die HA-Spaltstelle mit einbezogen wird, wurden andere beschriebene Aminosäuren bzw. kurze Genomregionen gesucht, die einen Einfluss auf die Pathogenität und Übertragbarkeit haben.

Da es sich bei den ausgewählten Genombereichen um die internen Genomsegmente handelte, war es möglich, die Primer so zu wählen und zu konstruieren, dass auch nicht-aviäre Virusisolate detektiert werden konnten. Darüber hinaus waren die Primer Subtyp-unabhängig, d.h. nicht auf bestimmte Virusisolate limitiert. Somit ist es nun möglich, neben der wichtigen Spaltstellen-Sequenz auch andere Aminosäuren in die schnelle molekulare

Beurteilung von Influenza A Virusisolaten mit einzubeziehen und Aussagen bezüglich möglicher Gefahren machen zu können.

Beide H5N1-Isolate wurden auf Grund der Aminosäuresequenz der Spaltstelle den HPAI-Viren zugeordnet. Dennoch unterschieden sich beide im Ei vermehrten Viren in ihrer Virulenz für BLAB/c-Mäuse. Während das H5N1-c265-Isolat eine hohe Letalität bei den Mäusen verursachte, zeigte sich das H5N1-ism-Isolats als weitgehend apathogen in der BALB/c-Maus. Da das H5N1-ism-Isolat erst spät im Jahr 2007 isoliert werden konnte, ist es auch möglich, dass sich die in der Wassergeflügelpopulation noch zirkulierenden H5N1-Viren attenuiert hatten. Somit wäre es den H5N1-Viren möglich, sich ein natürliches Reservoir in der Wildvogelpopulation zu schaffen, in dem sie ihre Wirte nicht mehr töten und dadurch eine gesicherte Übertragung auf einen potentiell neuen Wirt möglich machen um eine Selbst-Limitierung zu vermeiden [Nicholson et al., 2003]. HPAI-Viren sind bevorzugt in adulten Stockenten (*Anas platyrhynchos*) zu finden, da diese viel Virus ausscheiden können, ohne Krankheitsbilder zu zeigen [Keawcharoen et al., 2008].

Überraschenderweise war das H5N1-ism-Isolat schon nach einer CRFK-Passage wesentlich virulenter für BALB/c-Mäuse. Die vorhandenen Daten lassen vermuten, dass zu Beginn auf Grund der hohen Mutationsrate [Poland et al., 2007] eine Mischpopulation von H5N1-ism vorlag, in welcher nur wenige Partikel, des für die Maus hoch virulenten Virus vorhanden waren. Durch die Passage in CRFK-Zellen wurde ein Selektionsdruck ausgeübt und es konnte sich die für die Maus virulente Population durchsetzen und die apathogene Viruspopulation verdrängen [Zambon, 1999] Eine speziell für das Matrixprotein konzipierte und eingestellte real-time RT-PCR zum Nachweis von Influenza A Viren [Spackman et al., 2002] erbrachte eine klare Bevorzugung des Lungengewebes als Ort der Virusvermehrung für das H5N1-ism-CRFK-Isolat. Im direkten Vergleich der C_T -Werte von Lungengewebe und Gehirn war in den unverdünnten Organverreibungen in den Lungengeweben der infizierten Mäuse eine ca. 10000-fach höhere Viruslast vorhanden. Diese Ergebnisse wurden durch die Virusanzucht aus den Organverreibungen in MDCK- und CRFK-Zellen noch bestätigt. Eine Virusvermehrung aus den

Lungenverreibungen wurde in beiden Zellen mit ähnlichen Endtitern nachgewiesen, wohingegen eine Virusvermehrung aus den Gehirnverreibungen nicht erkennbar war. Die ausbleibende Infektion des Gehirns kann bei H5N1-Ism und H5N1-Ism-CRFB durch eine Glykosilierungsstelle in der Neuraminidase an Position 130 (146 N2-Numbering) erklärt werden [Li et al., 1993]. Da das N1-Protein eine große Variabilität in der Länge der AS-Sequenz vorweist [Acc.No.: AAL75848 (H5N1); CAP45886 (H5N1); CAC95655 (H7N1); ABU50424 (N1)], wurde auf ein Numbering zurück gegriffen, welches sich auf die Positionen im N2 bezieht [Wang et al., 2002]. Das N2-Protein besitzt in der Mehrzahl der Isolate auch bei unterschiedlichen Hämagglutinin-Komponenten, eine einheitliche Länge der Aminosäure-Sequenz [Acc.No.: ACA04733 (H5N2); BAF49410 (H5N2); ACA64674 (H3N2); BAF34927 (H11N2); BAE80443 (H9N2)].

Der erste Verdacht, die Spaltstelle des H5N1-Ism-CRFB-Isolats könne sich geändert haben, erwies sich als Fehleinschätzung, denn die Sequenzierung ergab keinerlei Mutationen im Bereich der Spaltstelle (siehe Abb.30). Dies legte die Überlegung nahe, dass sich an anderer Stelle im Genom etwas geändert haben musste, was die plötzliche Pathogenität für Mäuse erklären könnte. In nahezu jedem Gen finden sich Aminosäuren, die eine wichtige Rolle für die Pathogenität und Virulenz eines Isolats in Mäusen spielen [Carr et al., 2006; Katz et al., 2000; Hulse-Post et al., 2007; Ward 1995; Brown et al., 1999]. Da die Neuraminidase ebenfalls eine entscheidende Rolle für die Pathogenität eines Influenza Virus spielt [Hulse et al., 2004], galt es zu klären, ob es zu Mutationen in der Neuraminidase des H5N1-Ism-CRFB-Isolats gekommen war, welche das plötzlich auftretende Sterben der Mäuse erklären könnte. Jedoch erbrachte eine vollständige Sequenzierung der Neuraminidase von H5N1-Ism-CRFB keine Mutation, weder in beschriebenen noch in nicht-beschriebenen Aminosäuren, zum Vorschein und somit war auch die Neuraminidase nicht für die plötzlich auftretende Pathogenität verantwortlich.

Für den Vergleich weiterer wichtiger Aminosäuren, wurden in der Literatur beschriebene Genombereiche gesucht, deren Amplifikation und anschließende Sequenzierung eine mögliche Erklärung für die

unterschiedliche Pathogenität der H5N1-Isolate geben könnte. Wichtige, vor allem die Pathogenität für Mäuse betreffende Genombereiche und einzelne Aminosäuren wurden amplifiziert, sequenziert und miteinander verglichen. Jedoch erbrachte dieser Vergleich keine eindeutige Erklärung, für die erhöhte Virulenz des H5N1-Ism-CRFK-Virus in infizierten BALB/c-Mäusen.

Die Gesamtsequenz beider H5N1-Viren vor und nach der Vermehrung in CRFK-Zellen könnte entscheidende Informationen liefern. Schweine gehören zu den natürlichen Wirten von bestimmten Influenza A Virussubtypen [Nicholson et al., 2003; Olsen et al., 2006]. H1N1, H3N2 sowie H1N2 zirkulieren weltweit in der Schweinepopulation, zeigen aber unterschiedliche Linien in Europa und den USA. Veränderungen des Genoms durch Antigendrift erfolgt bei porcinen Influenzaviren (SIV) seltener als bei humanen Influenzaviren [Van Reeth, 2007; Brown, 2000]. Beide durchgeführten Impfversuche erfolgten mit Influenza A Virussubtypen, die nicht zu den natürlichen SIV gehören.

Durch Arbeiten von Kida et al., (1994); Choi et al., (2005) und Isoda et al., (2006) war bekannt, dass eine experimentelle H5N1-Infektion in Schweinen keine nennenswerten klinischen Erkrankungsbilder verursacht. Es blieb die Frage offen, ob eine Immunisierung unter Umgehung der natürlichen Eintrittspforten und mit Anwendung eines Immunstimulans (Adjuvans) mit einem inaktivierten H5N1-Virus zelluläre und humorale Immunreaktionen induziert. Alle zehn mit inaktiviertem H5N1-c265 immunisierten Ferkel zeigten keinerlei klinische Reaktionen. Weder die Re-Stimulation mit dem Impfvirus noch die Stimulation mit anderen aviären Influenza A Virusisolaten führte bei den PBMC zu einem deutlichen Anstieg von IFN- γ sekretierenden Zellen. Meist lag die Zahl der IFN- γ sekretierenden Zellen unter denen der RPMI-Kontrolle. Lediglich die Stimulation der PBMC mit H1N1 und H3N2, zwei klassischen porcinen Influenza A Viren, erzeugte unter den PBMC der Tiere in beiden Gruppen eine deutlich größere Anzahl IFN- γ sekretierender Zellen als die Stimulation mit RPMI oder MDCK-Zellkulturüberstand. IFN- γ und andere Zytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha (TNF-alpha) und Interleukin-6 (IL-6) werden bei einer Influenza Infektion ausgeschüttet und korrelieren mit der

Schwere der Infektion [Charley et al., 2006]. Eine Immunisierung hingegen reduziert die Menge an Zytokinen und minimiert somit klinische Erscheinungsbilder, da u.a. die Zytokine und damit einhergehende Entzündungsreaktionen für die klinischen Erscheinungsbilder eine Influenza A Virusinfektion verantwortlich sind [Seo et al., 2004; Jo et al., 2007].

Neben der zellulären Reaktion in Form der IFN- γ Sekretion sollte auch die Bildung von Antikörpern gegen H5 untersucht werden. Im Gegensatz zu den Seren der Tiere aus Gruppe 2 (Immunisierung mit Adjuvans) war bei den Schweineseren aus Gruppe 1 ein steter Anstieg des Antikörpertiters messbar. Da Influenza A Viren im Schwein vor allem an Schleimhautzellen binden und replizieren, spielt die humorale Immunantwort vor allem dort eine wichtige Rolle [Charley et al., 2006]. Infizierte oder geimpfte Tiere zeigen eine dauerhafte IgA Antikörper Immunantwort, was zu einem Schutz vor weiteren Infektionen, auch mit anderen Influenza A Subtypen, führt [Heinen et al., 2001].

Im zweiten Impfversuch mit H7N2 immunisierten Schweinen wurde neben der Sekretion von IFN- γ auch die antivirale Wirkung von IFN- α im Zellkulturüberstand untersucht. Ähnlich wie bei den H5N1 immunisierten Schweine, zeigten auch die H7N2 immunisierten Tiere keine signifikant größere Zahl IFN- γ sezernierender Zellen im Vergleich zur RPMI- und Zellkulturüberstandkontrolle. Anders als bei den H5N1 immunisierten Schweinen, kam es jedoch, bis auf die Stimulation mit S-72 PL, nicht zu einem Abfall der IFN- γ Bildung. Auch die geringe Menge an VSV-antiviraler Aktivität (IFN- α) in den Überständen von re-stimulierten PBMC ist vermutlich auf Influenza A Virus-Subtypen zurückzuführen, die beim Schwein offensichtlich, wenn sie nicht wirtsadaptierte Subtypen sind, auch schlechte Stimulanten dieser natürlichen (angeborenen) Immunreaktion sind. Dies zeigt die Reaktion auf die Stimulierung mit dem porcinen Influenza A Virus H3N2, die sogar über der Immunreaktion durch Stimulierung mit dem Kontrollvirus lag.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war die molekularbiologische, biologische und immunologische Untersuchung und Charakterisierung neuer Isolate des aviären Influenza A Virus aus Bayern.

Mit Hilfe von selbst konstruierten Primern konnte die Nukleotid- und Aminosäuresequenz von Hämagglutinin, Neuraminidase, Nukleoprotein und der Matrixproteine für die Isolate A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2, A/Mallard/Bavaria/1/2006 H5N1, A/Mallard/Bavaria/3/2006 H10N7 und A/Mallard/Bavaria/10/2007 H5N1 erhalten und analysiert werden.

Durch Sequenzvergleiche konnte eine größere Ähnlichkeit innerhalb der LPAI-Isolate im Vergleich zu den HPAI-Isolaten festgestellt werden. Diese H5N1-Isolate weisen in der Neuraminidase- und Hämagglutinin-Sequenz mehr Unterschiede zu ihren vermeintlich nächsten Verwandten auf als untereinander. Dagegen waren die internen Proteinen M1, M2 und Nukleoprotein nahezu identisch. Für die schnelle Abklärung virulenz-assoziiertes Aminosäureänderungen an verschiedenen Genomregionen wurde eine Multiplex-PCR entwickelt, die die sofortige Sequenzierung der wichtigsten Genomfragmente erlaubt.

Die Isolate zeigten unterschiedliches Verhalten in Zellkultur. Die LPAI-Isolate waren meist nur in der ersten Passage vermehrungsfähig. Von den beiden schwach pathogenen Isolaten konnte im Gegensatz zum H10N7-Isolat das H5N2-Isolat auch in höheren Passagen in Caco-2-Zellen replizieren und nachgewiesen werden. Die HPAI-Isolate konnten in allen getesteten Zellen replizieren.

Die Vermehrungsfähigkeit und Virulenz beider H5N1-Isolate im Tiersystem wurde in beimpften embryonierten Hühnereiern und in infizierten BALB/c-Mäusen verglichen. Beide Virusisolate konnten sehr gut in embryonierten Hühnereiern replizieren und töteten den Embryo bereits nach 24 Stunden. Das H5N1-Isolat aus dem Jahr 2006 führte bereits in geringer Dosis zum Tod der infizierten Mäuse, wohingegen das vorerst letzte bayerische H5N1 Isolat aus

dem Jahr 2007 für Mäuse geringgradig virulent war. Schon nach einmaliger Passage in CRFK-Zellen zeigte dieses Virusisolat jedoch eine erhebliche Virulenzsteigerung. Der Auslöser für die Virulenzsteigerung konnte auf Genomebene nicht eindeutig geklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit war es möglich, ein natürliches Reassortantenvirus aus einem aviären LPAI-Virus (A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2) und einem an die Maus adaptierten HPAI-Virus (A/FPV/Bratislava/1979 H7N7) in der BALB/c-Maus zu erhalten. Dieses Reassortantenvirus (H7N2) wurde durch seine HA-Spaltstellensequenz als HPAI-Virus eingestuft und konnte in allen getesteten Zellkulturen produktiv replizieren. Die Sequenzuntersuchung und der Vergleich des kompletten Genoms erbrachte eine 3:5 Verteilung der RNA-Segmente. Drei Segmente (PB2, NA, NP) stammten von dem H5N2-Isolat, die restlichen fünf Segmente waren dem H7N7-Isolat zuzuordnen.

Die Immunisierung von Schweinen mit inaktiviertem H5N1 und anschließender Infektion mit H5N2-Vollvirus führte zur Bildung von ELISA-Antikörpern ohne klinische Symptome, jedoch nicht zur Sekretion von Interferon-Gamma nach spezifischer *in vitro* Restimulation. Auch die Immunisierung mit inaktiviertem H7N2 erbrachte ein ähnliches Ergebnis. Die Immunisierungsversuche mit inaktiviertem H5 und H7 AI-Subtypen deuten darauf hin, dass Schweine nur eine limierte Immunantwort (ELISA-Antikörper) auf diese Subtypen entwickeln. Im Gegensatz dazu stehen eine starke zelluläre und humorale Immunreaktion gegen schweineadaptierte Influenza A Subtypen H1N1 und H3N2.

7 ANHANG

7.1 Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
Abb.	Abbildung
AIV	Aviäres Influenza A Virus
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
AZM	Anzuchtmedium
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
ConA	Concanavalin A
CPE	Zytopathogener Effekt
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat
dGTP	2'-Desoxy-Guanosin-5'-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
dTTP	2'-Desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat
dUTP	2'-Desoxy-Uridin-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
Kan.	Kanamycin
kbp	Kilobasenpaare (1000 Basenpaare)
g	Gramm
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
h	Stunde
HPAIV	High pathogenic avian Influenza A viurs
LGL	Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
LPAIV	Low pathogenic avian Influenza A virus
μ	mikro
m	milli
M	molar (mol/l)
min	Minute
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NEA	Nicht essentielle Aminosäuren
N-Terminus	Amino-Terminus
ORF	<i>open reading frame</i>
p	pico

PBS	<i>phoshat bufferd saline</i>
PCR	Polymerasechainreaction
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SLM	Sedimentlösungsmenge
SPF	Spezifisch pathogen-frei
Tab.	Tabelle
TE	Tris-EDTA-Puffer
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Unit: Einheit für Enzymaktivität
ü.N.	über Nacht
uv	unverdünnt
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
W	Watt

Für die Bezeichnung von Nukleotiden und Aminosäuren wurden die international gebräuchlichen IUB-Einbuchstaben-Codes verwendet.

7.2 Sequenzen

7.2.1 A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2

PB2:

```

1      ATGGAGAGAATAAAAGAACTAAGAGATTTAATGTCACAGTCTCGCACTCGCGAGATACTT
1      M E R I K E L R D L M S Q S R T R E I L

61     ACAAAAACCACAGTGGACCATATGGCCATAATTAAGAAGTACACATCAGGAAGACAGGAG
21     T K T T V D H M A I I K K Y T S G R Q E

121    AAGAACCCTGCACTCAGAATGAAATGGATGATGGCAATGAAGTACCCAATCACAGCAGAC
41     K N P A L R M K W M M A M K Y P I T A D

181    AAGAGAATAATGGAGATGATTCCTGAAAGAAATGAACAAGGGCAGACACTTTGGAGTAAA
61     K R I M E M I P E R N E Q G Q T L W S K

241    ACAAACGATGCTGGATCAGATCGGGTTATGGTATCACCCCTAGCAGTAACATGGTGGAAC
81     T N D A G S D R V M V S P L A V T W W N

301    AGAAATGGGCCGACAACAAGCACAGTCCATTACCCAAAGGTTTACAAAACCTACTTTGAG
101    R N G P T T S T V H Y P K V Y K T Y F E

361    AAGATTGAAAGATTGAAGCATGGAACCTTTGGTCCTGTCCGTTTCCGAAACCAAGTCAAA
121    K I E R L K H G T F G P V R F R N Q V K

421    ATACGTCGCAGGGTTGATATAAATCCTGGTCATGCCGATCTCAGTTCTAAAGAAGCGCAA
141    I R R R V D I N P G H A D L S S K E A Q

```

481 GATGTCATCATGGAGGTCGTTTTCCCAAATGAAGTGGGAGCCAGGATATTAACATCGGAG
161 D V I M E V V F P N E V G A R I L T S E

541 TCACAATTGACAATAACTAAAGAGAAGAAGGAAGAACTTCAGGACTGTAAAAATTGCTCCC
181 S Q L T I T K E K K E E L Q D C K I A P

601 CTAATGGTCGCATACATGTTGGAGAGAGAATTGGTCCGCAAGACCAGATTCCTTCCAGTT
201 L M V A Y M L E R E L V R K T R F L P V

661 GCTGGTGGAAACAAGCAGTGTATACATTGAAGTATTGCATTTAACACAAGGAACATGCTGG
221 A G G T S S V Y I E V L H L T Q G T C W

721 GAACAAATGTACTCCAGGTGGAGAAGTGAGAAATGATGATGTTGATCAGAGCTTAATC
241 E Q M Y T P G G E V R N D D V D Q S L I

781 ATTGCTGCTAGAAACATAGTTAGGAGAGCAGCGGTATCAGCAGACCCACTGGCATCGCTA
261 I A A R N I V R R A A V S A D P L A S L

841 TTGGAGATGTGTCATAGCACACAAATTGGTGGGATAAGAATGGTAGACATCCTCAGACAG
281 L E M C H S T Q I G G I R M V D I L R Q

901 AATCCAACAGAAGAACAAGCCGTGGATATATGCAAAGCAGCAATGGGCCTGAGGATCAGT
301 N P T E E Q A V D I C K A A M G L R I S

961 TCATCCTTCAGCTTTGGAGGTTTCACTTTCAAAGAACAAGTGGATCATCTGTCAAGAGA
321 S S F S F G G F T F K R T S G S S V K R

1021 GAAGAGGAAGTGCTTACAGGCAACCTCCAAACATTGAAAATAAGAGTACATGAAGGGTAC
341 E E E V L T G N L Q T L K I R V H E G Y

1081 GAGGAATTCACAATGGTTGGGCGAAGAGCAACAGCTATTCTAAGGAAAGCAACCAGAAGG
361 E E F T M V G R R A T A I L R K A T R R

1141 CTGATTCAACTGATAGTGAGTGGGAGAGACGAGCAGTCAATCGCTGAAGCGATCATAGTG
381 L I Q L I V S G R D E Q S I A E A I I V

1201 GCAATGGTTTTCTCACAAGAGGATTGCATGATAAAAAGCAGTACGAGGTGATTTGAATTTT
401 A M V F S Q E D C M I K A V R G D L N F

1261 GTTAACAGAGCGAACCAGCGACTAAACCCTATGCATCAACTCCTGAGGCATTTCCAAAAA
421 V N R A N Q R L N P M H Q L L R H F Q K

1321 GATGCAAAAAGTGCTGTTTTCAAACCTGGGGAATTGAACCCATTGACAATGTCATGGGAATG
441 D A K V L F Q N W G I E P I D N V M G M

1381 ATCGGAATATTGCCTGACATGACCCCCAGTACAGAGATGTCACTAAGAGGAGTGAGGGTC
461 I G I L P D M T P S T E M S L R G V R V

1441 AGTAGGATGGGGTGGATGAATATTCCAGCACCGAGAGAGTGGTCTGAGTATTGACCGT
481 S R M G V D E Y S S T E R V V V S I D R

1501 TTCTTAAGGGTTCGAGATCAACGTGGGAATGTGCTATTGTCTCCCGAAGAGGTTAGCGAA
501 F L R V R D Q R G N V L L S P E E V S E

1561 ACGCAGGGAACAGAGAAGTTGACAATAACATATTCATCGTCAATGATGTGGGAGATTAAT
521 T Q G T E K L T I T Y S S S M M W E I N

1621 GGTCCAGAGTCAGTGTGGTCAATACCTATCAATGGATCATCAGAAATTGGGAAACTGTA
541 G P E S V L V N T Y Q W I I R N W E T V

1681 AAGATCCAGTGGTCCCAGGATCCTACAATGCTATAACAATAAGATGGAGTTCGAACCTTTT
561 K I Q W S Q D P T M L Y N K M E F E P F

1741 CAGTCCTTAGTACCTAAAGCTGCTAGAGGCCAATACAGTGGGTTTGTGAGGACACTGTTC
 581 Q S L V P K A A R G Q Y S G F V R T L F

1801 CAACAAATGCGAGATGTGCTTGGGACATTCGACACTGTTCAAATAATAAACTGCTTCCC
 601 Q Q M R D V L G T F D T V Q I I K L L P

1861 TTTGCTGCGGCCCCACCGGAGCAGAGTAGGATGCAATTTTCTTCTTAACAGTTAATGTA
 621 F A A A P P E Q S R M Q F S S L T V N V

1921 AGGGGATCAGGAATGAGAATGCTCGTGAGAGGCCAACTCCCCGTGTTCAACTACAACAAG
 641 R G S G M R M L V R G N S P V F N Y N K

1981 GCAACCAAGAGGCTTACTGTCTCGGGAAGGACGCAGGTGCACTGACAGAAGATCCAAAT
 661 A T K R L T V L G K D A G A L T E D P N

2041 GAAGGCACAGCTGGAGTGAATCTGCTGTACTGAGAGGGTTCCTAATTCTGGGCAAAGAA
 681 E G T A G V E S A V L R G F L I L G K E

2101 AACAAGAGGTATGGACCAGCATTGAGCATCAACGAACTGAGCAATCTTGCGAAAGGGGAG
 701 N K R Y G P A L S I N E L S N L A K G E

2161 AAAGCTAACGTGTTGATAGGGCAAGGAGACGTGGTGGTGGTAATGAAACGGAAACGGGAC
 721 K A N V L I G Q G D V V L V M K R K R D

2221 TCTAGCATACTTACTGACAGCCAGACAGCGACCAAAAGGATTCGGATGGCCATCAATTAG
 741 S S I L T D S Q T A T K R I R M A I N *

PB1:

1 ATGGATGTCAATCCGACTTTACTTTTCTTAAAAGTGCCAGCGCAAAATGCTATAAGTACT
 1 M D V N P T L L F L K V P A Q N A I S T

61 ACATTCCCTTACTACTGGAGATCCTCCATACAGCCATGGAACAGGAACAGGATACACCATG
 21 T F P Y T G D P P Y S H G T G T G Y T M

121 GACACAGTCAACAGAACACATCAATACTCAGAGAAAAGGAAAATGGACAACAAACACAGAG
 41 D T V N R T H Q Y S E K G K W T T N T E

181 ACCGGAGCACCCCAACTCAATCCAATTGATGGACCATTACCTGAGGACAACGAGCCAAGT
 61 T G A P Q L N P I D G P L P E D N E P S

241 GGATATGCACAAACGGATTGCGTGTGGAAAGCGATGGCTTTCCTTGAAGAATCCCACCCA
 81 G Y A Q T D C V L E A M A F L E E S H P

301 GGGATCTTTGAAAACCTCTTGTCTTGAACGATGGAAGTTGTTTCAGCAAAACAAGAGTGGAC
 101 G I F E N S C L E T M E V V Q Q T R V D

361 AAATAACCCAAGGTGCGCCAGACTTATGACTGGACACTGAATAGAAATCAACCAGCTGCA
 121 K L T Q G R Q T Y D W T L N R N Q P A A

421 ACTGCTTTGGCCAACACTATAGAGGTCTTCAGATCGAACGGTCTGACAGCCAATGAATCG
 141 T A L A N T I E V F R S N G L T A N E S

481 GGAAGACTAATAGATTTTCTCAAGGATGTGATGGAATCAATGGATAAAGAAGAGATGGAA
 161 G R L I D F L K D V M E S M D K E E M E

541 ATAACAACACATTTCCAGAGAAAAGAGAAGAGTAAGGGACAACATGACCAAGAAGATGGTC
 181 I T T H F Q R K R R V R D N M T K K M V

601 ACACAAAGAACAATAGGGAAGAAGAAGCAGAGGCTGAACAAGAGGAGCTACTTAATAAGA
 201 T Q R T I G K K K Q R L N K R S Y L I R

661 GCACTGACACTGAACACAATGACAAAAGATGCAGAAAAGAGGCAAATTGAAGAGGCGGGCA
221 A L T L N T M T K D A E R G K L K R R A

721 ATTGCAACACCCGGGATGCAGATTAGAGGATTCGTGTACTTTGTGCGAAACACTGGCGAGG
241 I A T P G M Q I R G F V Y F V E T L A R

781 AGCATCTGTGAGAACTTGAGCAGTCTGGACTCCCTGTTGGAGGGAATGAGAAGAAGGCT
261 S I C E K L E Q S G L P V G G N E K K A

841 AAATTGGCAAATGTCGTGAGAAAAATGATGACTAACTCACAAAGATACAGACTCTCCTTT
281 K L A N V V R K M M T N S Q D T E L S F

901 ACAATTACTGGGGACAACACCAAATGGAATGAGAATCAAAATCCTCGGATGTTCTTGCA
301 T I T G D N T K W N E N Q N P R M F L A

961 ATGATAACATACATCACAAAGAAACCAACCTGAATGGTTTAGAAATGTCTTGAGCATTGCT
321 M I T Y I T R N Q P E W F R N V L S I A

1021 CCTATAATGTTCTCAAACAAAATGGCGAGATTAGGAAAAGGATACATGTTTGAAAGTAAG
341 P I M F S N K M A R L G K G Y M F E S K

1081 AGCATGAAGCTACGGACACAAATACCGGCAGAAATGCTTGCAAACATTGACTTGAAATAC
361 S M K L R T Q I P A E M L A N I D L K Y

1141 TTCAACGAATCAACGAGAAAAGAAAATCGAGAAAATAAGATCTCTACTAATTGATGGCACA
381 F N E S T R K K I E K I R S L L I D G T

1201 GCCTCATTGAGTCCCGGAATGATGATGGGCATGTTCAATATGCTGAGCACAGTATTAGGA
401 A S L S P G M M M G M F N M L S T V L G

1261 GTCTCAATCCTGAATCTTGGGCAAAAGAGGTACACCAAAAACCACATACTGGTGGGATGGA
421 V S I L N L G Q K R Y T K T T Y W W D G

1321 CTCCAATCCTCTGATGACTTCGCTCTCATAGTGAATGCACCGAATCATGAGGGGATACAA
441 L Q S S D D F A L I V N A P N H E G I Q

1381 GCAGGAGTGGATAGGTTCTATAGGACCTGCAAACCTGGTTGGGATCAACATGAGCAAGAAG
461 A G V D R F Y R T C K L V G I N M S K K

1441 AAGTCTTACATAAACCGGACAGGAACTTTTGAATTCACGAGCTTTTTCTACCGCTATGGG
481 K S Y I N R T G T F E F T S F F Y R Y G

1501 TTTGTAGCCAACCTTCAGTATGGAGTTACCCAGCTTTGGGGTGTCCGGAATCAATGAATCA
501 F V A N F S M E L P S F G V S G I N E S

1561 GCTGACATGAGCATTGGAGTTACAGTGATAAAAAACAATATGATAAAACAATGACCTTGA
521 A D M S I G V T V I K N N M I N N D L G

1621 CCAGCAACAGCTCAGATGGCTCTTCAGCTATTCATCAAGGACTATAGGTACACGTACCGA
541 P A T A Q M A L Q L F I K D Y R Y T Y R

1681 TGCCACAGGGGTGATACACAAATTCAAACGAGGAGATCATTGAGCTGAAGAAGCTGTGG
561 C H R G D T Q I Q T R R S F E L K K L W

1741 GAGCAGACCCACTCAAAGGCAGGGCTGTTGGTATCAGATGGAGGACCAAACCTGTACAAC
581 E Q T H S K A G L L V S D G G P N L Y N

1801 ATTAGGAATCTCCACATCCCAGAGGTCTGCTTGAAGTGGGAATTGATGGATGAAGATTAC
601 I R N L H I P E V C L K W E L M D E D Y

1861 CAGGGCAGGCTGTGCAATCCTCTGAACCCGTTTGTGTCAGTCATAAGGAAATGAGTCCGTA
621 Q G R L C N P L N P F V S H K E I E S V

1921 AACAAATGCTGTTGTAATGCCAGCCCATGGCCCAGCCAAGAGCATGGAATATGATGCTGTT
641 N N A V V M P A H G P A K S M E Y D A V

1981 GCGACTACACACTCATGGATCCCTAAGAGGAACCGTTCCATTCTCAATACCAGCCAAAGG
661 A T T H S W I P K R N R S I L N T S Q R

2041 GGAATTCTTGAGGATGAGCAAATGTATCAGAAGTGCTGCAGTCTATTTGAGAAATCTTC
681 G I L E D E Q M Y Q K C C S L F E K F F

2101 CCCAGTAGTTCATACAGAAGGCCAGTTGGAATTTCCAGCATGGTGGAGGCCATGGTGTCT
701 P S S S Y R R P V G I S S M V E A M V S

2161 AGGGCCGAATTGATGCACGCATTGATTTTGAATCTGGAAGGATTAAGAAAAGAGTTT
721 R A R I D A R I D F E S G R I K K E E F

2221 GCTGAGATCATGAAGATCTGTTCCACCATTGAAGAGCTCAGACGGCAAAAATAG
741 A E I M K I C S T I E E L R R Q K *

PA:

1 ATGGAAGACTTTGTGCGACAATGCTTCAATCCAATGATTGTGCGAGCTTGCGGAAAAGGCA
1 M E D F V R Q C F N P M I V E L A E K A

61 ATGAAAGAATATGGGGAAGACCCGAAAATCGAGACGAACAAATTTGCTGCGATATGCACA
21 M K E Y G E D P K I E T N K F A A I C T

121 CACTTAGAAGTCTGTTTCATGTATTTCGGATTTCCACTTTATTGATGAACGAGGTGAATCA
41 H L E V C F M Y S D F H F I D E R G E S

181 ATAATTGTAGAATCGGGCGATCCGAATGCATTATTGAAACACCGTTTTGAAATAATTGAA
61 I I V E S G D P N A L L K H R F E I I E

241 GGGAGAGACCGAACAATGGCCTGGACAGTGGTGAATAGCATCTGCAACACCACAGGAGTC
81 G R D R T M A W T V V N S I C N T T G V

301 GAGAAGCCTAAATTTCTCCCCGATTTGTACGACTATAAAGAGAACCGATTTCATTGAAATT
101 E K P K F L P D L Y D Y K E N R F I E I

361 GGAGTGACACGGAGGGAAGTCCACATATACTATTTGGAAAAAGCCAACAAGATAAAATCC
121 G V T R R E V H I Y Y L E K A N K I K S

421 GAGAAGACACACATTACATATTCTCATTACCCGGAGAGGAAATGGCCACCAAAGCGGAC
141 E K T H I H I F S F T G E E M A T K A D

481 TACACTCTTGACGAAGAGAGTAGGGCAAGAATCAAACTAGGCTGTTCACTATAAGGCAA
161 Y T L D E E S R A R I K T R L F T I R Q

541 GAAATGGCCAGTAGGGTCTATGGGATTCCTTTTCGTCAGTCCGAGAGAGGCGAAGAGACA
181 E M A S R G L W D S F R Q S E R G E E T

601 ATTGAAGAAAGATTTGAAATCACAGGAACCATGCGCAGGCTTGCCGACCAAAGTCTCCCA
201 I E E R F E I T G T M R R L A D Q S L P

661 CCGAACTTCTCCAGCCTTGAAACTTTAGAGCCTATGTGGATGGATTTCGAACCGAACGGC
221 P N F S S L E N F R A Y V D G F E P N G

721 TGCATTGAGGGCAAGCTTTCTCAAATGTCAAAGAAGTGAACGCCAGAATTGAGCCATTT
241 C I E G K L S Q M S K E V N A R I E P F

781 CTGAGAACAACACCGCGCCTCCTCAGGTTACCTGATGGACCTCCTTGCTCTCAGCGGTCG
261 L R T T P R L L R L P D G P P C S Q R S

841 AAATTCCTGCTGATGGATGCCCTTAAATTAAGCATCGAAGACCCGAGTCATGAGGGGGAG
281 K F L L M D A L K L S I E D P S H E G E

901 GGGATACCGCTATATGATGCAATTAATGCATGAAGACATTTTTTCGGCTGGAAAAGAGCCC
301 G I P L Y D A I K C M K T F F G W K E P

961 AACATCGTAAAGCCACATGAAAAAGGCATAAACCCCAATTACCTCCTGGCTTGGGAAGCAG
321 N I V K P H E K G I N P N Y L L A W K Q

1021 GTGCTGGCAGAACTCCAAGATATTGAAAATGAGGAGAAAATCCCCAAAAACAAAGAACATG
341 V L A E L Q D I E N E E K I P K T K N M
1081 AAGAAAACAAGCCAGTTGAAGTGGGCACTTGGTGAGAACATGGCACCAGAGAAAAGTAGAC
361 K K T S Q L K W A L G E N M A P E K V D

1141 TTCGAGGACTGCAAAGATGTTAGTGACCTAAGGCAGTATGACAGTGATGAACCAGAGTCT
381 F E D C K D V S D L R Q Y D S D E P E S

1201 AGATCGCTAGCAAGCTGGATCCAGAGTGAATTCACAAGGCATGCGAATTGACAGACTCA
401 R S L A S W I Q S E F N K A C E L T D S

1261 AGTTGGATTGAGCTAGATGAAATAGGAGAAGACATTGCCCAATTGAGCACATTGCAAGT
421 S W I E L D E I G E D I A P I E H I A S

1321 ATGAGAAGAAATTATTTACGGCGGAAGTATCCCATTGCAGAGCTACTGAATACATAATG
441 M R R N Y F T A E V S H C R A T E Y I M

1381 AAGGGAGTGACATAAACACAGCTTTGTTGAATGCATCCTGTGCAGCCATGGATGACTTC
461 K G V Y I N T A L L N A S C A A M D D F

1441 CAATTGATTCCAATGATAAGCAAATGCAGAACAAAAGAAGGAAGACGGAAAACCAACCTG
481 Q L I P M I S K C R T K E G R R K T N L

1501 TACGGATTCAATTATAAAAAGGAAGATCCCCTTGAGAAATGACACTGATGTGGTAACTTT
501 Y G F I I K G R S H L R N D T D V V N F

1561 GTGAGTATGGAATTCTCTCTTACTGACCCGAGGTTGGAGCCACACAAAATGGGAAAAATAC
521 V S M E F S L T D P R L E P H K W E K Y

1621 TGCCTTCTCGAGATAGGAGACATGCTCCTACGGACTGCAATAGGCCAGGTGTCAAGGCC
541 C V L E I G D M L L R T A I G Q V S R P

1681 ATGTTCTGTATGTGAGAACCAATGGAACCTCCAAGATCAAGATGAAATGGGGTATGGAA
561 M F L Y V R T N G T S K I K M K W G M E

1741 ATGAGGCGATGCCTTCTTCAATCCCTCAGCAGATTGAGAGCATGATTGAGGCCGAGTCT
581 M R R C L L Q S L Q Q I E S M I E A E S

1801 TCTGTCAAAGAGAAGGACATGACCAAAGAATTTCTTTGAAAACAAATCAGAAACATGGCCA
601 S V K E K D M T K E F F E N K S E T W P

1861 ATCGGAGAGTCACCCAAAGGGGTGGAGGAAGGCTCTATCGGGAAGGTGTGCAGAACCTTA
621 I G E S P K G V E E G S I G K V C R T L

1921 CTAGCAAAATCTGTGTTCAACAGTCTATATGCATCTCCACAACCTCGAGGGGTTCTCAGCT
641 L A K S V F N S L Y A S P Q L E G F S A

1981 GAATCAAGAAAATTGCTTCTCATTGTTTCAGGCACTTAGGGATAACCTGGAACCTGGGACC
661 E S R K L L L I V Q A L R D N L E P G T

2041 TTCGATCTTGGGGGGCTATATGAAGCAATTGAGGAGTGCTGATTAATGATCCCTGGGTT
681 F D L G G L Y E A I E E C L I N D P W V

2101 TTGCTTAATGCGTCTTGGTTCAACTCCTTCCTCACACATGCACTGAAATAG
701 L L N A S W F N S F L T H A L K *

HA: Acc.No. DQ387854
NP: Acc.No. DQ792925
NA: Acc.No. DQ402042
M Acc.No. FJ743477

NS1:

1 ATGGATTCCAACACTGTGTCAAGCTTTTCAGGTAGACTGCTTTCTTTGGCATGTCCGCAAA
1 M D S N T V S S F Q V D C F L W H V R K
61 CGATTTGCAGACCAAGAAGACTGGGTGATGCCCATTCCTTGACCGGCTTCGCCGAGATCAG
21 R F A D Q E L G D A P F L D R L R R D Q
121 AAGTCCCTAAGAGGAAGAGGCAGCACTCTTGGTCTGGACATCGAAACAGCTACCCGTGCG
41 K S L R G R G S T L G L D I E T A T R A
181 GGAAAGCAGATAGTGGAGCGGATTCTGGAAGAAGAATCTGATGAGGCACTTAAGATGACT
61 G K Q I V E R I L E E E S D E A L K M T
241 ATTGCTTCAGTGCCGGCTTCACGCTACCTAACTGACATGACTCTTGAAGAGATGTCAAGG
81 I A S V P A S R Y L T D M T L E E M S R
301 GACTGGTTCATGCTCATGCCCAAACAGAAAGTGGCAGGTTCCCTTTGCATCAGAATGGAC
101 D W F M L M P K Q K V A G S L C I R M D
361 CAGGCAATAATGGATAAAAACATCATATTGAAAGCAAACCTTCAGTGTGATTTTTGACCGG
121 Q A I M D K N I I L K A N F S V I F D R
421 CTGGAAACCCTAATACTGCTTAGAGCTTTTCACAGAAGAAGGAGCAATTGTGGGAGAAATC
141 L E T L I L L R A F T E E G A I V G E I
481 TCACCGTTACCTTCTCTTCCAGGACATACTGATGAGGATGTCAAAAATGCAATTGGGGTC
161 S P L P S L P G H T D E D V K N A I G V
541 CTCATCGGAGGACTTGAATGGAATGATAACACAGTTTCGAGTCTCTGAAACTCTACAGAGA
181 L I G G L E W N D N T V R V S E T L Q R
601 TTCGCTTGGAGAAGCAGTAATGAGGATGGGAGACCTCCACTCCCTCCAAAACAGAAACGG
201 F A W R S S N E D G R P P L P P K Q K R
661 AAAATGGCGAGAACAATTGAGTCAGAAGTTTGA
221 K M A R T I E S E V *

NS2:

1 ATGGATTCCAACACTGTGTCAAGCTTTTCAGGACATACTGATGAGGATGTCAAAAATGCAA
1 M D S N T V S S F Q D I L M R M S K M Q
61 TTGGGGTCCCTCATCGGAGGACTTGAATGGAATGATAACACAGTTTCGAGTCTCTGAAACTC
21 L G S S S E D L N G M I T Q F E S L K L

```

121   TACAGAGATTCGCTTGGAGAAGCAGTAATGAGGATGGGAGACCTCCACTCCCTCCAAAAC
41     Y R D S L G E A V M R M G D L H S L Q N

181   AGAAACGGAAAATGGCGAGAACAATTGAGTCAGAAGTTTGAAGAAAATAAGATGGCTGATT
61     R N G K W R E Q L S Q K F E E I R W L I

241   GAAGAAGTGCACATAGATTGAAGATTACAGAGAACAGCTTCGAACAGATAACGTTTATG
81     E E V R H R L K I T E N S F E Q I T F M

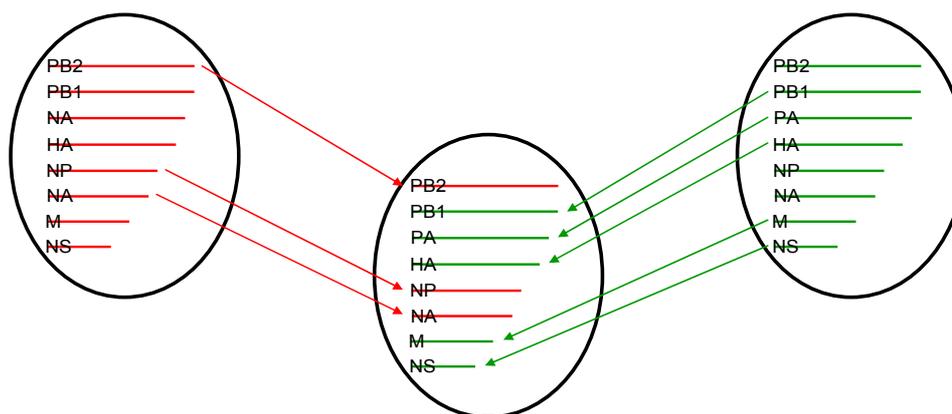
301   CAAGCCTTACAACACTATTGCTTGAAGTGGAGCAAGAGATAAGAACTTTCTCGTTTCAGCTT
101    Q A L Q L L L E V E Q E I R T F S F Q L

361   ATTTAA
121   I *
    
```

7.2.2 A/Mallard/Bavaria/1-R/2005 H7N2

A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2 LPAI

A/FPV/Bratislava/79 H7N7 HPAI



H7N2-Reassortant HPAI

PB2:

```

1     ATGGAGAGAATAAAAGAACTAAGAGATTTAATGTCACAGTCTCGCACTCGCGAGATACTT
1     M E R I K E L R D L M S Q S R T R E I L

61    ACAAAAACCACAGTGGACCATATGGCCATAATTAAGAAGTACACATCAGGAAGACAGGAG
21    T K T T V D H M A I I K K Y T S G R Q E

121   AAGAACCCTGCACTCAGAATGAAATGGATGATGGCAATGAAGTACCCAATCACAGCAGAC
41    K N P A L R M K W M M A M K Y P I T A D

181   AAGAGAATAATGGAGATGATTCCTGAAAAGAAATGAACAAGGGCAGACACTTTGGAGTAAA
61    K R I M E M I P E R N E Q G Q T L W S K
    
```

241 ACAAACGATGCTGGATCAGATCGGGTTATGGTATCACCCCTAGCAGTAACATGGTGAAC
81 T N D A G S D R V M V S P L A V T W W N

301 AGAAATGGGCCGACAACAAGCACAGTCCATTACCCAAAGGTTTACAAAACCTACTTTGAG
101 R N G P T T S T V H Y P K V Y K T Y F E

361 AAGATTGAAAGATTGAAGCATGGAACCTTTGGTCCTGTCCGTTTCCGAAACCAAGTCAAA
121 K I E R L K H G T F G P V R F R N Q V K

421 ATACGTCGCAGGGTTGATATAAATCCTGGTCATGCCGATCTCAGTTCTAAAGAAGCGCAA
141 I R R R V D I N P G H A D L S S K E A Q

481 GATGTCATCATGGAGGTCGTTTTCCCAAATGAAGTGGGAGCCAGGATATTAACATCGGAG
161 D V I M E V V F P N E V G A R I L T S E

541 TCACAATTGACAATAACTAAAGAGAAGAAGGAAGAAGAACTTCAGGACTGTAAAATTGCTCCC
181 S Q L T I T K E K K E E L Q D C K I A P

601 CTAATGGTCGCATACATGTTGGAGAGAGAATTGGTCCGCAAGACCAGATTCCCTTCCAGTT
201 L M V A Y M L E R E L V R K T R F L P V

661 GCTGGTGAACAAGCAGTGTATACATTGAAGTATTGCATTTAACACAAGGAACATGCTGG
221 A G G T S S V Y I E V L H L T Q G T C W

721 GAACAAATGTACTCCAGGTGGAGAAGTGAGAAATGATGATGTTGATCAGAGCTTAATC
241 E Q M Y T P G G E V R N D D V D Q S L I

781 ATTGCTGCTAGAAACATAGTTAGGAGAGCAGCGGTATCAGCAGACCCACTGGCATCGCTA
261 I A A R N I V R R A A V S A D P L A S L

841 TTGGAGATGTGTCATAGCACACAAATTGGTGGGATAAGAATGGTAGACATCCTCAGACAG
281 L E M C H S T Q I G G I R M V D I L R Q

901 AATCCAACAGAAGAACAAGCCGTGGATATATGCAAGGCAGCAATGGGCCTGAGGATCAGC
301 N P T E E Q A V D I C K A A M G L R I S

961 TCATCCTTCAGCTTTGGAGGCTTCACTTTCAAAAAGAACAAGTGGATCATCTGTCAAGAGA
321 S S F S F G G F T F K R T S G S S V K R

1021 GAAGAGGAAGTGCTTACAGGCAACCTCCAAACATTGAAAATAAGAGTACATGAAGGGTAC
341 E E E V L T G N L Q T L K I R V H E G Y

1081 GAGGAATTCACAATGGTTGGGCGAAGAGCAACAGCTATCCTAAGGAAAGCAACCAGAAGG
361 E E F T M V G R R A T A I L R K A T R R

1141 CTGATTCAGCTGATAGTAAGTGAAGAGACGAACAGTCAATCGCTGAAGCAATCATTGTA
381 L I Q L I V S G R D E Q S I A E A I I V

1201 GCAATGGTGTCTCACAGGAAGATTGTATGATAAAAAGCGGTCCGAGGTGATCTGAATTTT
401 A M V F S Q E D C M I K A V R G D L N F

1261 GTAAACAGAGCGAATCAGAGACTTAATCCCATGCATCAACTCTTAAGACACTTCCAGAAA
421 V N R A N Q R L N P M H Q L L R H F Q K

1321 GATGCAAAAGTATTATTTCAAAATTGGGGGATTGAGCCCATTGACAATGTCATGGGAATG
441 D A K V L F Q N W G I E P I D N V M G M

1381 GTCGGAATATTACCTGACATGACTCCGAACACAGAGATGTCACTAAGAGGAGTGAGGGTC
461 V G I L P D M T P N T E M S L R G V R V

1441 AGTAGGATGGGGTGGATGAATATTCCAGCACCGAGAGAGTGGTCGTGAGTATTGACCGT
481 S R M G V D E Y S S T E R V V V S I D R

1501 TTCTTAAGGGTTCGAGATCAACGTGGGAATGTGCTATTGTCTCCCGAAGAGGTTAGCGAA
501 F L R V R D Q R G N V L L S P E E V S E

1561 ACGCAGGGAACAGAGAAGTTGACAATAACATATTCATCGTCAATGATGTGGGAGATTAAT
521 T Q G T E K L T I T Y S S S M M W E I N

1621 GGTCCAGAGTCAGTGTGGTCAATACCTATCAATGGATCATCAGAAATTGGGAAACTGTA
541 G P E S V L V N T Y Q W I I R N W E T V

1681 AAGATCCAGTGGTCCCAGGATCCTACAATGCTATAACAATAAGATGGAGTTCGAACCTTTT
561 K I Q W S Q D P T M L Y N K M E F E P F

1741 CAGTCCCTTAGTACCTAAAGCTGCTAGAGGCCAATACAGTGGGTTTGTGAGGACACTGTTC
581 Q S L V P K A A R G Q Y S G F V R T L F

1801 CAACAAATGCGAGATGTGCTTGGGACATTTCGACACTGTTCAAATAATAAACTGCTTCCC
601 Q Q M R D V L G T F D T V Q I I K L L P

1861 TTTGCTGCGGCCCCACCGGAGCAGAGTAGGATGCAATTTTCTTCTCTAACAGTTAATGTA
621 F A A A P P E Q S R M Q F S S L T V N V

1921 AGGGGATCAGGAATGAGAATGCTCGTGAGAGGCAACTCCCCGTGTTCAACTACAACAAG
641 R G S G M R M L V R G N S P V F N Y N K

1981 GCAACCAAGAGGCTTACTGTCTCTCGGGAAGGACGCAGGTGCACTGACAGAAGATCCAAAT
661 A T K R L T V L G K D A G A L T E D P N

2041 GAAGGCACAGCTGGAGTGGAATCTGCTGTACTGAGAGGGTTCTTAATCTGGGCAAAGAA
681 E G T A G V E S A V L R G F L I L G K E

2101 AACAAAGAGGTATGGACCAGCATTGAGCATCAACGAACTGAGCAATCTTGCGAAAAGGGGAG
701 N K R Y G P A L S I N E L S N L A K G E

2161 AAAGCTAACGTGTTGATAGGGCAAGGAGACGTGGTGTGGTAATGAAACGGAAACGGGAC
721 K A N V L I G Q G D V V L V M K R K R D

2221 TCTAGCATACTTACTGACAGCCAGACAGCGACCAAAAAGGATTCGGATGGCCATCAATTAG
741 S S I L T D S Q T A T K R I R M A I N *

PB1:

1 ATGGATGTCAATCCGACTTTACTGTTCTTGAAAGTTCTTGCACAAAATGCAATAAGTACT
1 M D V N P T L L F L K V P A Q N A I S T

61 ACGTTCCCTTACACTGGAGATCCTCCATACAGCCATGGAACAGGGACAGGATACACCATG
21 T F P Y T G D P P Y S H G T G T G Y T M

121 GACACAGTCAACAGGACACACCAATATTCGGAAAAGGGGAAATGGACAACAAACTGAG
41 D T V N R T H Q Y S E K G K W T T N T E

181 ACTGGAGCACCCCAACTTAATCCAATTGATGGCCCATTCCTGAGGACAATGAACCAAGT
61 T G A P Q L N P I D G P L P E D N E P S

241 GGATATGCACAAACAGACTGCGTCCTGGAAGCAATGGCTTTTCTTGAAGAATCCCATCCA
81 G Y A Q T D C V L E A M A F L E E S H P

301 GGAATCTTTGAAAACCTCGTGTCTTGAGACGATGGAAGTTGTTCAACAAACAAGAGTGGAC
101 G I F E N S C L E T M E V V Q Q T R V D

361 AAAGTACCCCAAGGCCGTCAGACTTATGATTGGACTTTGAATAGAAACCAGCCTGCTGCA
121 K L T Q G R Q T Y D W T L N R N Q P A A

421 ACTGCATTAGCAAACACTATAGAGGTCTTTAGATCGAATGGTCTAACAGCTAATGAATCA
141 T A L A N T I E V F R S N G L T A N E S

481 GGGAGGCTCATAGATTTCTCAAGGATGTGATGGAATCAATGGATAAGGAGGAAATGGAG
161 G R L I D F L K D V M E S M D K E E M E

541 ATAACAACACATTTCCAACGAAAGAGAAGAGTAAGAGACAACATGACCAAGAAAATGGTC
181 I T T H F Q R K R R V R D N M T K K M V

601 ACACAAAGAACAATAGGGAAGAAAAAGCAGAGACTTAACAAAAGGAGCTACCTAATAAGG
201 T Q R T I G K K K Q R L N K R S Y L I R

661 GCTCTAACATTGAACACAATGACGAAAGATGCAGAAAAGAGGTAAACTGAAGAGAAGAGCA
221 A L T L N T M T K D A E R G K L K R R A

721 ATTGCAACACCAGGGATGCAGATCAGAGGGTTTGTGTACTTTGTTGAGACACTGGCGAGA
241 I A T P G M Q I R G F V Y F V E T L A R

781 AGCATTTGCGAGAAGCTTGAACAGTCTGGGCTACCAGTTGGAGGGAATGAGAAGAAAGCT
261 S I C E K L E Q S G L P V G G N E K K A

841 AAATTGGCAAATGTCGTGAGGAAGATGATGACGAACTCACAAGACACTGAGCTCTCTTTC
281 K L A N V V R K M M T N S Q D T E L S F

901 ACAATCACCGGAGACAATACCAAATGGAATGAGAACCAAAACCCCGAATGTTCTTGCA
301 T I T G D N T K W N E N Q N P R M F L A

961 ATGATAACATACATCACAAGAAACCAACCTGAGTGGTTTAGAAATGCTTGGAGCATCGCG
321 M I T Y I T R N Q P E W F R N V L S I A

1021 CCGATAATGTTTTCGAACAAAATGGGAAGGCTAGGGAAAGGTACATGTTGAAAAGCAAA
341 P I M F S N K M G R L G K G Y M F E S K

1081 AGCATGAAGCTCCGAACACAAATACCAGCAGAAATGCTAGCAAGTATTGATCTAAAATAT
361 S M K L R T Q I P A E M L A S I D L K Y

1141 TTCAATGAACCAACAAGGAAGAAAATCGAGAAAATAAGGCCTCTCATAATAGACGGCACA
381 F N E P T R K K I E K I R P L I I D G T

1201 GCCTCATTAAGCCCGGAATGATGATGGGTATGTTCAACATGCTGAGTACAGTGTGGGA
401 A S L S P G M M M G M F N M L S T V L G

1261 GTCTCAATCCTGAATCTTGGGCAAAAGAGATACACCAAAACCATACTGTTGGGATGGA
421 V S I L N L G Q K R Y T K T T Y W W D G

1321 CTTAGTCTCTGATGATTTTTGCTCTCATCGTGAATGCACCAAAATCATGAGGGAATACAA
441 L Q S S D D F A L I V N A P N H E G I Q

1381 GCGGGAGTGGATAGATTCTACAGAACCTGCAAGCTAGTTGGGATCAATATGAGCAAGAAA
461 A G V D R F Y R T C K L V G I N M S K K

1441 AAGTCCTATATAAATAGGACAGGAACATTCGAATTCACAAGCTTTTTCTACCGCTATGGA
481 K S Y I N R T G T F E F T S F F Y R Y G

1501 TTTGTAGCCAATTTTAGTATGGAGTTGCCAGCTTTGGAGTATCAGGAATTAATGAATCA
501 F V A N F S M E L P S F G V S G I N E S

1561 GCTGATATGAGCATTGGAGTAACAGTGATAAAGAATAACATGATAAACAATGATCTTGGA
521 A D M S I G V T V I K N N M I N N D L G

1621 CCGGCAACAGCCCAAATGGCTCTCCAATTATTCATCAAGGACTACAGATATACATACAGG
541 P A T A Q M A L Q L F I K D Y R Y T Y R

1681 TGTCACAGGGGAGACACACAAATCCAAACGAGGAGGTCATTTCGAGCTAAAGAAGCTGTGG
561 C H R G D T Q I Q T R R S F E L K K L W

1741 GAGCAGACCCGCTCAAAGGCAGGACTGTTGGTTTTAGATGGCGGACCAAACCTGTACAAC
581 E Q T R S K A G L L V S D G G P N L Y N

1801 ATTCGGAATCTCCACATCCCAGGAGTTTGCCTGAAATGGGAACTAATGGATGAAGACTAT
601 I R N L H I P E V C L K W E L M D E D Y

1861 CAGGGAAGACTTTGTAATCCCATGAACCCGTTTGTTCAGTCATAAGGAAATGGAATCTGTA
621 Q G R L C N P M N P F V S H K E I E S V

1921 AACAAATGCTGTGGTAATGCCAGCCCATGGTCCAGCCAAAAGCATGGAATATGATGCTGTG
641 N N A V V M P A H G P A K S M E Y D A V

1981 GCAACTACACACTCTTGGATCCCTAAGAGAAACCGTTCCATTCTCAATACGAGTCAAAGG
661 A T T H S W I P K R N R S I L N T S Q R

2041 GGAATCCTTGAGGATGAACAAATGTACCAGAAGTGTGCAACCTATTCGAGAAATTCCTC
681 G I L E D E Q M Y Q K C C N L F E K F F

2101 CCTAGCAGCTCATAACAGAAGACCAGTTGGAATTTCCAGTATGGTGGAGGCCATGGTGTCT
701 P S S S Y R R P V G I S S M V E A M V S

2161 AGGGCCCGGATTGATGCACGAATTGACTTCGAGTCTGGAAGGATTAAGAAGGAAGAGTTT
721 R A R I D A R I D F E S G R I K K E E F

2221 GCTGAGATCATGAAGATCTGTTCCACCATTGAAGAGCTCAGACGGCAGAAATAG
741 A E I M K I C S T I E E L R R Q K *

PA:

1 ATGGAAGACTTTGTGCGACAATGCTTCAATCCAATGATCGTCGAGCTTTCGCGAAAAAGCA
1 M E D F V R Q C F N P M I V E L A E K A

61 ATGAAAGAATATGGAGAGGACCCAAAACCTCGAAAACAAACAAATTCGCCGCAATATGCACA
21 M K E Y G E D P K L E T N K F A A I C T

121 CATTTGGAAGTATGCTTCATGTATTTCAGATTTCCACTTCATCGATGAACGGGGTGAATCA
41 H L E V C F M Y S D F H F I D E R G E S

181 ATAATTGTAGAATCCAGTATCCAAATGCACCTTCTGAAGCACCGATTTGAGATAATTGAA
61 I I V E S S D P N A L L K H R F E I I E

241 GGAAGAGATCGCACAATGGCTTGGACGGTGGTGAATAGCATTGTAATACCGCAGGGGTT
81 G R D R T M A W T V V N S I C N T A G V

301 GAGAAACCCAAATTTCTTCCGGATTTGTATGATTATAAGGAGAACCGATTTATTGAGGTT
101 E K P K F L P D L Y D Y K E N R F I E V

361 GGAGTGACAAGAAGGGAGGTCCACATATACTACTTAGAAAAAGCCAATAAGATAAAATCC
121 G V T R R E V H I Y Y L E K A N K I K S

421 GAGAAGACACACATCCACATCTTCTCATTCACTGGGGAGGAAATGGCCACTAAAAGAGGAC
141 E K T H I H I F S F T G E E M A T K E D

481 TACTCTTTGACGAAGAAAGCAGAGCAAGGATCAAAAACCAGGCTATACACCATAAGGCAA
161 Y T L D E E S R A R I K T R L Y T I R Q

541 GAAATGGCCAGTAGAGGCCTCTGGGATTCCTTTTCGTCAGTCCGAGAGAGGCGAAGAGACA
181 E M A S R G L W D S F R Q S E R G E E T

601 ATTGAAGAAAGATTTGAAATCACAGGAACTATGCGCAGGCTTGCCGACCAAAGTCTCCCA
201 I E E R F E I T G T M R R L A D Q S L P

661 CCGAACTTCTCCAGCCTTGAAAACCTTTAGAACCTATGTGGATGGATTGGAACCGAACGGC
221 P N F S S L E N F R T Y V D G F E P N G

721 TGCATTGAGGGCAAGCTTTCTCAAATGTCCAAAGAAGTAAATGCAAGGATCGAGCCGTTT
241 C I E G K L S Q M S K E V N A R I E P F

781 TTGAAGACAACACCACGCCCTCTCAGATTACCTGATGGGCCTCCCTGCTCTCAGCGGTCA
261 L K T T P R P L R L P D G P P C S Q R S

841 AAGTTCTACTAATGGATGCTCTGAAATTAAGTATTGAAGACCCAAGCCATGAGGGGGAG
281 K F L L M D A L K L S I E D P S H E G E

901 GGAATACCGCTATATGATGCAATAAAATGCATGAAAACATTCTTTGGCTGGAAAGAGCCC
301 G I P L Y D A I K C M K T F F G W K E P

961 AACATTGTCAAACACATGAGAAGGGCATAAAATCCCAACTATCTCCTGGCTTGGAGGCAG
321 N I V K P H E K G I N P N Y L L A W R Q

1021 GTGCTAGCAGAGCTGCAGGATATTGAGAATGAAGAGAAAAATCCCAAAAAACAAAAACATG
341 V L A E L Q D I E N E E K I P K T K N M

1081 AAGAAAACAAGCCAATTGAAATGGGCACTTGGTGAAAACATGGCACCAGAGAAAAGTAGAC
361 K K T S Q L K W A L G E N M A P E K V D

1141 TTTGAGGATTGCAAAGATGTTAGTGATCTAAAGCAATACGACAGTGACGAGCCAGAGCGG
381 F E D C K D V S D L K Q Y D S D E P E R

1201 AGGTCGCCAGCAAGTTGGATCCAGAGTGAATTCAACAAAGCATGTGAGCTGACTGATTCA
401 R S P A S W I Q S E F N K A C E L T D S

1261 AGTTGGATAGAACTTGATGAAATCGGGGAAGATGTGCGTCCAATTGAGCACATTGCAAGT
421 S W I E L D E I G E D V A P I E H I A S

1321 AGGAGGAGAACTATTTTACAGCAGAGGTGTCCCATTGCAGAGCAACGGAGTACATAATG
441 R R R N Y F T A E V S H C R A T E Y I M

1381 AAGGGGGTATACATAAAACTGCCTTGCTCAATGCATCCTGTGCAGCCATGGATGACTTC
461 K G V Y I N T A L L N A S C A A M D D F

1441 CAGTTGATTCCAATGATAAGCAAATGCAGAACCAAAGAAGGAAGCGGAAGACAAATCTG
481 Q L I P M I S K C R T K E G R R K T N L

1501 TATGGATTCAATTATAAAAGGGAGATCCCCTTGAGAAATGATACAGATGTAGTGAACCTT
501 Y G F I I K G R S H L R N D T D V V N F

1561 GTGAGCATGGAGTTCTCTTACTGATCCGAGGCTGGAGCCACACAAATGGGAGAAAGTAT
521 V S M E F S L T D P R L E P H K W E K Y

1621 TGTGTTCTTGAGATAGGAGACATGCTCCTACGGACTGCAATAGGCCAAGCATCAAGGCCT
541 C V L E I G D M L L R T A I G Q A S R P

1681 ATGTTCTTATATGTGAGGACCAATGGAACCTCCAAGATCAAGATGAAATGGGGTATGGAA
561 M F L Y V R T N G T S K I K M K W G M E

1741 ATGAGACGCTGCCTCCTTCAATCCCTCCAACAGATTGAGAGCATGATCGAATCCGAGTCC
581 M R R C L L Q S L Q Q I E S M I E S E S

1801 TCTGTCAAAGAGAAAGACATGACTAAAGAATTCTTTCGAAAACAAGTCTGAAACATGGCCC
601 S V K E K D M T K E F F E N K S E T W P

1861 ATTGGAGAATCACCTAAAGGAGTGAAGAAGGTTCCATTGGGAAAGTATGCAGGACTTTG
621 I G E S P K G V E E G S I G K V C R T L

1921 CTAGCGAAGTCTGTATTCAACAGCTTGTATGCATCTCCACAACCTAGAGGGATTTTCAGCT
641 L A K S V F N S L Y A S P Q L E G F S A

1981 GAATCAAGGAAACTGCTCCTTATTGTTTCAGGCACTTAGGGACAACCTGGAACCTGGAACC
661 E S R K L L L I V Q A L R D N L E P G T

2041 TTCAATCTTGAGGGCTATATGAAGCAATTGAGGAGTGCCTGATTAATGATCCCTGGGTT
681 F N L G G L Y E A I E E C L I N D P W V

2101 TTGCTTAATGCATCTTGGTTCAACTCCTTCCTCACACATGCACTAAAAATAG
701 L L N A S W F N S F L T H A L K *

HA:

1 ATGAACACTCAAATCCTGGTATTTCGCCCTTGTGGCAGTCATCCACACAAATGCAGACAAA
1 M N T Q I L V F A L V A V I H T N A D K

61 ATTTGCCTTGGACATCATGCTGTATCAAATGGCACCAAGGTAAACACACTCACTGAGAGA
21 I C L G H H A V S N G T K V N T L T E R

121 GGAGTAGAAGTTGTCAATGCAACAGAAACAGTGGAGCGGACAAACATCCCCAAAATTTGC
41 G V E V V N A T E T V E R T N I P K I C

181 TCAAAGGGAAAAGAACCCTTGGATCTTGGCCAATGCGGACTACTGGGGACCATTACCGGA
61 S K G K R T V D L G Q C G L L G T I T G

241 CAACCTCAATGTGACCAATTTCTAGAATTTTCAGCTGATTTAATAATCGAGAGGCGGGAC
81 Q P Q C D Q F L E F S A D L I I E R R D

301 GGAAATGATGTTTGTACCCGGGAAATTTGTGAATGGAGAGGCATTGCGGCAAATCCTC
101 G N D V C Y P G K F V N G E A L R Q I L

361 AGAAAATCAGGTGGGATTAACAAAGAAACAATGGGATTCACATACAGTGAATAAGAACC
121 R K S G G I N K E T M G F T Y S G I R T

421 AATGGAACAACCTAGTGCCTGTAGAAGATCAGGATCTTCATTCTATGCAGAAATGAAGTGG
141 N G T T S A C R R S G S S F Y A E M K W

481 CTCCTGTGAGATACAGACAATGCTGCTTTCCACAAATGACGAAATCATACAAAAACACA
161 L L S D T D N A A F P Q M T K S Y K N T

541 AGGAGAGAACCAGCTCTGATAGTCTGGGGAATCCATCATTGAGGATCAACCACCGAGCAG
181 R R E P A L I V W G I H H S G S T T E Q

601 ACCAAACTATATGGAAGTGGAAATAAACTGGTAACAGTCGGAAGTTCCAAATATCAGCAG
201 T K L Y G S G N K L V T V G S S K Y Q Q

661 TCTTTTGTGCCGAGTCCAGAAACACGACCACAAGTAAATGGCCAGTCCGACGAATTGAT
221 S F V P S P E T R P Q V N G Q S G R I D

721 TTTCCTGGTTGATACTGGATTCCAATGACACAGTTACTTTTTAGTTTCAATGGGGCTTTC
241 F H W L I L D S N D T V T F S F N G A F

781 ATAGCTCCAGATCGTGCTAGCTTCTTGAAGGGAAAGTCCATGGGAATCCAAAGCGATGTG
261 I A P D R A S F L K G K S M G I Q S D V

841 CAGGTTGATGCCAATTGCGAAGGGGAATGCTACCACAGTGGAGGGACCATAACAAGCAGT
281 Q V D A N C E G E C Y H S G G T I T S S

901 TTGCCCTTCCAAAACATCAACAGCAGGGCAGTTGGCAAGTGTCCAAGATATGTAAAACAG
 301 L P F Q N I N S R A V G K C P R Y V K Q

961 GAAAGTCTATTATTGGCAACAGGGATGAAGAATGTTCCCGAACTTTCCAAAAAAGAAGA
 321 E S L L L A T G M K N V P E L S K K R R

1021 AAAAGAGGCCTGTTTGGCGCCATAGCGGGGTTTATTGAAAATGGTTGGGAAGGTCTGGTC
 341 K R G L F G A I A G F I E N G W E G L V

1081 GACGGATGGTACGGTTTCAGGCATCAGAATGCTCAAGGAGAAGGAACTGCAGCAGACTAC
 361 D G W Y G F R H Q N A Q G E G T A A D Y

1141 AAAAGCACCCAGTCGGCAATTGATCAGATAACCGGAAAATTTAAATAGACTCATTGAGAAA
 381 K S T Q S A I D Q I T G K L N R L I E K

1201 ACTAATCAGCAATTTGAGCTAATAGATAATGAATTCAGTCTGAGGTAGAAAAGCAGATTGGC
 401 T N Q Q F E L I D N E F T E V E K Q I G

1261 AATGTAATTAAGTGGACCAGAGACTCCATCACAGAAGTATGGTCTTACAATGCTGAACTT
 421 N V I N W T R D S I T E V W S Y N A E L

1321 CTCGTGGCAATGGAAAATCAGCACACTATTGATCTAGCTGATTTCAGAGATGAACAAATTG
 441 L V A M E N Q H T I D L A D S E M N K L

1381 TATGAGCGAGTGAGGAAACAATTGAGGGAAAATGCTGAGGAAGATGGCACTGGTTGTTTT
 461 Y E R V R K Q L R E N A E E D G T G C F

1441 GAGATTTTCCACAAATGTGATGATGATTGTATGGCTAGTATAAGGAACAATACTTATGAT
 481 E I F H K C D D D C M A S I R N N T Y D

1501 CACAGCAAATACAGAGAAGAAGCAATGCAAAAATAGAATACAAATTGACCCAGTCAAATTG
 501 H S K Y R E E A M Q N R I Q I D P V K L

1561 AGTGGTGGCTACAAAGATGTGATACTTTGGTTTAGCTTCGGGGCGTCATGCTTTTTACTT
 521 S G G Y K D V I L W F S F G A S C F L L

1621 CTTGCCATTGCAATGGGCCTTGTCTTCATATGTGTGAAGAATGGAAAACATGCGGTGCACT
 541 L A I A M G L V F I C V K N G N M R C T

1681 ATTTGTATATAA
 561 I C I *

NP:

1 ATGGCGTCTCAAGGCACCAAACGATCTTATGAACAGATGGAAACTGGTGGGGAACGCCAG
 1 M A S Q G T K R S Y E Q M E T G G E R Q

61 AATGCTACTGAGATCAGAGCATCTGTTGGAAGAATGGTCGGTGGAAATTGGTAGATTCTAC
 21 N A T E I R A S V G R M V G G I G R F Y

121 ATACAGATGTGCACTGAACTCAAACCTCAGTACTATGAGGGGAGACTGATCCAGAACAGC
 41 I Q M C T E L K L S D Y E G R L I Q N S

181 ATAACAATAGAAAGAATGGTTCTCTCTGCATTTGATGAGAGGAGAAAACAAATACCTGGAA
 61 I T I E R M V L S A F D E R R N K Y L E

241 GAACACCCAGTGCAGGAAAAGATCCGAAGAAAACCTGGAGGTCCAATTTACAGAAGGAGA
 81 E H P S A G K D P K K T G G P I Y R R R

301 GATGGAAAATGGGTGAGAGAGCTGATTCTGTATGACAAAAGAAGAAATCAGAAGAATCTGG

101 D G K W V R E L I L Y D K E E I R R I W
361 CGTCAAGCAAACAATGGAGAGGATGCAACTGCTGGTCTCACTCATCTGATGATTTGGCAT
121 R Q A N N G E D A T A G L T H L M I W H
421 TCCAATTTGAATGATGCCACATATCAGAGAACAAGAGCTCTCGTGCGTACTGGGATGGAC
141 S N L N D A T Y Q R T R A L V R T G M D
481 CCCAGAATGTGCTCTCTGATGCAAGGATCAACTCTCCCCGAGGAGATCTGGAGCTGCTGGT
161 P R M C S L M Q G S T L P R R S G A A G
541 GCAGCAGTGAAGGGGTTGGAACGATGGTAATGGAGCTAATTCGGATGATAAAGCGGGG
181 A A V K G V G T M V M E L I R M I K R G
601 ATCAATGATCGGAATTTCTGGAGAGGTGAAAATGGACGAAGAACCAGGATTGCATATGAG
201 I N D R N F W R G E N G R R T R I A Y E
661 AGAATGTGCAATATCCTCAAAGGAAAATTTCAAACAGCAGCACAACGAGCAATGATGGAC
221 R M C N I L K G K F Q T A A Q R A M M D
721 CAAGTGCAGAAAGCAGGAATCCTGGGAATGCTGAGATTGAAGATCTCATCTTCTGGCA
241 Q V R E S R N P G N A E I E D L I F L A
781 CGGTCTGCACTCATCTGAGAGGATCAGTGGCTCATAAATCCTGCTTACCTGCTTGTGTA
261 R S A L I L R G S V A H K S C L P A C V
841 TATGGACTTGCTGTGGCCAGTGGATACGACTTTGAAAGAGAAGGGTACTCTCTGGTTCGGA
281 Y G L A V A S G Y D F E R E G Y S L V G
901 ATAGATCCTTTCCGTCTGCTTCAAACAGTCAAGTGTTCAGTCTCATTAGACCAAATGAG
301 I D P F R L L Q N S Q V F S L I R P N E
961 AATCCAGCACACAAGAGCCAACCTGATATGGATGGCATGCCATTCTGCAGCATTGGAAGAC
321 N P A H K S Q L I W M A C H S A A F E D
1021 CTGAGAGTGTCAAGCTTCATCAGAGGGACTAGAGTGGTTCCAAGAGGACAATTGTCCACC
341 L R V S S F I R G T R V V P R G Q L S T
1081 AGAGGAGTTCAAATTGCTTCAAATGAGAACATGGAAACAATGGACTCCAGCACTCTTGAA
361 R G V Q I A S N E N M E T M D S S T L E
1141 CTGAGAAGCAGATATTGGGCCATAAGAACCAGGAGTGGAGGAAACACCAACCAACAGAGA
381 L R S R Y W A I R T R S G G N T N Q Q R
1201 GCATCTGCAGGACAAATCAGCGTGCAACCCACTTTCTCAGTACAGAGAAATCTTCCCTTC
401 A S A G Q I S V Q P T F S V Q R N L P F
1261 GAGAGAGCGACCATCATGGCGGCATTACAGGGAACTGAGGGCAGAACATCTGACATG
421 E R A T I M A A F T G N T E G R T S D M
1321 AGAACTGAAATCATAAAAATGATGGAAAGTGCCAAACCAGAAGATGTGTCTTTCCAGGGG
441 R T E I I K M M E S A K P E D V S F Q G
1381 CGGGGAGTCTTCGAGCTCTCGGACGAAAAGGCAACGAACCCGATCGTGCCTTCCCTTGAC
461 R G V F E L S D E K A T N P I V P S F D
1441 ATGAGTAATGAGGGATCTTATTTCTTCGGAGACAATGCAGAGGAGTATGACAATTAA
481 M S N E G S Y F F G D N A E E Y D N *

NA:

1 ATGAATCCAAATCAGAAGATAATAACAATTGGCTCTGTCTCCCTAACCATTGCAACAGTA
1 M N P N Q K I I T I G S V S L T I A T V

61 TGT TTTCTCATGCAGATTGCCATTCTAGCAACGACTATAAACTGCACTTCAAGCAAAAT
21 C F L M Q I A I L A T T I T L H F K Q N

121 GGATGCAACATTCCCTCGAACAATCAAGTAATGCCATGTGAGCCAATCATAGTAGAAAGG
41 G C N I P S N N Q V M P C E P I I V E R

181 AATATAACAAAGATAGTGTATTTGAATAATACCACCATAGAAAAAGAACTTTGTCTTAAA
61 N I T K I V Y L N N T T I E K E L C P K

241 TTAATAGAATACAGGGATTGGTTCGAAGCCACAGTGTGAGATTACAGGATTGCTCCTTTC
81 L I E Y R D W S K P Q C Q I T G F A P F

301 TCCAAAGACAACCTCAATCCGGCTTTCTGCTGGTGGGGACATTTGGGTAACAAGGGAACCT
101 S K D N S I R L S A G G D I W V T R E P

361 TATGTGTCATGCAGTCCCGATAAATGTTATCAATTTGCACTTGGGCAGGGAACCACGCTA
121 Y V S C S P D K C Y Q F A L G Q G T T L

421 GACAACAAACACTCAAATGGCACAATACATGATAGGATTCCTCATCGAACCTTCTGATG
141 D N K H S N G T I H D R I P H R T L L M

481 AACGAGTTGGGTGTTCCATTTTCAATTTGGGGACCAAACAAGTGTGCATAGCATGGTCCAGC
161 N E L G V P F H L G T K Q V C I A W S S

541 TCAAGCTGTCATGATGGAAAGGCATGGTTACATGTTTGTGTTACTGGGGATGATAGAAAT
181 S S C H D G K A W L H V C V T G D D R N

601 GCAACTGCTAGTTTTCAATTTATGGTGGAGTGCTTGTGACAGTATTGGTTCATGGTCTCAA
201 A T A S F I Y G G V L V D S I G S W S Q

661 AATATTCTCAGAACTCAGGAGTCAGAATGCGTCTGCATCAATGGAACCTTGTGCAGTAGTA
221 N I L R T Q E S E C V C I N G T C A V V

721 ATGACTGATGGAAGTGCATCAGGAAGGGCTGATACTAGAATACTATTTCATTAGAGAGGGA
241 M T D G S A S G R A D T R I L F I R E G

781 AAAATTGTCCATAACCAGCCCATTGTCAGGAAGTGCTCAGCATATAGAGGAATGTTCTGT
261 K I V H T S P L S G S A Q H I E E C S C

841 TATCCACGCTACCCAGACGTTAGGTGTGTTTGCAGAGACAATTTGAAAAGGCTCAAATAGG
281 Y P R Y P D V R C V C R D N W K G S N R

901 CCCATTATAGATATAAATATGGCAGATTATAGCATTGATTCTAGTTATGTGTGCTCGGGG
301 P I I D I N M A D Y S I D S S Y V C S G

961 CTTGTTGGCGACACACCAAGAAACGATGATAGCTCTAGCAGCAGCAACTGCAAGGATCCC
321 L V G D T P R N D D S S S S S N C K D P

1021 AATAATGAGAGAGGGAACCCAGGGGTGAAAGGATGGGCTTTTGGACTATGGAAGTGACGTT
341 N N E R G N P G V K G W A F D Y G S D V

1081 TGGATGGGGAGAACAATCAGCAAGGATTCTCGCTCAGGTTATGAGACTTTTCAGAGTCATT
361 W M G R T I S K D S R S G Y E T F R V I

1141 GACGTTGGACCACAGCTAATTCCAAATCTCAGGTAAATAGACAAGTCATAGTTGACAAT
381 D G W T T A N S K S Q V N R Q V I V D N

1201 AATAACTGGTCTGGTTATTCTGGCATTCTCTGTTGAGGGCAGAAGTTGTATCAATAGA

401 N N W S G Y S G I F S V E G R S C I N R
 1261 TGTTTTTATGTGGAGTTGATAAGGGGAAGGCCACAAGAGACTAGAGTATGGTGGACTTCA
 421 C F Y V E L I R G R P Q E T R V W W T S
 1321 AACAGTATTGTAGTATTTTGTGGCACTTCAGGTACTTATGGAACAGGCTCATGGCCTGAT
 441 N S I V V F C G T S G T Y G T G S W P D
 1381 GGGGCGAATATCAATTTTCATGCCTATATAA
 461 G A N I N F M P I *

M1:

1 ATGAGTCTTCTAACCGAGGTGCGAAACGTACGTTCTCTCTATCATCCCGTCAGGCCCCCTC
 1 M S L L T E V E T Y V L S I I P S G P L
 61 AAAGCCGAGATCGCGCAGAGACTTGAAGATGTCTTTGCAGGGAAGAACACAGACCTTGAG
 21 K A E I A Q R L E D V F A G K N T D L E
 121 GCTCTCATGGAATGGCTAAAGACAAGACCGATCCTGTACCTCTGACTAAGGGGATTTTA
 41 A L M E W L K T R P I L S P L T K G I L
 181 GGGTTTGTGTTTACGCTCACCGTGCCAGTGAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTC
 61 G F V F T L T V P S E R G L Q R R R F V
 241 CAAAATGCCCTAAATGGGAACGGGGATCCGAACAACATGGATAGAGCCGTC AAGCTATAC
 81 Q N A L N G N G D P N N M D R A V K L Y
 301 AAGAAGCTAAAGAGAGAGATAAACA CTCCATGGAGCCAAGGAAGTGGCACTCAGTTACTCT
 101 K K L K R E I T L H G A K E V A L S Y S
 361 ACTGGTGCACCTTGCAAGTTGCATGGGTCTCATATACAACAGAATGGGA ACTGTGACCACA
 121 T G A L A S C M G L I Y N R M G T V T T
 421 GAGGTGGCATTAGGCCTAGTGTGTGCCACTTGTGAGCAAATTGCTGACTCACAGCATCGG
 141 E V A L G L V C A T C E Q I A D S Q H R
 481 TCTCACAGACAGATGGTGACCACCACCAATCCACTAATCAGGCATGAAAA CAGAATGGTG
 161 S H R Q M V T T T N P L I R H E N R M V
 541 CTGGCCAGCACTACGGCTAAGGCTATGGAGCAAATGGCTGGGTCAAGTGAACAGGCAGCG
 181 L A S T T A K A M E Q M A G S S E Q A A
 601 GAAGCCATGGAGTTGCTAGTCAGGCTAGGCAGATGGTGCAGGCGATGAGGACAGTTGGG
 201 E A M E V A S Q A R Q M V Q A M R T V G
 661 ACTCATCCTAGCTCCAGTGCTGGTCTGAAAGATGATCTCCTTGAAAATTTGCAGGCCTAC
 221 T H P S S S A G L K D D L L E N L Q A Y
 721 CAGAAACGGATGGGAGTGCAGCTGCAGCGATTCAAGTGA
 241 Q K R M G V Q L Q R F K *

M2:

1 ATGAGTCTTCTAACCGAGGTGCGAAACGCCTACCAGAAACGGATGGGAGTGCAGCTGCAGC
 1 M S L L T E V E T P T R N G W E C S C S
 61 GATTCAAGTGATCCTCTCGTTATTGCCGCAAGTATCATTGGGATCTTGC ACTTGATATTG
 21 D S S D P L V I A A S I I G I L H L I L

121 TGGATTCTTAATCGTCTTTTCTTCAAATGTATTTATCGTCGCCTTAAATACGGTTTGAAA
41 W I L N R L F F K C I Y R R L K Y G L K

181 AGAGGGCCTTCTACGGAAGGAGTGCCTGAGTCTATGAGGGAAGAATATCGGCAGGAACAG
61 R G P S T E G V P E S M R E E Y R Q E Q

241 CAGTATGCTGTGGATGTTGACGATGGTCATTTTGTCAACATAGAGCTGGAGTAA
81 Q Y A V D V D D G H F V N I E L E *

NS1:

1 ATGGATTCCAACACTGTGTCAAGCTTTTCAGGTAGACTGCTTTCTTTGGCATGTCCGCAAG
1 M D S N T V S S F Q V D C F L W H V R K

61 CGATTTGCAGACCAAGAAATGGGCGATGCTCCATTCCCTTGACCGCTTCGCCGAGATCAA
21 R F A D Q E M G D A P F L D R L R R D Q

121 AAGTCCCTGGGAGGAAGAGGCAGCACTCTTGGTCTGGACATCGAGACAGCTACTCGTGCT
41 K S L G G R G S T L G L D I E T A T R A

181 GGAAAGCAGATAGTGGAGCGGATTCTGGAGGAAGAATCCGATGAGGCACTTAAAAATGACC
61 G K Q I V E R I L E E E S D E A L K M T

241 ATTGCCTCTGCACCTGTTTCACGCTACCTAACTGACATGACTCTTGAGGAGATGTCAAG
81 I A S A P V S R Y L T D M T L E E M S R

301 GACTGGTTCATGCTCATGCCCAAACAGAAAGTGGCAGGCTCCCTTTGTATCAGAATGGAC
101 D W F M L M P K Q K V A G S L C I R M D

361 CAGGCAATCATGGACAAAAACATCACACTGAAAGCAAACCTTCAGTATAATTTTGTATCGA
121 Q A I M D K N I T L K A N F S I I F D R

421 TTGGAGACTCTAATACTACTAAGGGCTTTTCACCGAGGAGGGAGCAATTGTTGGCGAAATC
141 L E T L I L L R A F T E E G A I V G E I

481 TCACCAGTGCCTTCTCTTCCAGGACATACTGATGAGGATGTCAAAAATGCAATTGGGGTC
161 S P V P S L P G H T D E D V K N A I G V

541 CTCATCGGAGGACTTGAATGGAATGATAACACAGTTCGAGTCTCTGAAACTCTACAGAGA
181 L I G G L E W N D N T V R V S E T L Q R

601 TTCGCTTGAGAAGCAGTAATGAGGATAGGAGACCTCCACTCCCTCCAAAAGCAGAAACGG
201 F A W R S S N E D R R P P L P P K Q K R

661 AAAATGGCGAGAACAATTGAGTCAGAAGTTTGA
221 K M A R T I E S E V *

NS2:

1 ATGGATTCCAACACTGTGTCAAGCTTTTCAGGACATACTGATGAGGATGTCAAAAATGCAA
1 M D S N T V S S F Q D I L M R M S K M Q

61 TTGGGGTCCTCATCGGAGGACTTGAATGGAATGATAACACAGTTCGAGTCTCTGAAACTC
21 L G S S S E D L N G M I T Q F E S L K L

121 TACAGAGATTCGCTTGAGAAGCAGTAATGAGGATAGGAGACCTCCACTCCCTCCAAAAGC
41 Y R D S L G E A V M R I G D L H S L Q S

```

181      AGAAACGGAAAATGGCGAGAACAATTGAGTCAGAAGTTTGAAGAAATAAGGTGGTTGATT
61      R N G K W R E Q L S Q K F E E I R W L I

241      GAAGAAGTGAGACATAGATTGAAGATAACAGAGAATAGTTTCGAACAAAATAACATTTATG
81      E E V R H R L K I T E N S F E Q I T F M

301      CAAGCCTTACAACACTATTGCTTGAAGTGGAGCAAGAGATAAGAACTTTCTCGTTTCAGCTT
101     Q A L Q L L L E V E Q E I R T F S F Q L

361      ATTTAA
121     I *

```

7.2.3 A/Mallard/Bavaria/1/2006 H5N1

HA:	Acc.No.	DQ458992
NA:	Acc.No.	DQ458993
NP:	Acc.No.	DQ792924
M:	Acc.No.	FJ743479

7.2.4 A/Mallard/Bavaria/10/2007 H5N1

HA:	Acc.No.	FJ183472
NA:	Acc.No.	FJ183473
NP:	Acc.No.	FJ213606
M:	Acc.No.	FJ743480

7.2.5 A/Mallard/Bavaria/3/2006 H10N7

HA:	Acc.No:	FJ183474
NP:	Acc.No.	DQ792927
NA:	Acc.No.	FJ186475
M:	Acc.No.	FJ743478

7.3 Gesamtgenomvergleich von von H7N2, H5N2 und H7N7

Verglichen werden die Sequenzen von A/Mallard/Bavaria/1/2005 H5N2, A/Mallard/Bavaria/1-R/2005 H7N2 und A/FPV/Bratislava/79 H7N7.

PB2

H5N2	MERIKELRDLMSQSRTRILTKTTVDHMAIIKKYTSGRQEKNPALRMKMMAMKYPITADKRIMEMIPERNEQGQTLWSK	80
H7N2	-----	80
H7N7	-----	80
H5N2	TNDAGSDRVMVSPPLAVTWNRNGPTTSTVHYPKVYKTYFEKIERLKHGTFGVFRNQVKIRRRVDINPGHADLSSKEAQ	160
H7N2	-----	160
H7N7	-----	160
H5N2	DVIMEVVPNEVGARILTSESQLTITKEKKEELQDCKIAPLMVAYMLERELVRKTRFLPVAGGTSSVYIEVLHLLTQGTWC	240
H7N2	-----	240
H7N7	-----	240
H5N2	EQMYTPGGEVRNDDVDQSLIIAARNIVRAAVSADPLASLLEMCHSTQIGGIRMVDILRQNPTEEQAVDICKAAMGLRIS	320
H7N2	-----	320
H7N7	-----	320
H5N2	SSFSFGGFTFKRTSGSSVKREEEVLTGNLQTLKIRVHEGYEFTMVGRRATAILRKATRRLIQLIVSGRDEQSIAEAIIV	400
H7N2	-----	400
H7N7	-----	400
H5N2	AMVFSQEDCMIKAVRGDLNLFVNRANQRLNPMHQLLRHFQKDAKVLFGQNWGIEPIDNVMGMVGILPDMTPNTEMSLRGVRV	480
H7N2	-----	480
H7N7	-----	480
H5N2	SRMGVDEYSSTERVVVSIIDRFLRVRDQRGNVLLSPEEVSETQGTTEKLTITYSSMMWEINGPESVLVNTYQWIIRNWEIV	560
H7N2	-----	560
H7N7	-----	560
H5N2	KIQWSQDPTMLYNKMEFEPFQSLVPKAARGQYSGFVRTLFGQMRDVLGTFDVTQI I KLLPFAAAPPEQSRMQFSSLTVNV	640
H7N2	-----	640
H7N7	-----	640
H5N2	RGSGMRMLVRGNSPVFNYNKATKRLTVLGKDAGALTEDPNEG TAGVESAVLRGFLILGKENKRYGPALSINELSNLAKGE	720
H7N2	-----	720
H7N7	-----	720
H5N2	KANVLIGQGDVVLVMKRKRDS SILTDSQTATKRIRMAIN	759
H7N2	-----	759
H7N7	-----	759

PB1

H5N2	MDVNP TLLFLKVPAQNAI STTFPYTGDPYPYSHGTGTGYTMDTVNRTHQYSEK GKWTNTTETGAPQLNP IDGPLPEDNEPS	80
H7N2	-----	80
H7N7	-----	80
H5N2	GYAQTD CVLEAMAFLEESHPIGIFENS CLETMEVVQQTRVDKLTQGRQTYDWT LNRNQP AATALANTIEVFRSNGLTANES	160
H7N2	-----	160
H7N7	-----	160
H5N2	GRLIDFLKDVME SMDKEEMEITTHFQRKRRVRDNMTKKMVTQRTIGKKKQRLNKRSYLIRALTLNTMTKDAERGKLRRA	240
H7N2	-----	240
H7N7	-----	240
H5N2	IATPGMQIRGFVYFVETLARSICEKLEQSGLPVGGNEKKAKLANVVRKMMTNSQDTELSFTITGDNTKWNENQNPRMFLA	320
H7N2	-----	320
H7N7	-----	320
H5N2	MITYITRNQPEWFRNVLSIAPIMFSNKMRLGKGYMFESKSMKLR TQIPAEMLANIDLK YFNESTRKKIEKIRSLIDGT	400
H7N2	-----	400
H7N7	-----	400

H5N2	ASLSPGMMGMFNMLSTVLGVSI LNLGQKRYTKTTYWWDGLQSSDDFALIVNAPNHEGIQAGVDRFYRTCKLVGINMSKK	480
H7N2	-----	480
H7N7	-----	480
H5N2	KSYINRTGTFEFTSFFYRYGFVANF SMELPSFGVSGINESADMSIGVTVIKNNMINNDLGPATAQMALQLFKDYRYTYR	560
H7N2	-----	560
H7N7	-----	560
H5N2	CHRGDTQIQTRRSFELKKLWEQTISKAGLLVSDGGPNLYNIRNLHIPEVCLKWELMDEDYQGRLCNPNPFVSHKEIESV	640
H7N2	-----	640
H7N7	-----	640
H5N2	NNAVVMPAHGPAKSMEYDAVATTHSWIPKRNRSILNTSQRGILEDEQMYQKCSLFEKFFPSSSYRRPVGISSMVEAMVS	720
H7N2	-----	720
H7N7	-----	720
H5N2	RARIDARIDFESGRIKKEEFAEIMKICSTIEELRRQK	757
H7N2	-----	757
H7N7	-----	757

PA

H5N2	MEDFVRQCFNPMIVELAEKAMKEYGEDPKLETNKFAAICTHLEVCFMYSDFHFIDERGESIIVESCDPNALLKHRFEIEE	80
H7N2	-----	80
H7N7	-----	80
H5N2	GRDRMTAWTVNSICNTIGVEKPKFLPDLYDYKENRFIEIGVTRREVHIYYLEKANKIKSEKTHIHIFSFTGGEEMATKAD	160
H7N2	-----	160
H7N7	-----	160
H5N2	YTLDEESRARIKTRLFTIRQEMASRWLWDSFRQSERGEETIEERFEITGTMRRLADQSLPPNPFSSLENFRAYVDGFEPNG	240
H7N2	-----	240
H7N7	-----	240
H5N2	CIEGKLSQMSKEVNARIEPFLSTTPRLLRLPDGPPCSQRSKFLMDALKLSIEDPSHEGEGIPLYDAIKCMKTFFGWKEP	320
H7N2	-----	320
H7N7	-----	320
H5N2	NIVKPHEKGINPNYLLAWKQVLAELQDIENEKIPKTKNMKKSQKWKALGENMAPEKVDVFEDCKDVSDDLKQYDSDEPES	400
H7N2	-----	400
H7N7	-----	400
H5N2	RSIASWIQSEFNKACELTDSSWIELDEIGEDLAPIEHIASMRNYFTAEVSHCRATEYIMKGVYINTALLNASCAAMDDF	480
H7N2	-----	480
H7N7	-----	480
H5N2	QLIPMISKCRKTEGRRKTNLYGFIKGRSHLRNDTDVNVFVSMFSLTDPRLPHKWEKYCVLEIGDMLLRRTAIGVSRP	560
H7N2	-----	560
H7N7	-----	560
H5N2	MFLYVRTNGTSKIKMKWGMEMRRCLLQSLQQIESMIEAESSVKEKDMTKEFFENKSETWPIGESPKEGVEEGSIGKVCRTL	640
H7N2	-----	640
H7N7	-----	640
H5N2	LAKSVFNLSLYASPQLEGFSAESRKLILLVQALRDNLPEGTFLLGGLYEAIEECLINDPWVLLNASWFNSFLTHALK	716
H7N2	-----	716
H7N7	-----	716

NP

H5N2	MASQGTKRSYEQMETGGERQNATEIRASVGRMVGIGRFYIQMCTELKLSDYEGRLIQNSITIERMVLSAFDERRNKYLE	80
H7N2	-----	80
H7N7	-----	80
H5N2	EHPSAGKDPKKTGGPIYRRRDGKVVRELILYDKEEIRRIWRQANNGEDATAGLTHLMIWHSNLNDATYQRTRALVRTGMD	160
H7N2	-----	160
H7N7	-----	160
H5N2	PRMCSLMQGSTLPRRSGAAGAAVKGVGTMMELIRMIKRGINDRNFWRGENGRRTRAYERM CNILKGFQTAAQRAMMD	240
H7N2	-----	240
H7N7	-----	240

H5N2	QVRESRNPNGNAEIEDLIFLARSALILRGSVAHKSCLPACVYGLAVASGYDFEREGYSLVGIDPFRLQLNSQVFLIRPNE	320
H7N2	-----	320
H7N7	-----	320
H5N2	NPAHKSQLIWMACHSAAFEDLRVSSFIRGTRVVPRGQLSTRGVQIASNENMETMDSITLELRSDRYWAIRTRSGGNTNQQR	400
H7N2	-----	400
H7N7	-----	400
H5N2	ASAGQISVQPTFSVQRNLPFERATIMAAFTGNTEGRITSDMRTEIIKMMESAKPEDVSFQGRGVFELSDEKATNPVPSFD	480
H7N2	-----	480
H7N7	-----	480
H5N2	MSNEGSYFFGDNAEEYDN	498
H7N2	-----	498
H7N7	-----	498

M1

H5N2	MSLLTEVETYVLSIIPSGPLKAEIAQRLEDVFAGKNTDLEALMEWLKTRPILSPLTKGILGFVFTLTPSERGLQRRRFV	80
H7N2	-----	80
H7N7	-----	80
H5N2	QNALNGNGDPNMDRAVKLYKCLKREITPHGAKEVALSYSTGALASCMGLIYNRMGTVTTEVAHGLVCATCEQIADSQHR	160
H7N2	-----	160
H7N7	-----	160
H5N2	SHRQMVTTTNPILIRHENRMVLASTTAKAMEQMAGSSEQAAEAMEVASQARQMVQAMRTIHTHPSSSAGLKDDLLENLQAY	240
H7N2	-----	240
H7N7	-----	240
H5N2	QKRMGVQMQRFK	252
H7N2	-----	252
H7N7	-----	252

M2

H5N2	MSLLTEVETPTRNGWECKCSDSSDPLVIAASIIIGILHLILWILDRLFFKCIYRRLKYGLKRGVSTEGVPEMREEYRQEQ	80
H7N2	-----	80
H7N7	-----	80
H5N2	QSAVDVDDGHFVNIIVLE	97
H7N2	-----	97
H7N7	-----	97

NS1

H5N2	MDSNTVSSFQVDCFLWHVRKRFADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSTLGLDIETATRAGKQIVERILEESDEALKMT	80
H7N2	-----	80
H7N7	-----	80
H5N2	IASVPSRYLTDMTLEEMSRDWFMLMPKQKVAGSLCIRMDQAIMDKNILKANFSVIFDRLETLLLLRAFTEEGAIVGEI	160
H7N2	-----	160
H7N7	-----	160
H5N2	SPLPSLPGHTDEDVKNAIGVLIGGLEWNDNTVRVSETLQRFARSSNEDGRPPLPPKQKRKMARTIESEV	230
H7N2	-----	230
H7N7	-----	230

NS2

H5N2	MDSNTVSSFDILMRMSKMQLGSSSEDLNGMITQFESLKLYRDSLGEAVMRMGDLHSLQNRNGKWREQLSQKFEEIRWLI	80
H7N2	-----	80
H7N7	-----	80
H5N2	EEVRHRLKITENSFEQITFMQALQLLLEVEQEIRTFQSLI	121
H7N2	-----	121
H7N7	-----	121

7.4 Veröffentlichungen

Droebner K, Haasbach E, Fuchs C, Weinzierl A, Stevanovic S, Büttner M, Planz O.

Antibodies and CD⁺ T-cell mediate cross-protection against H5N1 influenza virus infection in mice after vaccination with a low virus pathogenic H5N2 strain.

Vaccine 2009, doi:10.1016/j.vaccine.2008.09.051

Rinder M, Lang V, Fuchs C, Hafner-Marx A, Bogner KH, Neubauer A, Büttner M, Rinder H.

Genetic evidence for multi-event imports of avian influenza virus A (H5N1) in Bavaria, Germany.

Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2007, 19(3):279-282.

Fuchs C.

Vermehrung und molekulare Charakterisierung neuer Isolate aviärer Influenza Viren (AI) in Bayern.

Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG) e.V. AVID-Tagung, 13.-15.09.2006.

Fuchs C.

Aviäre Influenza Viren in Bayern: Charakterisierung und Vermehrung.

DVG-Tagung, Garmisch-Partenkirchen, 26.-29.09.2006.

Fuchs C.

Development of a multiplex RT-PCR for rapid detection of virulence criteria in influenza A virus genomes.

Third European Congress of Virology, Nürnberg, 2007.

7.5 Lebenslauf

Name	Cordula Fuchs
Adresse	Einsteinstrasse 9 85521 Ottobrunn
Telefonnummer	089 – 32497241 0162 – 7167209
Email	cofuchs@web.de
Geburtsdatum	04.08.1979
Geburtsort	Tübingen
Eltern	Harald Fuchs Mathematiker an der Universität Tübingen Susanne Fuchs Kinderkrankenschwester
Geschwister	Johannes (37), Bauingenieur Annette (35), Betriebswirtin
Ausbildung	1986 – 1999 : Schulausbildung Abschluss: allgemeine Hochschulreife 10/1999 – 12/2004 : Biologiestudium in Tübingen Abschluss: Diplom – Biologin 01/2006 – 12/2008 : Promotion am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittel- Sicherheit, Oberschleißheim

8 LITERATUR

Al Fares S, Cartet G, Ferraris O, Norder H, Valette M, Lina B. Divergent genetic evolution of hemagglutinin in Influenza A H1N1 and A H1N2 subtypes isolated in the south-France since the winter of 2001-2002. *Journal of Clinical Virology* 2005, **33**(3):230-236.

Alexander DJ. Avian influenza – diagnosis. *Zoonoses Public Health*, 2008, **55**:16-23.

Alexander DJ. An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine*, 2007,**25**(30), 5637-5644.

Alexander DJ. Summary of avian influenza activity in Europe, Asia, Africa, and Australasia, 2002-2006. *Avian Diseases*, 2007, **51**(1):161-6.

Avery RJ. Abortive infection of L cell by influenza virus: absence of of virion RNA synthesis. *Journal of Virology*, 1975,**16**(2):311-314.

Bateman AC, Busch MG, Karasin AI, Bovin N, Olsen CW.

Amino Acid 226 in the Hemagglutinin of H4N6 Influenza Virus Determines Binding Affinity for α -2,6-linked Sialic Acid and Infectivity Levels in Primary Swine and Human Respiratory Epithelial Cells. *Journal of Virology*, 2008, **82**(16):8204-8209.

Baum LG, Paulson LC. Sialyloligosaccharides of the respiratory epithelium in the selection of human influenza virus receptor specificity. *Acta Histochemica Supplement*, 1990, **40**:35-38.

Betakova T, Ciampor F, Hay AJ. Influence of residue 44 on the activity of the M2 proton channel of influenza A virus. *Journal of General Virology*, 2005, **86**: 181-184.

Bizanov G, Janakova L, Knapstad SE, Karlstad T, Bakke H, Haugen IL, Haugan A, Amdal HH, Haneberg B. Immunoglobulin-A antibodies in upper airway secretions may inhibit intranasal influenza virus replication in mice but not protect against clinical illness. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2005, **61**(6): 503-510.

Blok V, Cianci C, Tibbles KW, Inglis SC, Krystal M, Digard P. Inhibition of the Influenza virus RNA-dependent RNA polymerase by antisera against the carboxy-terminal region of the PB2 subunit. *Journal of General Virology*, 1996, **77**:1025-1033.

Boon ACM, de Mutsert G, Fouchier RAM, Osterhaus ADME, Rimmelzwaan GF. The Hypervariable Immunodominant NP₄₁₈₋₄₂₆ Epitope from the Influenza A Virus Nukleoprotein Is Recognized by Cytotoxic T Lymphocytes with High Functional Activity. *Journal of Virology* 2006, **80**(12):6024-6032.

Bragstad K, Jorgensen PH, Handberg KJ, Mallegaard S, Corbet S, Fomsgaard A. New avian influenza A virus subtype combination H5N7 identified in Danish mallard ducks. *Virus Research*, 2005, **109**(2):181-190.

Brown EG, Bailly JE. Genetic analysis of mouse-adapted influenza A virus identifies roles of the NA, PB1, and PB2 genes in virulence. *Virus Research*, 1999, **61**:63-76.

Brown EG. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Veterinarian Microbiology*, 2000, **74**:29-46.

Brown EG, Liu H, Kit LC, Baird S, Nesrallah M. Pattern of mutation in the genome of influenza A virus on adaptation to increased virulence in the mouse lung: identification of functional themes. *PNAS USA*, 2001, **98**:6883-6888.

Bruschke C, Bruckner G, Vallat B. International standards and guidelines for vaccination of poultry against highly pathogenic avian influenza. *Development of Biology*, 2007, **130**: 23-30.

Budowsky EI, Smirnov YA, Shenderovich SF. Principles of selective inactivation of viral genome. VIII. The influence of beta-propiolactone on immunogenic and protective activities of influenza virus. *Vaccine*, 1993, **11**(3):343-348.

Capua I, Alexander DJ. Avian influenza: recent developments. *Avian Pathology*, 2005, **33**: 393-404.

Carr SM, Carnero E, García-Satre A, Brownlee GG, Fodor E. Characterization of a mitochondrial-targeting signal in the PB2 protein of influenza viruses. *Virology*, 2006, **344**(2):492-508.

Castiglioni P, Hall de S, Jacovetty EL, Ingulli E, Zanetti M. Protection against influenza A virus by memory CD8 T cells requires reactivation by bone marrow-derived dendritic cell. *Journal of Immunology*, 2008, **180**(7): 4956-4964.

Causey D, Edwards SV. Ecology of avian influenza virus in birds. *Journal of Infectious Diseases*, 2008, **197**(1):29-33.

Chávez-Galán L, Arenas-Del Angel MC, Zenteno E, Chávez R, Lascurain R. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cellular and Molecular Immunology*, 2009, **6**(1):15-25.

Chen H, Bright RA, Subbarao K, Smith C, Cox NJ, Katz JM, Matsuoka Y. Polygenic virulence factors involved in pathogenesis of 1997 Hong Kong H5N1 influenza viruses in mice. *Virus Research*, 2007, **128**:159-163.

Chen Z, Li Y, Krug RM. Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *The EMBO Journal*, 1999, **18**:2273-83.

Choi YK, Ozaki H, Webby RJ, Webster RG, Peiris JS, Poon L, Butt C, Leung YHC, Guan Y. Continuing Evolution of H9N2 Influenza Viruses in Southeastern China. *Journal of Virology*, 2004, **78**(16):8609-8614.

Choi YK, Nguyen TD, Ozaki H, Webby RJ, Pthavathana P, Buranathal C, Chaisingh A, Auewarakul P, Hanh NTH, Ma SK, Hui PY, Guan Y, Peiris JSM, Webster RG. Studies of H5N1 influenza virus infection in pigs by using viruses isolated in Vietnam and Thailand in 2004. *Journal of General Virology*, 2005, **79**:10821-10825.

Claas ECJ, Osterhaus ADME, Van Beek R, De Jong JC, Rimmelzwaan GF, Senne DA, Krauss S, Shortridge KF, Webster RG. Human Influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *The Lancet*, 1998, **351**(9101):472-477.

Cononello GM, Zamarin D, Perrone LA, Tumpey T, Palese P. A Single Mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and the 1918 Influenza A Viruses Contributes to Increased Virulence. *PLOS*, 2007, **3**(10):e141.

Conly JM, Johnston BL. Avian influenza – The next pandemic? *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2004, **15**(5):252-254.

Crawford PC, Dubovi EJ, Castleman WL, Stephenson I, Gibbs EP, Chen L, Smith C, Hill RC, Ferro P, Pompej J, Bright RA, Medina MJ, Johnson CM, Olsen CW, Cox NJ, Klimov AI, Katz JM, Donis RO. Transmission of Equine Influenza Virus to Dogs. *Science*, 2005, **310**:482-485.

Debrovina et al. Zh Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol 1995Effect of mutation in the NS gene on the biological properties of the influenza virus.*Zh Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1995, **3**:75-79.

De Jong MD, Thanh TT, Khanh TH, Hien VM, Smith GJD, Chau NV, VanCam B, Qui OT, Ha DQ, Guan Y, Peiris JSM, Hien TT, Farrar J.Osetamivir Resistance during Treatment of Influenza A (H5N1) Infection. *New England Journal of Medicine*, 2005, **353**(25):2667-2672.

Deyde VM, Xu X, Bright RA, Shaw M, Smith CB, Zhang Y, Shu Y, Gubreva LV, Cox NJ, Klimov AI.Surveillance of Resistance to Adamantanes among Influenza A(H3N2) and A(H1N1) Viruses Isolated Worldwide. *Journal of Infectious Diseases*, 2007, **196**(2):249-257.

Donelan NR, Basler CF, García-Sastre A.A Recombinant Influenza Virus Expressing an RNA-Binding-Defective NS1 Protein Induces High Levels of Beto Interferon an Is Attenuated in Mice.*Journal of Virology*, 2003, **77**(24):13257-13266.

Droebner K, Haasbach E, Fuchs C, Weinzierl A, Stevanovic S, Büttner M, Planz O.Antibodies and CD⁺ T-cell mediate cross-protection against H5N1 influenza virus infection in mice after vaccination with a low virus pathogenic H5N2 strain. *Vaccine* 2009, doi:10.1016/j.vaccine.2008.09.051

Dubrovina TI, Egorov AI, Ivanova IA, Pokhil'ko AV, Poliak RI. The effect of mutation in the NS gene on the biological properties of the influenza virus. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, 1995, **3**:75-79.

Epstein SL. Prior H1N1 Influenza Infection and Susceptibility of Cleveland Family Study Participants during the H2N2 Pandemic of 1957: An Experiment of Nature. *Journal of Infectious Diseases*, 2006, **193**:49-53.

Evseenko VA, Bukin EK, Zaykovskaya AV, Sharshov KA, Ternovoi VA, Ignatyev GM, Shestopalov AM. Experimental infection of H5N1 HPAI in BALB/c mice. *Virology Journal*, 2007, **4**:77.

Fechter P, Mingay L, Sharps J, Chambers A, Fodor E. Two Aromatic Residues in the PB2 Subunit of Influenza RNA Polymerase Are Crucial for Cap Binding. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278**(22):20381-20388.

Fernandez-Sesma A, Marukian S, Ebersole BJ, Kaminski D, Park MS, Yuen T, Sealfon SC, García-Sastre A, Moran TM. Influenza virus evades innate and adaptive immunity via the NS1 protein. *Journal of Virology*, 2006, **80**:6295-304.

Fiore AE, Shay DK. Comment and update on influenza prevention and treatment. *Clinical Infectious Diseases*, 2007, **45**(5):670-671.

Fouchier RAM, Munster V, Wallenstein A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus ADME. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gills. *Journal of General Virology*, 2005, **79**:2814-2822.

Fouchier RAM. Avian influenza, human-Netherlands (09): fatal case. *Reported in: ProMED-mail(online), Boston: International Society for Infectious Diseases, report no 20030419.0959, April 19, 2003 (www.promedmail.org).*

Fouchier RAM, Schneeberger PM, Rozendaal FW, Broekman JM, Kemink SAG, Munster V, Kuiken T, Rimmelzwaan GF, Schutten M, van Doornum GJJ, Koch G, Bosman A, Koopmans M, Osterhaus ADME. Avian influenza A Virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *PNAS*, 2004, **101**(5):1356-1361.

Fouchier RAM, Munster V, Wallenstein A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith DJ, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus ADME. Functional constraints of influenza A virus epitopes limit escape from cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Virology*, 2005, **79**(17):11239-46.

Gabriel G, Dauber B, Wolff T, Planz O, Klenk H-D, Stech J. The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host. *PNAS*, 2005, **102**(51):18590-18595.

Gabriel G, Abram M, Keiner B, Wagner R, Klenk H-D, Stech J. Differential Polymerase Activity in Avian and Mammalian Cells Determines Host Range of Influenza Virus. *Journal of Virology*, 2007, **81**(17):9601-9604.

Gabriel G, Herwig A, Klenk H-D. Interaction of Polymerase Subunit PB2 and NP with Importin α 1 Is a Determinant of Host Range of Influenza A Virus. *PLOS Pathogens*, 2008, **4**(2):e11.

Gaidet N, Cattoli G, Hammoumi S, Newman SH, Hagemeijer W, Takekawa JY, Capelle J, Dodman T, Joannis T, Gil P, Monne I, Fusaro A, Capua I, Manu S, Micheloni P, Ottosson U, Mshelbwala JH, Lubroth J, Domenech J, Monicat F. Evidence of Infection by H5N2 Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses in Healthy Wild Waterfowl. *PLOS Pathogens*, 2008, **4**(8): e1000127.

García-Sastre A, Egorov A, Matassov D, Brandt S, Levy DE, Durbin JE, Palese P, Muster T. Influenza A virus lacking NS1 gene replicates in interferon-deficient system. *Virology*, 1998, **525**:324-30.

Gastaminaz P, Perales B, Falcón AM, Ortín J. Mutation in the N-Terminal region of Influenza Virus PB2 Protein Affects Virus Replication but Not Transcription. *Journal of Virology*, 2003, **77**(9):5098-5108.

Geflügelpestverordnung. *BGBl. I Nr. 51 vom 22.10.2007 S. 2348*

Gerdil C. The annual production cycle for influenza vaccine. *Vaccine*, 2003, **21**(16):1776-1779.

Gibbs JS, Malide D, Hornung F, Bennink JR, Yewdell JW. The Influenza A Virus PB2-F1 Protein Targets the Inner Mitochondrial Membrane via a Predicted Basic Amphipathic Helix That Disrupts Mitochondrial Function. *Journal of Virology*, 2003, **77**(13):7214-7224.

Gongora C, Mechti N. Interferon signalling pathways. *Bull Cancer*, 1999, **86**:911-19.

Govorka EA, Gambarayan AS, Claas EC, Smirnov YA. Amino acid changes in the hemagglutinin and matrix proteins of influenza (H2) viruses adapted to mice. *Acta Virology*, 2000, **44**:241-248.

Grimm D, Staeheli P, Hufbauer M, Koerner I, Martínez-Sobrido L, Solórzano A, García-Sastre A, Haller O, Kochs G. Replication fitness determines high virulence of influenza A virus in mice carrying functional *Mx1* resistance gene. *PNAS*, 2007, **104**(16):6806-6811.

Grob G. The Deadly Truth : A History of Diseases in America. *Cambridge : Harvard University Press*, 2000.

Gujuluva CN, Kundu A, Murti KG, Nayak DP. Abortive replication of influenza virus A/WSN/33 in HeLa229 cells: defective viral entry and budding processes. *Virology*, 1994, **204**(2):491-505.

Guo Z, Chen LM, Zeng H, Gomez JA, Plowden J, Fujita T, Katz JM, Donis RO, Sambhara S. NS1 Protein of Influenza A Virus Inhibits the Function of Intracytoplasmic Pathogen Sensor, RIG-I. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2007, **36**(6):263-9.

Hale BG, Randall RE, Ortin J, Jackson D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *Journal of General Virology*, 2008, **89**:2359-76.

Hampson AW, Mackenzie JS. The influenza viruses. *The Medical Journal of Australia*, 2006, **185**(10):39-43.

Hara K, Schmidt FI, Crow M, Brownlee GG. Amino Acid Residues in the N-Terminal Region of the PA Subunit of Influenza A Virus RNA Polymerase Play a Critical Role in Protein Stability, Endonuclease Activity, Cap Binding, and Virion RNA Promotor Binding. *Journal of Virology*, 2006, **80**(16):7789-7798.

Harder TC and Werner O. Avian Influenza. Influenza Report 2006 *Flying Publisher*, <http://www.influenzareport.com/ir/ai.htm>

Haye K, Bourmakina S, Moran T, García-Sastre A, Fernandez-Sesma A. The NS1 protein of a human influenza virus inhibits type I interferon production of antiviral responses in

primary dendritic and respiratory epithelial cells. *Journal of Virology*, 2009, doi:10.1128/JVI.02323-08.

Hayman A, Comely S, Lackenby A, Hartgroves LCS, Goodbourn S, McCauley JW, Barclay WS. NS1 Proteins of Avian Influenza A Viruses Can Act as Antagonists of the Human Alpha/Beta Interferon Response. *Journal of Virology*, 2007, **81**(5):2318-2327.

Heinen PP, de Boer-Luijze EA, Bianchi TJ. Respiratory and systemic humoral and cellular immune responses of pigs to a heterosubtypic influenza A virus infection. *Journal of general Virology*, 2001, **82**:2697-2707.

Heinen PP. Swine influenza: a zoonosis. *Veterinary Sciences Tomorrow*, 15. September 2003, online erhältlich unter: <http://www.vetscite.org/publish/articles/000041/print.html>

Henklein P, Bruns K, Nimitz M, Wray V, Tessmer U, Schubert U. Influenza A virus protein PB1-F2: synthesis and characterization of the biologically active full length protein and related peptides. *Journal of Peptide Science*, 2005, **11**: 481-490.

Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster RG, Perez DR. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Archives of Virology*, 2001, **146**:2275-2289.

Hofmann MA, Renzullo S, Baumer A. Phylogenetic characterization of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses isolated in Switzerland in 2006. *Virus Genes*, 2008, **37**(3):407-13.

Honda A, Mizumoto K, Ishihama A. Two separate sequences of PB2 subunit constitute the RNA cap-binding site of influenza virus RNA polymerase. *Genes to Cells*, 1999, **4**:475-485.

Horimoto T, Kawaoka Y. The Hemagglutinin Cleavability of a Virulent Influenza Virus by Subtilisin-like Endoproteases Is Influenced by the Amino Acid Immediately Downstream of the Cleavage Site. *Virology*, 1995, **210**:466-470.

Hsieh YC, Wu TZ, Liu DP, Shao PL, Chang LY, Lu CY, Lee CY, Huang FY, Huang LM. Influenza pandemics: past, present and future. *Journal of Formosan Medical Association*, 2006, **105**(1):1-6.

Hui EK, Ralston K, Judd AK, Nayak DP. Conserved cystein and histidine residues in the putative zinc finger motif of the influenza A virus M1 protein are not critical for influenza virus replication. *Journal of General Virology*, 2003, **84**(Pt 11):3105-3113.

Hui EK, Smee DF, Wong M-H, Nayak DP. Mutations in Influenza M1 CCHH, the Putative Zinc Finger Motif, Cause Attenuation in Mice and Protect Mice against Lethal Influenza Virus Infection. *Journal of Virology*, 2006, **80**(12):5697-5707.

Hulse DJ, Webster RG, Russell RJ, Perez DR. Molecular Determinants within the Surface Proteins Involved in the Pathogenicity of H5N1 Influenza Viruses in Chickens. *Journal of Virology*, 2004, **78**(18):9954-9964.

Hulse-Post DJ, Franks J, Boyd K, Salomon R, Hoffmann E, Yen HL, Webby RJ, Walker D, Nguyen TD, Webster RG. Molecular Changes in the Polymerase Gens (PA and PB1) Associated with High Pathogenicity of H5N1 Influenza Virus in Mallard Ducks. *Journal of Virology*, 2007, **81**(16):8515-8524.

ICTVdB Index of Viruses – The Universal Virus Database. Orthomyxoviridae. *ICTBdB Management, Columbia University, New York, USA. 2004*
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_ortho.htm

Isoda N, Sakoda Y, Kishida N, Bai GR, Matsuda K, Umemura T, Kida H. Pathogenicity of highly pathogenic avian influenza virus, A/chicken/Yamaguchi/7/2004 (H5N1) in different species of birds and mammals. *Archives of Virology*, 2006, **151**:1267-1279.

Ito T, Okazaki K; Kawaoka Y, Takada A, Webster RG, Kida H. Perpetuation of influenza A viruses in Alaskan waterfowl reservoirs. *Archives of Virology*, 1995, **140**:1163-1172.

Ito T, Goto H, Yamamoto E, Tanaka H, Takeuchi M, Kawaoka Y, Otsuki K. Generation of a highly pathogenic avian influenza A virus from an avirulent field isolate by passaging in chickens. *Journal of Virology*, 2001, **75**(9):4439-4443.

Janeway CA Jr., Travers P, Walport M, Shlomchik M. Immunology, 5. Auflage. *Spektrum Verlag* 2005.

Jewell NA, Vaghefi N, Mertz SE, Akter P, Peebles RS, Bakaletz LO, Durbin RK, Flano E, Durbin JE. Differential type I interferon induction by respiratory syncytial virus and influenza A virus in vivo. *Journal of Virology*, 2007, **81**(18): 9790-9800.

Jiao P, Tian G, Denk G, Jiang Y, Liu C, Liu W, Bu Z, Kawaoka Y, Chen H. A Single-Amino-Acid Substitution in the NS1 Protein Changes the Pathogenicity of H5N1 Avian Influenza Viruses in Mice. *Journal of Virology*, 2008, **82**(3):1146-1154.

Jo SK, Kim HS, Cho SH, Seo SH. Pathogenesis and inflammatory responses of swine H1N2 influenza viruses in pigs. *Virus Research*, 2007, **129**:64-70.

Joosting ACC, Head B, Bynoe ML, Tyrell DAL. Production of common cold in human volunteers by influenza C. *British Medical Journal*, 1968, **4**:153-154.

Kaerber G. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch. Exp. Pathol. Pharmako.* 1931, **162**:480.

Kaleta EF, Gergarten G, Yilmaz A. Avian influenza A viruses in birds : an ecological, ornithological and virological view. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, Dez. 2005, **112**(12):448-56.

Kamps BS, Hoffmann C, Preiser W. Influenza Report 2006. *Flying Publisher*, www.influenzareport.com

Karasin AI, West K, Carman S, Olsen CW. Characterization of avian H3N3 and H1N1 influenza A viruses isolated from pigs in Canada. *J Clin Microbiol.* 2004, **42**(9):4349-54.

Katz JM, Lu X, Tumpey M, Smith CB, Shaw MW, Subbarao K. Molecular correlates of influenza A H5N1 virus pathogenesis in mice. *Journal of General Virology*, 2000, **74**:9322-9327.

Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG. Avian-to-Human Transmission of the PB1 Gene of Influenza A Viruses in the 1957 and 1968 Pandemics. *Journal of Virology* 1989,**63**(11):4603-4608.

Keawcharoen J, van Riel D, van Amerongen G, Bestebroer T, Beyer WE, van Lavieren R, Osterhaus ADME, Fouchier RAM, Kuiken T. Wild Ducks as Long-Distance Vectors of

Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1). *Emerging Infectious Diseases*, 2008, **14**(4):600-607.

Kida H, Ito T, Yasuda J, Shimizu Y, Itakura C, Shortridge KF, Kawaoka Y, Webster RG. Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs. *Journal of General Virology*, 1994, **75**(Pt 9):2183-2188.

Kochs G, García-Sastre A, Martínez-Sobrido L. Multiple anti-interferon actions of the Influenza A virus NS1 protein. *Journal of Virology*, 2007, **81**(13):7011-21.

Krug RM, Shaw M, Boni B, Shapiro G, Haller O. Inhibition of influenza viral mRNA synthesis in cells expressing the interferon-induced Mx gene product. *Journal of General Virology*, 1985, **56**:201-206.

Krug RM, Yuan W, Noah DL, Latham AG. Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: the role of the viral NS1 protein. *Virology*, 2003, **309**:181-189.

Lamb RA, Krug RM. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. *Fields Virology*, 2001, *Fourth Edition*:1487-1531.

Lanier LL. NK Cell Recognition. *Annual Review of Immunology*, 2005, **23**: 225-274.

Lee CW, Swayne DE, Linares JA, Senne DA, Suarez DL. H5N2 avian influenza outbreak in Texas in 2004: the first highly pathogenic strain on the United States in 20 years? *Journal of Virology*, 2005, **79**(17): 11412-21.

Li S, Schulman J, Itamura S, Palese P. Glycosylation of Neuraminidase Determines the Neurovirulence of Influenza A/WSN/33 Virus. *Journal of Virology*, 1993, **67**(11):6667-6673.

Li Z, Chen H, Jiao P, Deng G, Tian G, Li Y, Hoffmann E, Webster RG. Molecular basis of replication of duck H5N1 influenza viruses in mammalian mouse model. *Journal of Virology*, 2005, **79**:12058-12064.

Li Z, Jiang Y, Jiao P, Wang A, Zhao F, Tian G, Wang X, Yu K, Bu Z, Chen H. The NS1 Gene Contributes to the Virulence of H5N1 Avian Influenza Viruses. *Journal of Virology*, 2006, **80**(22):11115-11123.

Ling M-L, Rao P, Krug RM. The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits. *The EMBO Journal*, 2001, **20**(8), 2078-2068.

Lipatov AS, Govorka EA, Webby RJ. Influenza: emergence and control. *Journal of General Virology*, 2004, **78**(17):8951-8959.

Lipatov AS, Kwon YK, Sarmiento LV, Lager KM, Spackman E, Suarez DL, Swayne DE. Domestic Pigs Have Low Susceptibility to H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses. *PLOS Pathogens*, 2008, **4**(7): e100102.

Löndt BZ, Banks J, Alexander DJ. Highly pathogenic avian influenza viruses with low virulence for chickens in *in vivo* tests. *Avian Pathology*, 2008, **36**(5):347-350.

Löndt BZ, Banks J, Gardner R, Cox WJ, Brown IH. Induced increase in virulence of low virulence highly [corrected] pathogenic avian influenza by serial intracerebral passage in chickens. *Avian Diseases*, 2007, **51**(1 Suppl):396-400.

Loo YM, Fornek J, Crpchet N, Baywa G, Perwitasari O, Martinez-Sobrido L, Akira S, Gill MA, García-Sastre A, Katz MG, Gale Jr. M. Distinct RIG-I and MDA5 by RNA viruses in innate immunity. *Journal of Virology*, 2008, **82**:335-45.

Louie C. Avian Influenza : Myth or mass murder ? *Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology*, 2005, **16**(3):197-201.

Masunaga K, Mizumoto K, Kato H, Ishihama A, Toyoda T. Molecular Mapping of Influenza Virus RNA Polymerase by Site-Specific Antibodies. *Virology*, 1999, **265**:130-141.

Machala MK, Brydak LB. Various sides of influenza, part I : structure, replication, changeability of influenza viruses, clinical course of the disease, immunological response and laboratory diagnostics. *Pol Merkur Lekarski*, 2006 , **21**(123):270-276.

Maines TR, Lu H, Erb SM, Edwards L, Guarner J, Greer PW, Nguyen DC, Szretter KJ, Chen LM, Thawatsupha P, Chittaganpitch M, Waicharoen S, Nguyen DT, Nguyen T, Nguyen HH, Kim LH, Hoang LT, Kang C, Phuong LS, Lim W, Zaki S, Donis RO, Cox NJ, Kath JM, Tumpey TM. Avian influenza (H5N1) viruses isolated from humans in Asia in 2004 exhibit increased virulence in mammals. *Journal of Virology*, 2005, **79**:11788-11800.

Marangon S, Bortolotti L, Capua I, Bettio M, Della Pozza M. Low-pathogenicity avian influenza (LPAI) in Italy (2000-01): epidemiology and control. *Avian Diseases*. 2003, **47(3):1006-9**.

Marcus PI, Rojek JI, Sekellick MJ. Interferon induction and/or production and its suppression by influenza A viruses. *Journal of Virology*, 2005, **79(5):2880-2890**.

Martinez O, Tsibane T, Basler CF. Neutralizing anti-influenza virus monoclonal antibodies: therapeutics and tools for discovery. *International Reviews of Immunology*, 2009, **28(1): 69-92**.

Matrosovich MN, Gambaryan AS, Teneberg S, Piskarev VE, Yamnikova SS, Lvov DK, Robertson JS, Kalrsson KA. Avian influenza A viruses differ from human viruses by recognition of sialyloligosaccharides and gangliosides and by a higher conservation of the HA receptor-binding site. *Virology*, 1997, **233(1):224-34**.

Matrosovich MN, Krauss S, Webster RG. H9N2influenza A viruses from poultry in Asia have human virus-like receptor specificity. *Virology*, 2001, **281(2):156-162**.

Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk H-D. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *PNAS*, 2004, **101(39):4620-4624**.

Maxwell KL, Frappier L. Viral proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2007, **7:398-411**.

McCullers JA, Hoffmann E, Huber VC, Nickerson AD. A single amino acid change in the C-terminal domain of the matrix protein M1 of influenza B virus confers mouse adaption and virulence. *Virology*, 2005, **336:318-326**.

McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. Antigen-specific memory b cell development. *Annual Review of Immunology*, 2005, **23:487-513**.

Mibayashi M, Martinez-Sobrido L, Loo YM, Cardenas WB, Gale Jr. M, García-Sastre A. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*, 2001, **106:255-8**.

Mo IP, Brugh M, Fletcher OJ, Rowland GN, Swayne DE. Comparative pathology of chickens experimentally inoculated with avian influenza viruses of low and high pathogenicity. *Avian Diseases*, 1997, **41**(1):125-136.

Modrow S, Dietrich F, Truyen U. Molekulare Virologie. *Spektrum, Akademischer Verlag Heidelberg*, 2003, 2.Auflage.

Munster VJ, Wallenstein A, Baas C, Rimmelzwaan GF, Schutten M, Olsen B, Osterhaus ADME, Fouchier RA. Mallards and highly pathogenic avian influenza ancestral viruses, northern Europe. *Emerg. Infect Dis*, 2005, **11**(10):1545-51.

Munster VJ, de Wit E, van Riel D, Beyer WE, Rimmelzwaan GF, Osterhaus ADME, Kuiken T, Fouchier RAM. The Molecular Basis of the Pathogenicity of the Dutch Highly Pathogenic Human Influenza A H7N7 Viruses. *Journal of Infectious Diseases*, 2007, **196**(2): 258-265.

Naeve CW, Hinshaw VS, Webster RG. Mutation in the hemagglutinin receptor-binding site can change the biological properties of an influenza virus. *Journal of Virology*, 1984, **51**(2): 567-569.

Nagarajan S, Rajukumar K, Tosh C, Ramaswamy V, Purohit K, Saxena G, Behera P, Pattnail B, Pradhan HK, Dubey SC. Isolation and pathotyping of H9N2 avian influenza viruses in Indian poultry. *Veterinary Microbiology*, 2009, **133**(1-2):154-163.

Nagy A, Vostinakova V, Pindova Z, Honrickova J, Cernikova L, Sedlak K, Mojzis M, Dirbakova Z, Machova J. Molecular and phylogenetic analysis of the H5N1 avian influenza virus caused the first highly pathogenic avian influenza outbreak in poultry in the Czech Republic in 2007. *Vet. Microbiol*, 2009, **133**(3):257-63.

Nemeroff ME, Barabino SM, Li Y, Keller W, Krug RM. Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3'-end formation of cellular pre-mRNAs. *Molecular Cell*, 1998, **1**:991-1000.

Neumann G, Hobom G. Mutational analysis of influenza virus promoter elements *in vivo*. *Journal of General Virology*, 1995, **76**:1709-1717.

Neumann G, Kawaola Y. Host range restriction and pathogenicity in the context of influenza pandemic. *Emerging Infectious Diseases*, 2006, **12**(6):881-886.

Nicholson KG, Wood JM, Zambon M. Influenza. *The Lancet*, 2003, **362**(22):1733-45.

Noah DL, Twu KY, Krug RM. 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-mRNA. *Virology*, 2003, **307**:386-95.

Okamatsu M, Saito T, Yamamoto Y, Mase M, Tsuduku S, Nakamura K, Tsukamoto K, Yamaguchi S. Low pathogenicity H5N2 avian influenza outbreak in Japan during the 2005-2006. *Veterinary Microbiology*, 2007, **124**: 35-46.

Oldstone M. Viruses, Plaques & History. *New York : Oxford University Press*, 1998.

Ollier L, Caramella A, Giodanengo V, Lefebvre JC. High permissivity of human GepG2 hepatoma cells for influenza viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, **42**(12):5861-5865.

Olsen CW. The emergence of novel swine influenza viruses in North America. *Virus Research*, 2002, **85**:199-210.

Olsen CW, Brown IH, Easterday BC, Van Reeth K. Swine Influenza, in: Straw BE, Zimmermann JJ, d'Allaire S, Taylor DJ: Disease of swine. *Blackwell Publishing, Oxford, UK*, 2006, pp:469-482.

Opitz B, Rejaibi A, Dauber B, Eckhard J, Vinzing M, Schmeck B, Hippenstiel S, Suttrop N, Wolff T. IFNbeta induction by influenza A virus is mediated by RIG-I which is regulated by the viral NS1 protein. *Cell Microbiology*, 2007, **9**:930-38.

Owen RE, Yamada E, Thompson CI, Phillipson LJ, Thompson C, Taylor E, Zambon M, Osborn HM, Barclay WS, Borrow P. Alterations in receptor binding properties of recent human influenza H3N2 viruses are associated with reduced natural killer cell lysis of infected cells. *Journal of Virology*, 2007, **81**(20):11170-11178.

Paillot R, Grimmett H, Elton D, Daly JM. Protection, systemic IFN γ , and antibody responses induced by an ISCOM-based vaccine against a recent equine influenza virus in its natural host. *Veterinary Research*, 2008, **39**(3):21.

Pantin-Jackwood MJ, Suarez DL, Spackman E, Swayne DE. Age at infection affects the pathogenicity of Asia highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses in ducks. *Virus Research*, 2007, **130**(1-2):151-161.

Pardo J, Aquilo JI, Anel A, Martin P, Joeckel L, Borner C, Wallich R, Müllbacher A, Froelich CJ, Simon MM. The biology of cytotoxic cell granule exocytosis pathway: granzymes have evolved to induce cell death and inflammation. *Microbes and Infection*, 2009, **11**(4): 452-459.

Parks CL, Lathma T, Cahill A, O'neill RE, Passarotti CJ, Buonagurio DA, Bechert TM, D'Arco GA, Neumann G, Destefano J, Arendt HE, Obregon J, Shutyak L, Hamm S, Sidhu MS, Zamb TJ, Udem SA. Phenotypic properties resulting from directed gene segment reassortment between wild-type A/Sydney/5/97 influenza virus and the live attenuated vaccine strain. *Virology*, 2007, **367**(2):275-287.

Pasick J, Handel K, Robinson J, Copps J, Ridd D, Hills K, Kehler H, Cottam-Birt C, Neufeld J, Berhane Y, Czub S. Intersegmental recombination between the haemagglutinin and matrix genes was responsible for the emergence of a highly pathogenic H7N3 avian influenza virus in British Columbia. *Journal of General Virology*, 2005, **86**: 727-731.

Paul-Ehrlich-Institut. www.pei.de.

Pavlovic J, Haller O, Staeheli P. Human and Mouse Mx Proteins Inhibit Different Steps of the Influenza Virus Multiplication Cycle. *Journal of Virology*, 1992, **66**(4):2564-2569.

Phillippa J, Baas C, Beyer W, Bestebroer T, Fouchier R, Smith D, Schaftenaar W, Osterhaus AB. Vaccination against highly pathogenic avian influenza H5N1 virus in zoos using an adjuvanted inactivated H5N2 vaccine. *Vaccine*, 2007, **25**(19):3800-3808.

Poland GA, Jacobson RM, Targonski PV. Avian and pandemic influenza: An overview. *Vaccine*, 2007, **25**(16):3057-3061.

Portincasa P, Conti G, Chezzi C. Abortive replication of influenza A viruses in HeLa 229 cells. *Virus Research*, 1990, **18**(1):29-40.

Proenca-Módena JL, Macedo IS, Arruda E. H5N1 Avian Influenza Virus : An Overview. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2007, **11**(1):125-133.

Rimmelzwaan GF, Boon ACM, Voeten JTM, Berkhoff EGM, Fouchier RAM, Osterhaus ADME. Sequence variation in the influenza A virus nucleoprotein associated with escape from cytotoxic T lymphocytes. *Virus Research*, 2004, **103**:97-100.

Rinder M, Lang V, Fuchs C, Hafner-Marx A, Bogner KH, Neubauer A, Büttner M, Rinder H. Genetic evidence for multi-event imports of avian influenza virus A (H5N1) in Bavaria, Germany. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2007, **19**(3):279-282.

Samuel CE. Virus-Host Interaction Minireview Series: Human Immunodeficiency Virus, Hepatitis C Virus, and Influenza Virus. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, **281**(13):8305-8307.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning. *A Laboratory Manual*, 1989, second edition.

Sasaki S, He XE, Holmes TH, Dekker CL, Kemble GW, Arvin AM, Greenberg HB. Influence of prior influenza vaccination on antibody and B-cell responses. *PLOS ONE*, 2008, **3**(8): e2975.

Schnell JR, Chou JJ. Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus. *Nature*, 2008, **451**(7178):591-595.

Senne DA, Panigrahy B, Kawaoka Y, Pearson JE, Suss J, Lipkind M, Kida H, Webster RG. *Avian Diseases*, 1996, **40**: 425-437.--> Titel

Senne DA, Pedersen JC, Suarez DL, Panigrahy B. Rapid diagnosis of avian influenza (AI) and assessment of pathogenicity of avian H5 and H7 subtypes by molecular methods. *Developments in Biologicals*, 2006, **126**:171-177, Discussion 326-327.

Senne DA. Avian influenza in North and South America, 2002-2005. *Avian Diseases*, 2007; **51**(1):167-73.

Seo SE, Hoffmann E, Webster RG. Lethal H5N1 influenza viruses escape host antiviral cytokine responses. *Nature Medicine*, 2002, **8**(9):950-954.

Seo SH, Hoffmann E, Webster RG. The NS1 gene of H5N1 influenza viruses circumvents the host anti-viral cytokine responses. *Virus Research*, 2004, **103**(1-2):107-113.

Seo SH, Webby R, Webster RG. No apoptotic deaths and different levels of inductions of inflammatory cytokines in alveolar macrophages infected with influenza viruses. *Virology*, 2004, Vol. **329**(2):270-279.

Shaw LM, Stone KL, Colangelo CM, Gulcicek EE, Palese P. Cellular Proteins in Influenza Virus Particles. *PLOS Pathogens*, 2008, **4**(6):e1000085.

Shen J, Kirk BD, Ma J, Wang Q. Diversifying selective pressure on influenza B virus hemagglutinin. *J Med Virol*, 2009, **81**(1):114-24.

Shinya K, Hamm S, Hatta M, Ito H, Ito T, Kawaoka Y. PB2 amino acid 627 affects replicative efficiency, but not cell tropism, of Hong Kong H5N1 Influenza A viruses in mice. *Virology*, 2004, **320**:492-508.

Shinya K, Hatta M, Shinya Y, Takada A, Watanabe S, Halfman P, Horimoto T, Neumann G, Kim JH, Lim W, Guan Y, Peiris M, Kiso M, Suzuki T, Suzuki Y, Kawaoka Y. Characterization of a Human H5N1 Influenza A Virus Isolated in 2003. *Journal of Virology*, 2005, **79**(15):9926-9932.

Shinya K, Ebina M, Shinya Y, Ono M, Kasai N, Kawaoka Y. Influenza virus receptors in the human airway. *Nature*, 2006, **440**:435-436.

Si-Tahar M, Touqui L, Chignard M. Innate immunity and inflammation: two facets of the same anti-infectious reaction. *Clinical and Experimental Immunology*, 2009, **156**(2):194-8.

Sjolander A, Cox JC, Barr IG. ISCOMs: an adjuvant with multiple functions. *Journal of Leukocyte Biology*, 1998, **64**(6):713-23.

Smirnov YA, Gitelman AK, Govorkova EA, Lipatov AS, Kaverin NV. Influenza H5 virus escape mutants: immun protection and antibody production in mice. *Virus Research*, 2004, **99**:205-208.

Solórzano A, Webby RJ, Lager KM, Janke BH, García-Sastre A, Rich JA. Mutations in the NS1 protein of swine influenza virus impair anti-interferon activity and confer attenuation in pigs. *Journal of Virology*, 2005, **79**(12): 7535-43.

Spackman E, Senne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, Lohman K, Daum LK, Suarez DL. Development of a Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and the Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, **40**(9):3256-3260.

Spearman C. *Brit.J.Psychol.* 1908, Vol. 2: 227, zitiert nach Kaerber.

Spellen A. The Influenza Pandemic of 1918. www.ilt.columbia.edu/banneker/fproj/influ.htm

Starick E, Beer M, Hoffmann B, Staubach C, Werner O, Globig A, Strebelow G, Grund M, Durban M, Conraths FJ, Mettenleiter T, Harder T. Phylogenetic analysis of highly pathogenic avian influenza virus isolates from Germany in 2006 and 2007 suggest at least three separate introductions of H5N1 virus. *Veterinary Microbiology*, 2008, **128**(3-4):243-52.

Stech J, Garn H, Wegmann M, Wagner R, Klenk H-D. A new approach to an influenza live vaccine: modification of the cleavage site of hemagglutinin. *Nature Medicine*, 2005, **11**(6):683-689.

Steel J, Lowen AC, Pena L, Angel M, Solórzano A, Albrecht R, Perez DR, García-Sastre A, Palese P. Live Attenuated Influenza Viruses Containing NS1 Truncations as Vaccine Candidates against H5N1 HPAI. *Journal of Virology*, 2009, **83**:1742-1753.

Steinhauer DA. Role of Hemagglutinin Cleavage for the Pathogenicity of Influenza Virus. *Virology*, 1999, **258**:1-20.

Sturm-Ramirez KMT, Ellis T, Bousfield B, Dyrting K, Rehg JE, Poon L, Guan Y, Peiris M, Webster RG. Re-emerging H5N1 influenza viruses in Hong Kong in 2002 are highly pathogenic to ducks. *Journal of Virology*, 2004, **78**: 4892-4901.

Subbarao EK, London W, Murphy BR. A Single Amino Acid in the PB2 Gene Subunit of Influenza A Virus Is a Determinant of Host Range. *Journal of Virology*, 1993, **67**(4):1761-1764.

Sugaya N. Influenza-associated encephalopathy in Japan. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 2006, **13**(2):79-84.

Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM, Wang R, JinG, Fanning TG. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature* 2005, **437**:889-893.

Traeder W, Brune A, Rehagen M. Studie zur vorbeugenden Schutzwirkung des Paramunitätsinducers Parapoxvirus ovis (Zylexis®) vor einer experimentellen Belastungsinfektion von Katzenwelpen mit Calicivirus (Stamm FCV-KS 20). *Praktischer Tierarzt*, 2005, **86**(4): 230-238.

Uetani K, Hiroi M, Menguro T, Ogawa H, Kamisako T, Ohmori Y, Erzurum SC. Influenza A virus abrogates IFN-gamma response in respiratory epithelial cells by disruption of the Jak/Stat pathway. *European Journal of Immunology*, 2008, **38**(3): 1559-73.

Vahlenkamp TW, Harder T. Influenza virus infection in mammals. *Berli.Münch. Tierärztliche Wochenschrift* 2006, Heft 3/4:123-131.

Van der Goot JA, Koch G, de Jong MCM, van Boven M. Quantification of the effect of transmission of avian influenza (H7N7) in chickens. *PNAS*, 2005, **102**: 18141-6.

Van der Goot JA, Koch G, van Boven M, de Jong MCM. Variable effect of vaccination against highly pathogenic avian influenza (H7N7) virus on disease and transmission in pheasants and teals. *Vaccine*, 2007, **25**: 8318-25.

Van der Goot JA, van Boven M, Stegeman A, van de Water SGP, de Jong MCM, Koch G. Transmission of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus in Pekin ducks is significantly reduced by a genetically distant H5N2 vaccine. *Virology*, 2008, **382**(1):91-97.

Van Reeth K. Avian and swine influenza viruses: our current understanding of the zoonotic risk. *Veterinary Research*, 2007, **38**(2):243-260.

Walker JA, Kawaoka Y. Importance of conserved amino acid at the cleavage site of the haemagglutinin of a virulent avian influenza A virus. *Journal of General Virology*, 1993, **74**(Pt2):311-314.

Wan XF, Ozden M, Lin G. Ubiquitous reassortments in influenza A viruses. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, 2008, **6**(5):981-999.

Wang MZ, Tai CY, Mendel DB. Mechanism by Which Mutations at His274 Alter Sensitivity of Influenza A Virus N1 Neuraminidase to Oseltamivir Carboxylate and Zanamivir. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002, **46**(12):3809-3816.

Ward AC. Changes in the Neuraminidase of Neurovirulent Influenza Virus Strains. *Virus Genes*, 1995, **10**(3):253-260.

Webster RG, Geraci J, Petursson G, Skirnisson K. Conjunctivitis in human beings caused by influenza A virus of seals. *New England Journal of Medicine*, 1981, **304**:911.

Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev.* 1992, **56**(1):152-79.

Webster RG and Hulse DJ. Microbial adaptation and change: avian influenza. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 2004, **23**(2):453-465.

Webster RG, Krauss S, Hulse Post D, Sturm-Ramirez K. Evolution of influenza A viruses in wild birds. *Journal of Wildlife Diseases*, 2007, **43**:S1-S6.

Weltman JK, Skowron G, Lorient GB. Influenza A H5N1 hemagglutinin cleavable signal sequence substitutions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, **352**:177-180.

Whittaker G, Bui M, Helenius A. The role of nuclear import and export in influenza viruses. *Trends in Cell Biology*, 1996, **6**(2):67-71.

Wright PF, Webster RG. Orthomyxoviruses. In : D.E. Griffin, et al. *Editorial Fields Virology*, 2001. Philadelphia, PA, USA : Lippincott, Williams & Wilkins, pp:1533-79.

Yao Y, Mingay LJ, McCauley JW, Barclay WS. Sequences in influenza A virus PB2 protein that determine productive infection for an avian influenza virus in mouse and human cell lines. *Journal of Virology*, 2001, **75**(11):5410-5415.

Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T. The RNA helicase TIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature Immunology*, 2004, **5**:730-7-

Zamarin D, García-Sastre A, Xiao X, Wang R, Palese P. Influenza Virus PB1-F2 Protein Induces Cell Death through Mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLOS Pathogens*, 2005, **1**(1), e4.

Zamarin D, Martínez-Sbrido L, Kelly K, Mansour M, Sheng G, Vigil A, García-Sastre A, Palese P, Fong Y. Enhancement of oncolytic properties of recombinant Newcastle disease virus through antagonism of cellular innate immune response. *Molecular Therapy*, 2009, **17**(4) : 697-706.

Zambon MC. Epidemiology and pathogenesis of influenza *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1999, **44**. Topic B:3-9.

Zhirnov OP, Vorobjeva IV, Saphonova, Malyshev NA, Ovcharenko AV, Klenk HD. Specific Biochemical Features of Replication of Clinical Influenza Viruses in Human Intestinal Cell Culture. *Biochemistry (Moscow)*, 2007, **72**(4):398-408.