

A microscopic image of tissue, likely a histological section, showing a network of cells and fibers. The cells are stained blue, and there are numerous red-stained spots and structures scattered throughout the tissue. The overall appearance is that of a complex biological structure, possibly related to the respiratory system given the title.

**Vergleichende morphologische und funktionelle  
Untersuchungen zur Pathogenese von  
Influenzavirusinfektionen bei  
Säugetern und Vögeln**

**Angele Breithaupt**

**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen und  
dem Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit,  
Greifswald – Insel Riems

Betreuer: Prof. Dr. Jens Peter Teifke

**Vergleichende morphologische und funktionelle  
Untersuchungen zur Pathogenese  
von Influenzavirusinfektionen bei Säugern und Vögeln**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von  
**Angele Breithaupt**  
Tierärztin aus Aachen

Gießen 2011

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Jens Peter Teifke  
Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel

Tag der Disputation: 18.4.2011

Meinen Eltern

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten

Angele Breithaupt

**Teile dieser Arbeit wurden publiziert:**

Breithaupt A, Kalthoff D, Dale J, Bairlein F, Beer M und Teifke JP (2010). Neurotropism in blackcaps (*Sylvia atricapilla*) and red-billed queleas (*Quelea quelea*) after HPAIV H5N1 infection. Vet. Pathol. DOI:10.1177/0300985810386467.

Kalthoff D, Breithaupt A, Helm B, Teifke JP, Beer M (2009). Migratory status is not related to the susceptibility to HPAIV H5N1 in an insectivorous passerine species. PLoS. One. 4:e6170.

Kalthoff D, Breithaupt A, Teifke JP, Globig A, Harder T, Mettenleiter TC, Beer M (2008). Highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) in experimentally infected adult mute swans. Emerg. Infect. Dis. 14:1267-1270.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Aviäre Influenzaviren.....</b>	<b>2</b>
2.1.1	Klassifikation .....	2
2.1.2	Epidemiologie .....	2
2.1.3	Morphologie und Molekularbiologie von Influenza-A-Viren .....	3
2.1.4	Rezeptorspezifität der Influenzaviren und ihre Replikation .....	4
<b>2.2</b>	<b>Immunreaktionen bei aviären Influenzavirusinfektionen .....</b>	<b>6</b>
2.2.1	Angeborene und erworbene Immunantwort .....	6
2.2.2	Immunantwort nach AIV-Infektionen beim Geflügel .....	7
2.2.3	Toll-like-Rezeptor Signalweg .....	8
2.2.4	Zytokine beim Geflügel .....	11
<b>2.3</b>	<b>Genexpressionsanalyse mittels GeneChip® -Technologie .....</b>	<b>13</b>
<b>2.4</b>	<b>Pathogenese von HPAIV-Infektionen bei Säugern und Vögeln .....</b>	<b>17</b>
2.4.1	Pathophysiologie der Blutgerinnung nach HPAIV-Infektionen.....	17
2.4.2	Mäuse .....	17
2.4.3	Katzen .....	18
2.4.4	Hühner.....	19
2.4.5	Entenvogel .....	20
2.4.6	Sperlingsvogel.....	22
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>23</b>
3.1.1	Versuchstiere.....	23
3.1.2	Probenumfang .....	23
3.1.3	Virusisolate .....	24
3.1.4	Zelllinien .....	24
3.1.5	Antikörper und Antiseren.....	24
3.1.6	Medien und Lösungen für die Zellkultur.....	25
3.1.7	Medien und Lösungen für die Microarray-Analyse .....	27
3.1.8	Lösungen für die histopathologische Untersuchung .....	30
3.1.9	Sonstige Medien, Puffer und Lösungen .....	31

## Inhaltsverzeichnis

3.1.10	Reagenzien, Chemikalien, Arzneimittel und Kits .....	32
3.1.11	Verbrauchsmaterial .....	33
3.1.12	Geräte .....	34
3.1.13	Software .....	34
<b>3.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>35</b>
3.2.1	Methoden der funktionellen Untersuchung zur Pathogenese von HPAIV-Infektionen.....	35
3.2.1.1	Zellkulturen und Virusanzucht .....	35
3.2.1.2	Kultivierung von DF-1-Zellen.....	35
3.2.1.3	Kultivierung von MDCK-2-Zellen.....	35
3.2.1.4	Virusvermehrung und –reinigung.....	35
3.2.1.5	Mittlere kulturinfektiöse Dosis (KID <sub>50</sub> ).....	36
3.2.1.6	Plaquetest .....	36
3.2.1.7	Wachstumskinetik .....	37
3.2.1.8	RNA-Expressions-Analyse auf „GeneChip® Chicken Genome Array“ .....	37
3.2.1.9	Validierung der RNA-Expressionsanalyse mittels real-time RT-PCR.....	44
3.2.2	Methoden der morphologischen Untersuchung zur Pathogenese von HPAIV-Infektionen .....	48
3.2.2.1	Tierversuche .....	48
3.2.2.2	Experimentelle Infektion von Peking-, Moschus- und Stockenten.....	50
3.2.2.3	Organentnahme, Gewebefixierung und Einbettung.....	53
3.2.2.4	Hämalaun-Eosin-Färbung.....	53
3.2.2.5	Immunhistologische Untersuchungen .....	53
3.2.2.6	Vorgehensweise bei der Auswertung .....	54
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>57</b>
<b>4.1</b>	<b>Funktionelle Untersuchungen zur Pathogenese von HPAIV-Infektionen.....</b>	<b>57</b>
4.1.1	Vermehrung von R65/06 auf DF-1 und MDCK-2-Zellen .....	57
4.1.2	Ergebnisse der Genexpressionsanalyse mittels Microarray-Technologie .....	59
4.1.2.1	Bestimmung der RNA-Qualität und -Quantität.....	59
4.1.2.2	Qualitätskontrolle der Microarrays.....	59
4.1.2.3	Differentiell exprimierte Gene R65/06-infizierter DF-1-Zellen.....	61
4.1.2.4	GO-Analyse.....	64
4.1.2.5	Differentiell exprimierte Gene in R65/06-infizierten DF-1-Zellen, 2 h p. i. ....	66
4.1.2.6	Differentiell exprimierte Gene in R65/06-infizierten DF-1-Zellen, 4 h, 6 h und 7,5 h p. i. ....	67
4.1.2.7	Signalweganalyse: Toll-like-Rezeptor Signalweg.....	67
4.1.2.8	Signalweganalyse: Hämostase.....	72
4.1.2.9	Regulierte Endothelzellmarker .....	74
4.1.2.10	Regulierte Gene der SOCS-Familie .....	74
4.1.2.11	Validierung der Microarray-Ergebnisse mittels real-time RT-PCR .....	75

<b>4.2</b>	<b>Morphologische Untersuchungen zur Pathogenese von HPAIV-Infektionen.....</b>	<b>78</b>
4.2.1	Pathomorphologische Befunde nach HPAIV-Infektion von Säugern .....	78
4.2.1.1	Mäuse .....	78
4.2.1.2	Katzen .....	80
4.2.2	Pathomorphologische Befunde nach HPAIV-Infektion von Vögeln .....	83
4.2.2.1	Hühner.....	83
4.2.2.2	Entenvogel .....	93
4.2.2.3	Sperlingsvogel.....	111
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>120</b>
5.1	Morphologische Untersuchungen zur Pathogenese von HPAIV-Infektionen.....	120
5.2	Funktionelle Untersuchungen zur Pathogenese von HPAIV-Infektionen.....	129
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>146</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>148</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>150</b>
<b>9</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>163</b>
9.1	Abkürzungsverzeichnis .....	163
9.2	Abbildungen .....	168
<b>10</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>170</b>



# 1 Einleitung

Das natürliche Reservoir für Typ-A-Influenzaviren ist die Wildvogelpopulation, insbesondere das Wassergeflügel. Die hochpathogenen Varianten der aviären Influenzaviren (HPAIV) verursachen die klassische Geflügelpest, die zu schweren Verlusten in der Geflügelindustrie durch hohe Mortalität, Einbrüche in der Legeleistung und in der täglichen Gewichtszunahme führt. Bei dem seit 1996 in Asien zirkulierenden HPAIV des Subtyps H5N1 wird von direkten Virusübertragungen vom Geflügel auf den Menschen berichtet (Pollack et al., 1998). Im Menschen soll die HPAIV-Infektion auch zu einer Überreaktion der Immunantwort führen, die in einer massiven Zytokinausschüttung resultiert (Cheung et al., 2002). Die Faktoren der frühen Immunantwort beim Geflügel, die im Verlauf einer HPAIV-Infektion eine Rolle spielen, sind bis heute weitgehend unbekannt (Reemers et al., 2009). Im Gegensatz hierzu existiert eine Vielzahl von Publikationen über die Pathomorphologie und den viralen Gewebetropismus von HPAIV bei zahlreichen Säugetier- und Vogelarten.

Hierauf basierend soll zunächst eine tierartübergreifende Charakterisierung des HPAIV-Isolates Influenza A/swan/Germany/R65/2006 (H5N1) mittels histopathologischer und immunhistologischer Methoden erfolgen. Die morphologischen Veränderungen und der Gewebetropismus dieses Virus und anderer Virusisolate wird bei Mäusen, Katzen, Hühnern, Schwänen, Enten und Sperlingen untersucht und mit den Literaturdaten verglichen.

Das Hauptziel dieser Arbeit ist es jedoch, die Auswirkungen einer HPAIV-Infektion auf hochempfindliche Hühnerembryofibroblasten darzustellen. Hierfür soll eine Genexpressionsanalyse unter besonderer Berücksichtigung der frühen Immunreaktion und der Blutgerinnungskaskade mittels Microarray-Technologie durchgeführt werden.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Aviäre Influenzaviren

#### 2.1.1 Klassifikation

Influenzaviren gehören zur Familie der *Orthomyxoviridae*. Antigenetisch lassen sich Influenza A, B und C Viren, das Isavirus und das Thogotovirus voneinander unterscheiden, wobei bisher nur Typ-A-Influenzaviren Infektionen bei Vögeln verursachen. Influenza B und C Viren sind humanpathogen und lösen nur selten bei anderen Spezies Erkrankungen aus (Palese und Shaw, 2007). Ein bekannter Vertreter des Genus *Isavirus* ist das Virus der „Ansteckenden Blutarmut der Lachse“. Das Genus *Thogotovirus* beinhaltet Arboviren, die bei Menschen und zahlreichen Tierspezies vorkommen (Kuno et al., 2001; Kibenge et al., 2004).

#### 2.1.2 Epidemiologie

Aviäre Influenzaviren verursachen asymptomatische oder nur mit milden klinischen Anzeichen einhergehende, darmassoziierte oder respiratorische Infektionen bei seinen Reservoirwirten, den Wildvögeln (Webster et al., 1992). Einige Subtypen sind in der Lage, die Wirtsbarriere zu überwinden und weitere Spezies zu infizieren. Diese Viren sind beispielsweise die Ursache für pandemische Influenzavirusinfektionen bei Menschen (Webster et al., 1992). Die Subtypen H5 und H7 sind von besonderer Bedeutung, da sie das Potential besitzen, durch Mutation hochvirulent zu werden und damit zu systemischen Infektionen in Vögeln führen können (Swayne und Suarez, 2000). Der allgemein üblichen Terminologie folgend werden hochvirulente Influenzaviren im Folgenden als hochpathogene Influenzaviren bezeichnet.

Bei dem seit 1996 in Asien zirkulierenden Influenza-A-Virus des Subtyps H5N1 handelt es sich vermutlich um ein Isolat, das ursprünglich von einem nordjapanischen niedrigpathogenen AIV (LPAIV) abstammt (Okazaki et al., 2000; Duan et al., 2007). Nach einer Reassortierung des Vorläufervirus A/goose/Guangdong/1/96-like-virus (H5N1) mit A/teal/Hong Kong/W312/97 (H6N1) und A/quail/Hong Kong/G1/97

(H9N2) virus (Guan et al., 2002) traten die ersten letalen Infektionen beim Menschen auf und es wurde die direkte Übertragung von Mensch zu Mensch nachgewiesen (Peiris et al., 2007).

Einzigartig bei diesem Seuchengeschehen ist, dass es zu letalen Infektionen bei Wasservögeln kam. Der erste Ausbruch von H5N1 im eigentlichen Reservoirwirt wurde im Jahr 2002 im Kowloon und Penfold Park in Hong Kong verzeichnet (Ellis et al., 2004). Zu einem Massensterben kam es schließlich am Qinghai Lake in China im Jahr 2005 mit mehr als 6000 verendeten Wasservögeln, vorwiegend Streifengänsen (*Anser indicus*) (Liu et al., 2005; Chen et al., 2005; Chen et al., 2006a). Unter den dort zirkulierenden H5N1-Viren gelang einem Teil die weitere Ausbreitung nach Indien, Europa und Afrika. Um die Nomenklatur der Influenzaviren im Rahmen dieser Pandemie zu vereinheitlichen, hat die World Health Organisation (WHO) ein System entwickelt, das auf der Grundlage phylogenetischer Untersuchungen eine Einteilung in sogenannte „clades“ (0-9) und „subclades“ vorsieht. Alle bisher in Europa, Afrika und im mittleren Osten gefundenen Isolate gehören demnach dem „subclade“ 2.2. an (WHO, nomenclature, Stand: 2009).

In der Vergangenheit gab es nur einen Bericht über HPAIV-Infektionen in der Wildvogelpopulation. Ein H5N3 HPAIV löste 1963 in Afrika letale Infektionen bei Seeschwalben aus. Das Virus persistierte jedoch nicht weiter in der Population (Becker, 1966).

### **2.1.3 Morphologie und Molekularbiologie von Influenza-A-Viren**

Influenzaviren können sowohl sphärisch, mit einem Durchmesser von 80 bis 120 nm, als auch filamentös, mit einer Länge von mehreren Mikrometern, sein. Die filamentöse Form scheint in klinischen Isolaten häufiger vorzukommen, während die sphärische Form in Zell- bzw. Hühnereipassagen dominiert. Man geht davon aus, dass eine Alteration der Aminosäuresequenz des Matrixproteins (M1) für diese Variabilität verantwortlich ist (Bourmakina und Garcia-Sastre, 2003).

Das Genom von Influenza-A-Viren besteht aus einer segmentierten RNA negativer Orientierung, die für acht Struktur- und zwei Nichtstrukturproteine kodiert. Zu den Oberflächenstrukturproteinen zählen das Hämagglutinin (HA), die Neuraminidase (NA) und das Matrixprotein 2 (M2, Ionen-Kanal-Protein). Zu den internen Strukturproteinen gehören das Nukleoprotein (NP), das Matrixprotein 1 (M1) und der RNA-abhängige

Polymerasekomplex. Dieser Komplex besteht aus den basischen Polymeraseproteinen 1 und 2 (PB1, PB2) und dem sauren Polymeraseprotein (PA). Kürzlich wurde ein neues Protein entdeckt, das von einem alternativen offenen Leserahmen des PB1 Gens kodiert ist. Es soll für eine Virulenzsteigerung im Mausmodell verantwortlich sein. Das Protein führt zu einer Degeneration und Nekrose von Alveolarmakrophagen, die für die Induktion einer Immunantwort des Wirtes von großer Bedeutung sind (Zamarin et al., 2006). Darüber hinaus existieren Nichtstrukturproteine (NS1, NS2), die definitionsgemäß nicht im Viruspartikel nachweisbar sind (O'Neill et al., 1998).

Das HA ist der wichtigste Virulenzfaktor. Allerdings kann ohne die Expression weiterer virulenzassoziierter Gene, wie die der Proteine NA, NS, PA, PB1, PB2 und NP, das Virus nicht seine volle pathogenetische Wirkung entfalten (Hulse et al., 2004; Li et al., 2006; Caughen et al., 2007; Hulse-Post et al., 2007; Wasilenko et al., 2008)

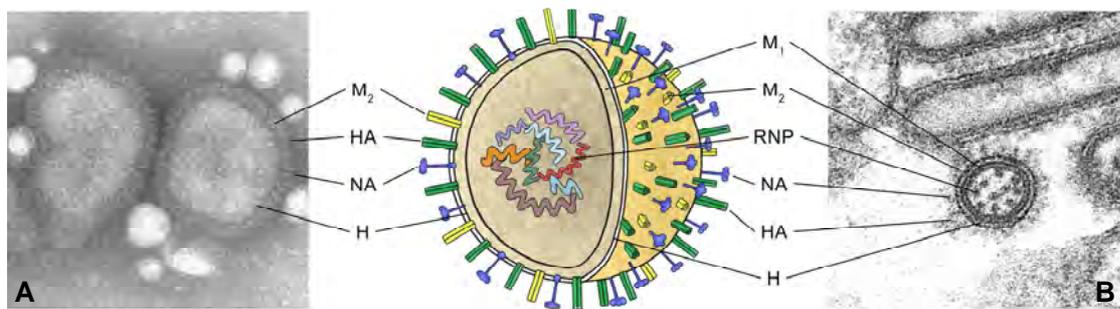


Abb. 1: **Ultrastruktureller und schematischer Aufbau von Influenzaviren.**

**A:** Negativkontrast; **B:** Ultradünnschnitt.

Elektronenmikroskopie: Dr. H Granzow, Grafik: M. Jörn, FLI Insel Riems.

HA – Hämagglutinin, NA – Neuraminidase, RNP – Ribonukleoprotein,

H – Virushülle, M<sub>1</sub> – Matrixprotein, M<sub>2</sub> – integrales Membranprotein.

#### 2.1.4 Rezeptorspezifität der Influenzaviren und ihre Replikation

Der Infektionszyklus beginnt mit der **Anheftung** des HA-Proteins an eine Sialinsäure des Rezeptorglykoproteins der Wirtszellen. Abhängig von der Verknüpfung der Säure an das Glykoprotein unterscheidet man u. a.  $\alpha$ -2,3- und  $\alpha$ -2,6-verknüpfte Sialinsäuren, die in unterschiedliche Rezeptorkonformationen resultiert. Das virale HA besitzt eine hohe Bindungsspezifität für diese beiden Konformationen. Aus diesem Grund kann die Rezeptorausstattung verschiedener Gewebe Einfluss auf den Wirts- und Gewebetropismus von Influenzaviren nehmen. Generell exprimieren Vögel vorwiegend die  $\alpha$ -2,3-Rezeptortypen, während bei Menschen die  $\alpha$ -2,6-Konformation dominiert. Es

existieren jedoch auch Spezies, wie die Wachtel, die beide Rezeptortypen aufweisen (Wan und Perez, 2006; Matrosovich et al., 2009).

Die Pathogenese der Influenza kann unter Umständen direkt mit der Rezeptorausstattung in Zusammenhang stehen. Infektionen durch H5N1-HPAIV können beim Menschen zu Pneumonien ohne Beteiligung der oberen Luftwege führen. In diesem Fall ist die Infektion offenbar mit der Verteilung der  $\alpha$ -2,3-Rezeptortypen assoziiert, die sich hauptsächlich auf Typ-2-Pneumozyten befinden (Shinya et al., 2006). Allerdings belegen Studien, dass die HA-Rezeptorspezifität nicht allein entscheidend ist. Wenn die verabreichte Dosis hoch genug ist, repliziert das Virus auch bei nicht optimaler Rezeptorausstattung (Hinshaw et al., 1981; Beare und Webster, 1991).

Im Anschluss an die Anheftung erfolgt die **rezeptorvermittelte Endozytose**. Das M2-Protein spielt eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung dieses Prozesses (Pinto und Lamb, 2007). Die Fusion des viralen Hüllproteins mit der Wirtszellendosomenmembran erfordert die proteolytische Spaltung des HA. Bei niedrigpathogenen aviären Influenzaviren (LPAIV) sind trypsinähnliche Proteasen für die Spaltung des sogenannten HA0 in das funktionale HA1 und HA2 erforderlich. Diese werden nur in Epithelzellen synthetisiert. Daher ist der Replikationsort von LPAIV in der Regel auf den Respirations- bzw. Gastrointestinaltrakt beschränkt. Die Spaltung des HA0 von hochpathogenen aviären Influenzaviren (HPAIV) ist durch Furin, eine ubiquitär exprimierte Protease möglich, was eine disseminierte Replikation auch in Nervengewebe ermöglicht (Stieneke-Grober et al., 1992).

Der Fusion mit der Endosomenmembran folgt die Freisetzung des viralen RNA Polymerasekomplexes (PB1, PB2 und PA) in das Zytoplasma (Steinhauer, 1999). Dem NP-vermittelten **Transport** des Komplexes zum Zellkern folgt das **Kopieren** der viralen RNA (vRNA) in eine komplementäre RNA (cRNA) und eine messenger RNA (mRNA) positiver Orientierung durch Polymerasekomplex, NP und Wirtszell-RNA-Polymerase II (O'Neill et al., 1995). Die mRNA wird in das Zytoplasma transportiert und vermittelt die virale **Proteintranslation** unter Verwendung von Ressourcen der Wirtszelle. Die viralen Proteine M1 und NS2 sind am Transport der viralen Proteine beteiligt (O'Neill et al., 1998). Die cRNA dient als Vorlage zur Generierung der **vRNA** negativer Orientierung. M1 vermittelt den Aufbau der Virionen aus der neu gebildeten vRNA und den viralen Proteinen (Bourmakina und Garcia Sastre, 2003). Die effiziente

**Freisetzung der Virionen** ist wesentlich durch die enzymatische Aktivität der Neuraminidase bestimmt. Sie löst die Bindung der gebildeten Virionen von der Zelloberfläche durch die Abspaltung der Sialinsäuren, die das HA wie zu Beginn der Infektion binden (Matrosovich et al., 2004).

## 2.2 Immunreaktionen bei aviären Influenzavirusinfektionen

### 2.2.1 Angeborene und erworbene Immunantwort

Die **angeborene** Immunantwort vermittelt die erste Reaktion auf eine Infektion und bestimmt die nachfolgende, erworbene Immunantwort. Neben physikalischen (z. B. Ziliarbewegung im oberen Respirationstrakt) und chemischen Barrieren (z. B. Lysozym) gibt es auch beim Geflügel die aktiven, humoralen Elemente der angeborenen Immunantwort, wie das Komplement-System, die Akut-Phase-Proteine, das C-reaktive Protein oder Fibrinogen (Davison et al., 2008).

Die zelluläre Komponente der angeborenen Immunantwort umfasst insbesondere Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Diese Zellen können Erreger anhand gemeinsamer konservierter Strukturen, den pathogen-assoziierten molekularen Mustern („pathogen-associated molecular patterns“ **PAMP**), erkennen. Die Mustererkennungsrezeptoren werden als „pattern recognition receptor“ (**PRR**) bezeichnet. Bei diesen Rezeptoren unterscheidet man lösliche (z. B. LPS-binding-protein) und zellassoziierte Formen (z. B. Toll-like-Rezeptoren). Es erfolgt keine flexible Anpassung an die verschiedenartigen Pathogene, was eine schnelle Reaktion des Immunsystems ermöglicht (Akira et al., 2001).

Die **erworbene** Immunantwort vermittelt die spätere Reaktion des Immunsystems. Sie kann sich an den Erreger anpassen und zeichnet sich durch die Fähigkeit zum spezifischen Langzeitgedächtnis aus. Man unterscheidet zwischen der humoralen und der zellvermittelten Immunantwort. Die humorale Immunantwort wird über die von B-Lymphozyten (gemeint sind Plasmazellen) produzierten Antikörper erreicht, während die zellvermittelte Immunantwort die Aufgabe von T-Lymphozyten ist. Zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem bestehen Wechselwirkungen. So haben die Zellen der angeborenen Immunantwort die Fähigkeit, die erworbene Immunantwort zu verstärken (Medzhitov und Janeway, 1997).

Auf der zellulären Ebene der angeborenen Immunantwort gibt es zum Teil große Unterschiede zwischen Vögeln und Säugern. So besitzen Vögel beispielsweise anstelle von neutrophilen Granulozyten sogenannte heterophile Granulozyten. Heterophile Granulozyten können Pathogene phagozytieren, besitzen aber keine Myeloperoxidase und sind damit nicht zum sogenannten „oxidative burst“ fähig (Davison et al., 2008).

### **2.2.2 Immunantwort nach AIV-Infektionen beim Geflügel**

Es liegen wenige Publikationen über Untersuchungen zur Immunreaktion nach einer HPAIV-Infektion beim Geflügel vor. Microarray-basierte Studien an mononukleären Zellen aus Hühnerblut mit einem LPAIV-Isolat (H7N2) wiesen eine verminderte Expression von IFN-Rezeptoren und TLR vier Stunden nach der Infektion nach (Keeler et al., 2007).

Die Infektion von Hühnermakrophagen mit LPAIV (H9N2, H6N2) unter Verwendung des „GeneChip® Chicken Genome Array“ von Affymetrix zeigte, dass zahlreiche proinflammatorische Zytokine nach 6, 12 und 18 h verstärkt exprimiert wurden. Darunter fanden sich IL1- $\beta$ , IL-8, IL-18, CCL3 und CCL20. Die IFN-Antwort fiel nur sehr gering aus (Xing et al., 2008).

Reemers et al. (2009) beschreiben eine Microarray-basierte Untersuchung zur Immunreaktion nach einer H9N2-Infektion. Die Genexpression von Trachealgewebe in vivo infizierter Hühner oder von in vitro infizierten Trachea-Organokulturen wurde mit unbehandelten Geweben verglichen. Verstärkt exprimierte Gene 24 h p. i. in beiden Modellen waren hauptsächlich IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$ .

Die Infektion von Hühnern mit einem H5N1 HPAIV zeigte nach PCR-basierender Subtraktionstechnik in Nierenzellen nach 30 bis 42 h p. i. eine verstärkte Expression IFN-stimulierter Gene, nicht jedoch von IFN selbst (Zhang et al., 2008).

Li et al. (2006) konnten an primären Hühnerembryofibroblastenzellen („chicken embryo fibroblasts“, CEF) zeigen, dass das NS1-Protein von H5N1 HPAIV die IFN- $\alpha$  und - $\beta$  Aktivität in der Wirtszelle hemmen kann und damit als Virulenzfaktor gilt.

Die Genexpression in CEF und Trachea-Organokulturen wurde nach Infektion mit zwei HPAIV-Isolaten mittels Microarray-Technologie untersucht (Sarmiento et al., 2008b; Sarmiento et al., 2008a). Der Vergleich der Genexpression wurde zwischen den beiden infizierten Zellkulturen durchgeführt. Die RT-PCR-basierende Untersuchung erfolgte im Vergleich jeweils zu nicht infizierten Zellen. Letztere zeigte eine verminderte Mx1

und IL-8 Expression in einem der Isolate. Das zweite Isolat löste eine geringgradig erhöhte Mx1 und IFN- $\alpha$  Expression aus. Die Autoren unterstreichen, dass zahlreiche regulierte Gene aufgrund fehlender Annotationen nicht interpretiert werden konnten. Die Annotation erfolgte an humanen und mausbasierten Datenbanken.

Suzuki et al. (2009) untersuchten die Immunreaktion von Hühnern unter anderem nach der Infektion mit zwei HPAIV mittels real-time RT-PCR. Eines der Isolate wurde als weniger virulent eingestuft aufgrund einer verlängerten mittleren Überlebenszeit der Hühner. Die HPAIV-Infektion mit dem höher virulenten Isolat führte nach zwölf Stunden p. i. zu einer verstärkten Expression von IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  und proinflammatorischen Zytokinen (IL-6, IL-8, IL-15). Kurz vor dem Tod (32 h p. i.) kam es zu einem starken Abfall der Expression dieser Gene. IL-4 und IFN- $\gamma$  wurden bereits 24 Stunden p. i. vermindert exprimiert. Im Gegensatz hierzu war der Abfall der Expression nach der Infektion mit dem weniger virulenten HPAIV nicht zu verzeichnen. Die Autoren schließen aus dieser Studie, dass eine Virulenzsteigerung von AIV im Huhn mit einer effektiveren Replikation der Viren vor allem in Makrophagen und Endothelzellen und dem Zusammenbruch der angeborenen Immunantwort einhergeht (Suzuki et al., 2009).

### **2.2.3 Toll-like-Rezeptor Signalweg**

Der Begriff „Toll-like“ ist auf die Ähnlichkeit des Rezeptorproteins mit einem Protein zurückzuführen, das im Zusammenhang mit der Embryonalentwicklung von *Drosophila melanogaster* entdeckt wurde (Lemaitre et al., 1996). Toll-like-Rezeptoren (TLR) gehören zu den zellassozierten PRR, die PAMPs auf der Zelloberfläche und auf membrangebundenen Vesikeln erkennen. Diese Rezeptoren sind nicht nur auf Immunzellen, sondern auch auf Epithelzellen und Fibroblasten zu finden (Saini et al., 2007). PRR, die PAMPs im Zytoplasma nachweisen, sind zum Beispiel das „nucleotide-binding-protein“, das „retinoic acid-inducible gene I-protein“ und das „melanoma differentiation-associated gene 5“ (Davison et al., 2008). Die frühe Erkennung von Viruspartikeln und die folgende Induktion einer Immunantwort sind die kritischen Phasen der angeborenen Immunantwort (Baum und Garcia-Sastre, 2009).

Die TLR können phylogenetisch in fünf Gruppen eingeteilt werden, und die meisten Spezies weisen in ihrem Genom zumindest einen Vertreter jeder Gruppe auf. Hierzu zählen die TLR1/2-Gruppe (mit TLR1, 2, 6, 10), die TLR3-Gruppe, die TLR4-Gruppe,

die TLR5-Gruppe und die TLR7-Gruppe (mit TLR7, 8, 9). Das bis heute bekannte TLR-Repertoire im **Geflügel** beinhaltet **TLR2, 3, 4, 5, 7** und ein TLR-Molekül mit bisher unsicherer Zuordnung zu **TLR1, 6 oder 10** sowie zwei TLR, die bisher nicht in Säugern beschrieben wurden (**chTLR15** und **21**). Es liegen bis heute nur wenige Untersuchungen zur biologischen Funktionsweise der aviären TLR vor.

Als Typ-I-Membranglykoproteine besitzen TLR neben einer extrazellulären eine zytoplasmatische Signaldomäne, die homolog zur IL-1-Rezeptordomäne (IL-1R) ist und daher auch Toll/IL-1-Rezeptordomäne (**TIR**) genannt wird (Akira et al., 2006). Zu Beginn wird ein Adapterprotein angelockt, das eine TIR Domäne trägt. Mögliche Adapterproteine sind „myeloid differentiation primary response gene 88“ (**MyD88**), TIR-assoziiertes Protein (**TIRAP**), „TIR domain containing adapter protein-inducing IFN- $\beta$ “ (**TRIF**) und „TRIF related adapter molecule“ (**TRAM**). Unterschiede in der Immunantwort können durch die Beteiligung verschiedener Adaptermoleküle erklärt werden. So vermitteln TRIF und MyD88 die Aktivierung des Signalweges, der zu einer Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Typ-I-Interferonen führt (Akira et al., 2006).

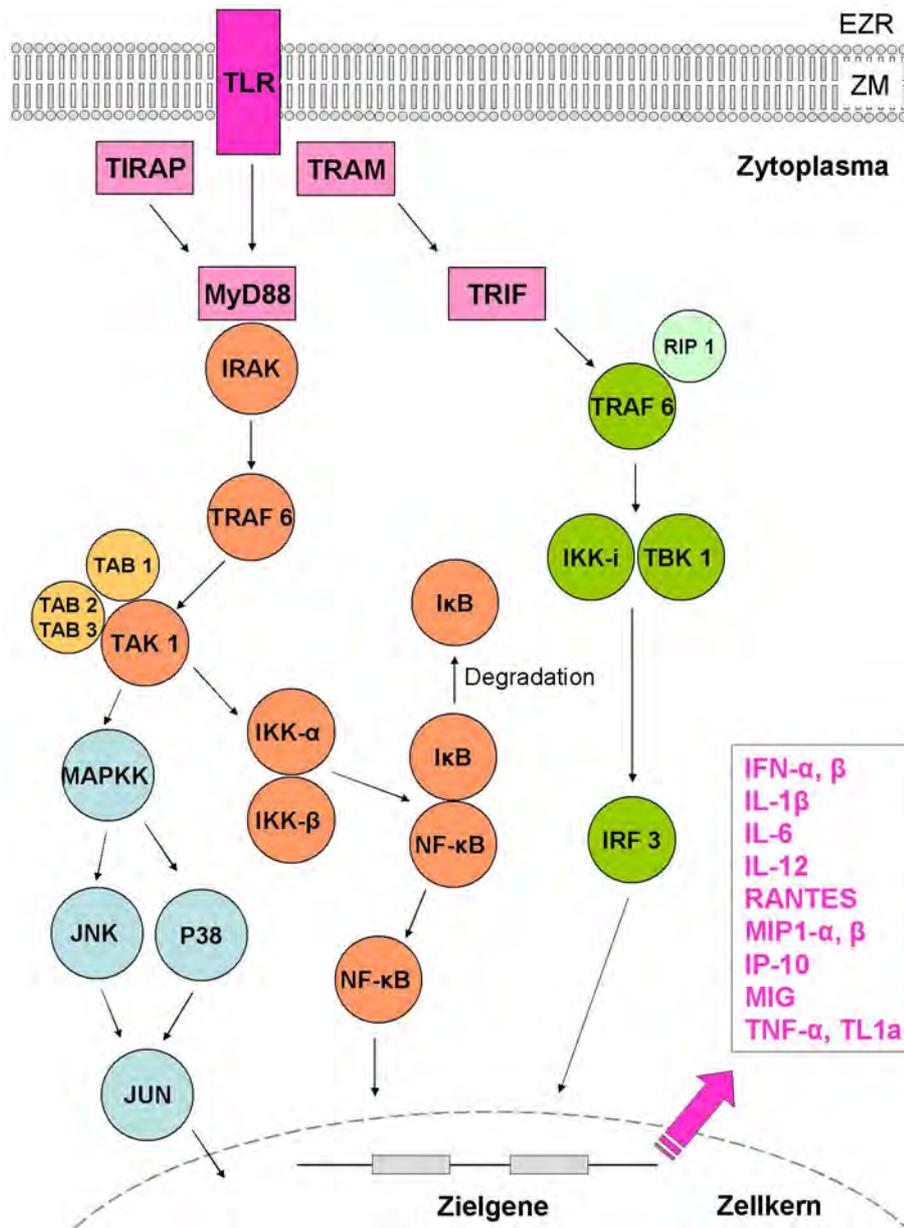


Abb. 2: **Toll-like-Rezeptor Signalweg.** Die Adaptermoleküle **MyD88**, **TIRAP**, **TRIF**, **TRAM** vermitteln die Induktion von Typ-1-Interferon, proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen. Der MyD88-abhängige (orange) Signalweg mit den Liganden **TRAF 6**, **TAK 1**, **TAB 1**, **2** und **3**, **IKK-α** und **-β** sowie **IκB** endet mit der Aktivierung von **NF-κB**. Der TRIF abhängige (grüne) Signalweg aktiviert **IRF 3** mit den Liganden **TRAF 6**, **RIP 1**, **IKK-i**, **TBK 1**. Die Aktivierung von **JUN** erfolgt im MAP-Kinase Signalweg durch **MAPKK**, **JNK** und **p38** (modifiziert nach Akira et al., 2006). **EZR**: Extrazellulärer Raum, **ZM**: Zellmembran.

Nach Aktivierung des TLR (Abb. 2) erfolgt die Bindung von MyD88 entweder direkt am Rezeptor oder wird durch TIRAP vermittelt. Der Assoziation von MyD88 folgt die Aktivierung von IL1-R-assoziiierter Kinase 1 und 4 (**IRAK**) (Akira et al., 2006). IRAK

bindet den TNF-Rezeptor-assoziierten Faktor 6 (**TRAF 6**) (Li et al., 2002). Ein Komplex bestehend aus TGF- $\beta$ -aktivierter Kinase 1 (**TAK1**) und den TAK-bindenden Proteinen (**TAB 1, 2, 3**) wird an TRAF 6 gebunden (Wang et al., 2001). Nun phosphoryliert TAK1 die „Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells kinase  $\beta$ “ (**IKK- $\beta$** ) und aktiviert gleichzeitig MAP-Kinase-Kinasen (**MKK 6, 3, 4**). IKK- $\beta$  phosphoryliert den „nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor“ (**I $\kappa$ B**). Dadurch wird die Degradation von I $\kappa$ B ermöglicht und der „nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1“ (**NF- $\kappa$  B**) aktiviert. NF- $\kappa$  B transloziert in den Zellkern und induziert die Transkription der Gene proinflammatorischer Zytokine und Typ-1-Interferone. Der durch TAK1 ausgelöste **MAPK-Signalweg** resultiert in der Aktivierung von „Jun oncogene“ (**JUN**). JUN gilt als wesentlicher Faktor zur Induktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (Akira et al., 2006).

Ein MyD88-unabhängiger Weg erfolgt nach Aktivierung von TLR4. Hier dient TRAM als Adaptermolekül für TRIF (Yamamoto et al., 2003). TRIF aktiviert „receptor binding protein 1“ (**RIP 1**). Da RIP 1 wiederum mit TRAF 6 interagiert, kann wie bereits erläutert NF- $\kappa$  B aktiviert werden (Meylan et al., 2004). TRIF ist ferner in der Lage die Kinasen „TRAF family-member-associated NF- $\kappa$  B activator binding kinase 1“ (**TBK 1**) und „inducible I $\kappa$ B kinase“ (**IKK-i**) zu aktivieren. TBK 1 und IKK-i phosphorylieren den interferonregulierenden Faktor 3 (**IRF 3**), welcher nun als Transkriptionsfaktor für Gene der Typ-I-Interferonantwort agieren kann (Fitzgerald et al., 2003).

#### 2.2.4 Zytokine beim Geflügel

Als **Zytokine** bezeichnet man regulatorische Peptide, die typischerweise ein Molekulargewicht von weniger als 30 kDa besitzen, die eine Immunantwort hervorrufen und diese regulieren. Hierzu zählen neben den Interleukinen (**IL**) die Interferone (**IFN**), der transformierende Wachstumsfaktor- $\beta$  (**TGF- $\beta$** ), die Tumor-Nekrose-Faktor-Superfamilie (**TNFSF**), die „colony stimulating factors“ (**CSF**) und die Chemokine. Generell ist davon auszugehen, dass aviäre Zytokine in ihrer Aminosäuresequenz zu ca. 25-35 % mit ihren orthologen (funktionelle Verwandtschaft) Säugerzytokinen übereinstimmen (Kaiser et al., 2005). Die Verfügbarkeit der Hühnergesamtgenom-

sequenz ermöglicht die Untersuchung hinsichtlich des Repertoires und der Funktion der aviären Zytokine. Zahlreiche, aber nicht alle Gene, die für Peptide der Säuger kodieren, haben ihre Entsprechung im Hühnergenom (Kaiser et al., 2005).

In der Gruppe der **Interleukine** sind bisher zahlreiche Entsprechungen im Hühnergenom nachgewiesen worden und ihre biologischen Funktionen sind größtenteils charakterisiert. Hierzu zählen die Interleukine folgender funktioneller Gruppen (Kaiser et al., 2005; Davison et al., 2008):

- IL-Familie: IL-1 $\beta$ , IL-18
- T-Zellproliferation: IL-2, IL-15, IL-21
- T-Helferzellen 1-Regulation: IL-12
- T-Helferzellen 2-Regulation: IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, „granulocyte colony-stimulating factor“ (GM-CSF)
- IL-10 Familie: IL-10, IL-19, IL-22, IL-26
- IL-7 Familie: IL-17A, IL-17b, IL-17D, IL-17F
- Weitere: IL-6, IL-7, IL-9, IL-16

Keine Entsprechungen der Säuger-Gene finden sich u. a. für: IL-1 $\alpha$ , IL-23 und IL-27.

Wenngleich die phänotypische, zytokinabhängige Differenzierung der T-Helferzellen (Th) in Th1- oder Th2-Zellen beim Geflügel noch nicht nachgewiesen werden konnte, gehen Davison et al. (2008) davon aus, dass dieses „Dogma der Differenzierung von T-Helferzellen“ vom Säuger auf die Vögel übertragbar ist.

Die antivirale Aktivität der **Typ-1-Interferone** IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  wurde im Huhn bereits belegt (Sekellick et al., 1994). Die Infektion mit intrazellulären Erregern wird wie im Säuger durch eine Expression von IFN- $\gamma$  beantwortet (Digby und Lowenthal, 1995). Die Funktion von IFN- $\lambda$  bleibt bisher ungeklärt (Davison et al., 2008).

In der Familie der **TGF- $\beta$ -Zytokine** kommen beim Huhn, wie auch beim Säuger, TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3 vor. Dem TGF- $\beta$ 1 der Säuger entspricht im Huhn der TGF- $\beta$ 4 (Jakowlew et al., 1997).

Wesentliche Unterschiede zwischen Säugern und Vögeln bestehen in der **Tumor-Nekrose-Faktor-Familie** und ihrer Rezeptoren (TNFR). Sequenzen für **TNF- $\alpha$** ,

**Lymphotoxin (LT)- $\alpha$  oder LT- $\beta$**  sind bis heute **nicht im Hühnergenom** nachgewiesen worden. Beim Säuger ist die Entwicklung von sekundären lymphatischen Organen, wie Lymphknoten, an die Expression von LT gekoppelt (Ruddle, 1999), was das Fehlen dieser Organstruktur beim Vogel erklären könnte. Takimoto et al. (2008) vermuten, dass **TNFSF15** (entspricht **TL1a**) **vergleichbare Funktionen wie TNF- $\alpha$**  im Huhn erfüllt.

Bei der Regulation der Zytokinantwort ist ein besonderes Augenmerk auf die Mechanismen zu richten, die eine überschießende Immunantwort verhindern sollen. Zu diesen Faktoren zählen im Säugetier die sogenannten „suppressor of cytokine signaling“ (**SOCS**) und die „protein inhibitor of activated STAT proteins“ (**PIAS**) (Ilangumaran et al., 2004; Shuai und Liu, 2005). Die biologischen Funktionen dieser Proteine wurden bisher im Huhn noch nicht untersucht (Davison et al., 2008).

### **2.3 Genexpressionsanalyse mittels GeneChip<sup>®</sup>-Technologie**

Microarrays haben ihren Ursprung in den „Solid Phase Assays“, den DNA oder RNA „Dot Blot Assays“ und „Enzyme Linked Immuno Sorbent Assays“ (ELISA). Diese zeichnen sich dadurch aus, dass Sonden auf einer festen Oberfläche aufgebracht sind, die an Zielmoleküle binden. Der Vorgang der Bindung beschreibt hierbei die Interaktion der Sonde mit dem korrespondierenden Zielmolekül. Genexpressionsanalysen mittels Microarrays ermöglichen eine Aussage über die relativen Unterschiede in der Genexpression zwischen zwei Proben (Dufva, 2009). Eine der ersten „Chips“ zur Erstellung von Expressionsprofilen ist der Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> (Fodor et al., 1991; Lockhart et al., 1996). Zahlreiche Publikationen belegen, dass die Ergebnisse von Expressionsanalysen zum einen zwischen Laboratorien (Shi et al., 2006) und zum anderen durch Methoden der quantitativen Genexpressionsanalyse, wie der quantitativen PCR (Canales et al., 2006), reproduzierbar sind. Am effektivsten ist die Erstellung eines Expressionsprofiles, wenn es sich um den Vergleich zweier Proben, wie „infiziert“ und „nicht infiziert“ handelt (Bammler et al., 2005). Die differentielle Genexpression sollte aus biologischen Unterschieden resultieren und möglichst wenig durch technische Faktoren beeinflusst sein. Zahlreiche technische Faktoren können die differentielle Genexpression beeinflussen: am bedeutsamsten sind das Protokoll der RNA-Isolation, die Menge eingesetzter RNA und die Integrität (vollständiger

Erhaltungszustand) der RNA (Auer et al., 2009). So können bis zu 75 % der differentiell exprimierten Gene falsch positiv beurteilt werden, wenn Proben mit unterschiedlicher RNA-Integrität miteinander verglichen werden (Auer et al., 2009).

Der Genexpressionanalyse geht zunächst die Gewinnung der gesamten RNA aus Zellen voraus. Mit Hilfe eines T7-d(T)<sub>21</sub> Primers und der Verwendung der Enzyme Reverse Transkriptase und T7-RNA-Polymerase sowie eines biotinylierten NTP-Derivates wird die Gesamt-RNA in biotinylierte „antisense-RNA“ umgeschrieben. Diese biotinmarkierten RNA-Transkripte werden fragmentiert, um die Proportionalität zwischen Markierung und Länge der Moleküle aufzulösen. Die Transkripte sind komplementär zu den auf den Microarray aufgebrachten Oligonukleotiden. Gebundene Transkripte werden durch die auf der Biotin/Streptavidin-Interaktion beruhenden Bindung von Phycoerythrin gefärbt. Der Farbstoff kann nach einer Aktivierung mit Laserlicht in einem Scanner gemessen und quantifiziert werden (Abb. 3).

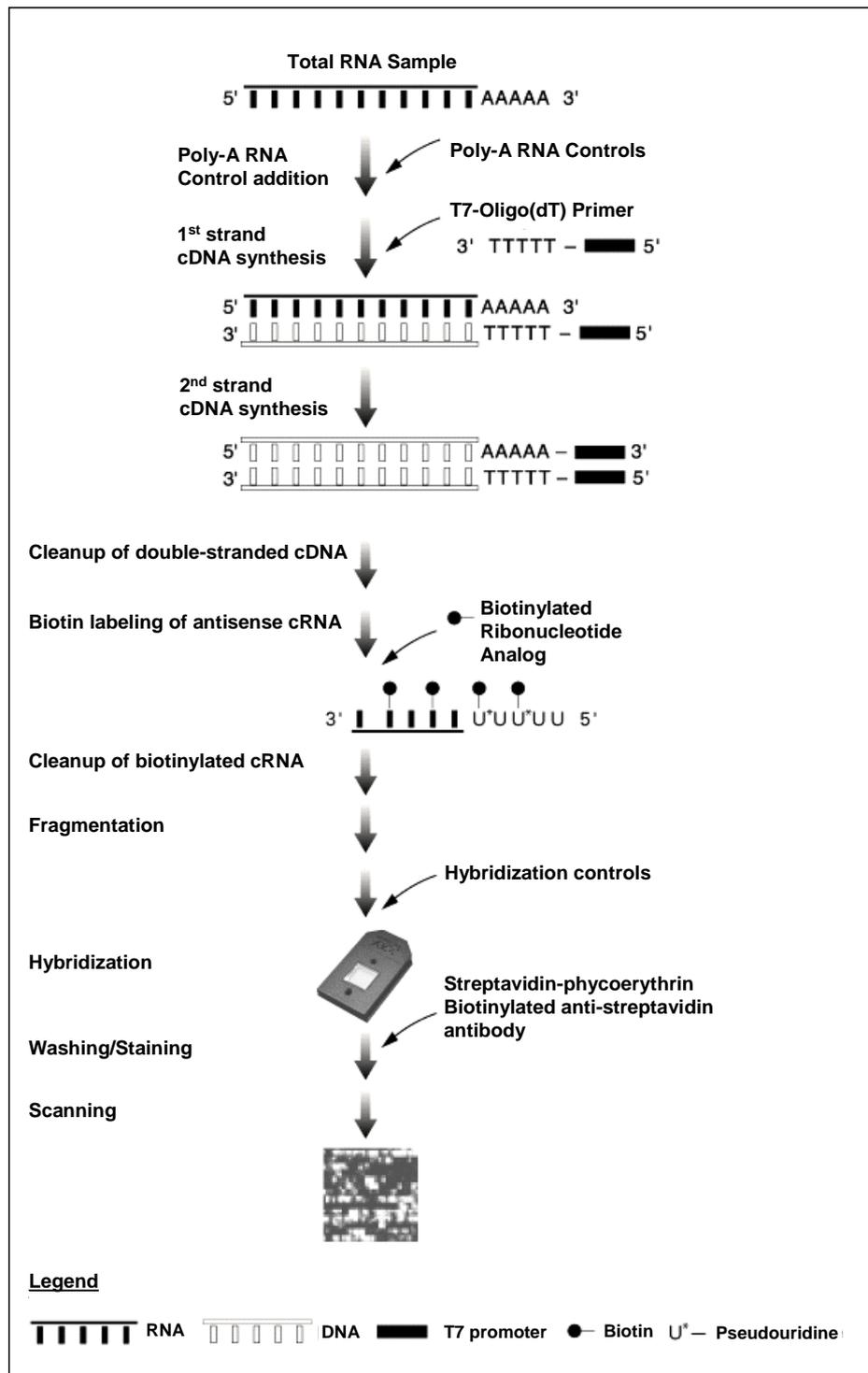


Abb. 3: Schematische Darstellung der Transkription biotinylierter „antisense-RNA“ und Microarray-Hybridisierung (aus „Affymetrix GeneChip® Expression Analysis, Technical manual“).

Der „GeneChip® Chicken Genome Array“ enthält 32773 Transkripte von 28000 korrespondierenden Genen. Jedes dieser Gene ist mit elf Sondenpaaren auf dem GeneChip® aufgebracht. Diese elf Sondenpaare („probe pairs“) ergeben einen SONDENSATZ, das „probe set“. Ein Sondenpaar besteht aus der „perfect match“ Sonde und der „mismatch“ Sonde (Abb. 4). Während die „perfect match“ Sonde (PM) der Referenzsequenz des Transkriptes entspricht, wurde innerhalb der „mismatch“ Sonde (MM) das 13. Nukleotid ausgetauscht. Die MM dient im Vergleich mit der PM der Spezifitätskontrolle der Hybridisierung einer Probe (Kreuzhybridisierung). Bei Anwesenheit („present“) des Transkriptes erfolgt eine bessere Bindung an der PM (helleres Signal) als an der MM (dunkleres Signal). Der Vorteil dieses Verfahrens ist, dass unspezifische Hybridisierungen sowohl die PM als auch die MM betreffen, so dass nur wenige falsch-positive Signale generiert werden.

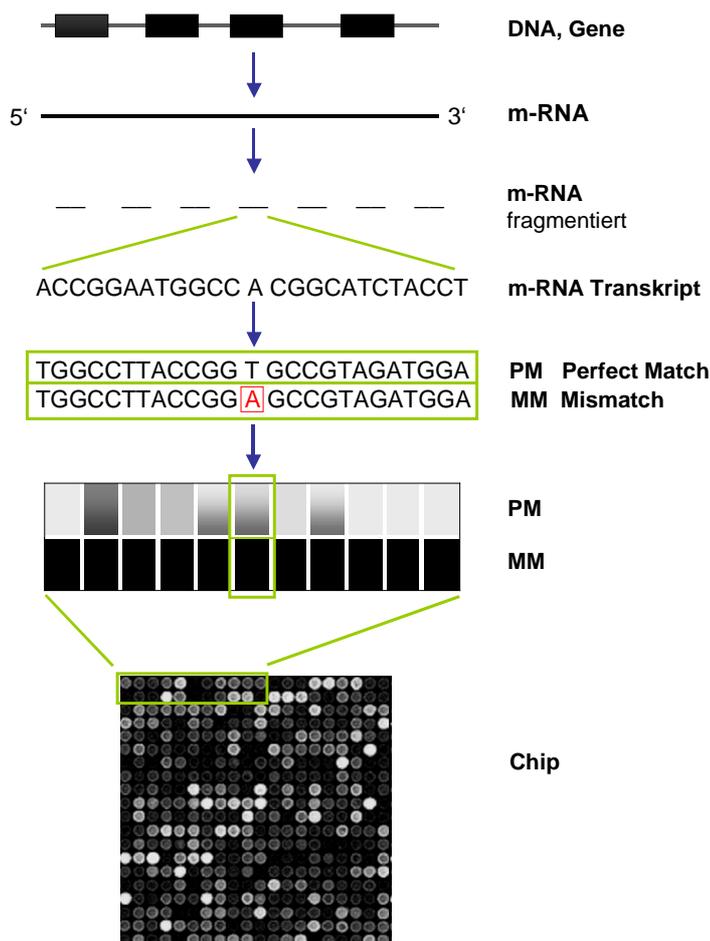


Abb. 4: Schematische Darstellung der PM und MM-Hybridisierung.

## 2.4 Pathogenese von HPAIV-Infektionen bei Säugern und Vögeln

Im folgenden Teil der Literaturübersicht soll zunächst auf die Pathophysiologie der Blutgerinnung nach einer HPAIV-Infektion eingegangen werden. Die ausgeprägte Blutungsneigung ist ein häufiger Befund bei Vögeln, die an einer HPAIV-Infektion verstorben sind (Muramoto et al., 2006).

Ferner wird die Pathogenese von HPAIV-Infektionen an ausgewählten Säugern und Vögeln vorgestellt, bechränkt auf die Spezies oder Familien, die im Rahmen dieser Arbeit experimentell untersucht wurden.

### 2.4.1 Pathophysiologie der Blutgerinnung nach HPAIV-Infektionen

Bei der Blutgerinnungskaskade unterscheidet man zunächst die endogene Aktivierung (Faktoren XII, IX) durch Schäden des Blutgefäßendothels von der exogenen Aktivierung (Faktoren: II, VII, IV) durch Verletzungen, die zu einer Ausschüttung von Thromboplastin („**tissue factor**“) führt. Beide Kaskaden münden in die Aktivierung von Faktor X, dem Stuart-Prower-Faktor. Dieser spaltet Prothrombin zu Thrombin, welches wiederum Fibrinogen zu Fibrin spalten kann. Der Faktor XIII stabilisiert Fibrin und verankert den Thrombus im Blutgefäß. Daneben gibt es zahlreiche Faktoren, die aufgrund ihrer fibrinolytischen oder gerinnungshemmenden Funktion eine Gerinnung in der Abwesenheit von Verletzungen vermeiden. Hierzu zählen u.a. Plasmin und Antithrombin III, **Thrombomodulin** und der Thromboplastininhibitor (**TFPI**).

Bis heute gibt es nur wenige Publikationen (darunter Stopforth, 1970; Doerr et al., 1976; Doerr et al., 1981; Frost et al., 1999) zur Blutgerinnungskaskade im Geflügel, so dass die Interpretation der Ergebnisse auf der Grundlage der beim Menschen bekannten Signalwege erfolgt. Stopforth (1970) haben beispielsweise gezeigt, dass die endogene Aktivierung der Blutgerinnungskaskade beim Huhn im Vergleich zum Säuger vermindert ist. Es wird weiterhin vermutet, dass die Faktoren V und VII nur in geringen Mengen oder gar nicht beim Huhn vorkommen.

### 2.4.2 Mäuse

Experimentelle Untersuchungen an Mäusen (Inzuchtlinien BALB/C oder C57BL/6J) werden meist unter Verwendung von HPAIV-Isolaten von humanen Patienten

durchgeführt. Beschrieben wurden klinische Erscheinungen wie Ataxie, Tremor, Hypokinesie und Gewichtsverlust (Jang et al., 2009). Histopathologisch fanden sich Läsionen im Respirationstrakt und im zentralen Nervensystem (ZNS). Nekrosen im olfaktorischen und respiratorischen Epithel wurden von einer Infiltration neutrophiler Granulozyten und der Ausprägung einer broncho-interstitiellen Pneumonie begleitet. Unregelmäßig zeigte sich eine nichteitrigte Meningoenzephalitis mit Nervenzellnekrosen. Die Vagusganglien wiesen eine Ganglioneuritis auf. Der Nachweis von Influenzavirusantigenen korrelierte mit den betroffenen Zellen. Im Blut und in Endothelzellen konnte kein Antigen nachgewiesen werden. Der Infektion der Lunge scheint somit eine über den *Nervus vagus* verlaufende, aufsteigende Infektion des ZNS zu folgen (Tanaka et al., 2003). Im zeitlichen Verlauf konnte der Nachweis des Virusantigens zunächst in peripheren, enterischen Nerven, dann im *Nucleus tractus solitarii* und schließlich in weiteren Kerngebieten des Stammhirns erfolgen (Jang et al., 2009).

Dybing et al. (2000) untersuchten im Mausmodell die Virulenz unterschiedlicher HPAIV-Isolate aus Vögeln und Menschen. Das humane Isolat (Influenza A/HK/156/97 H5N1) und ein aviäres Virus (Influenza A/chicken/HK/220/97 H5N1) führten innerhalb von acht Tagen bei 100 % der Tiere zum Tode, ein weiteres aviäres Isolat (Influenza A/chicken/HK/728/97 H5N1) führte bei 75 % der Mäuse zu tödlicher Infektion. Diese ging mit ausgeprägten interstitiellen Pneumonien einher, die als Todesursache angesehen wurden. Der Antigennachweis beschränkte sich weitgehend auf den Respirationstrakt. Ausschließlich mit dem humanen Influenzavirusisolat infizierte Mäuse zeigten einen immunhistochemischen Virusnachweis in Neuronen pulmonaler Ganglien.

### **2.4.3 Katzen**

Die natürliche Infektion von Katzen mit HPAIV in Thailand und Deutschland führte zu einer broncho-interstitiellen Pneumonie und scharf begrenzten Leberparenchymnekrosen. Histologisch fanden sich eine Lymphozytendepletion in den lymphatischen Organen, Nekrosen in der Nebenniere, nichteitrigte Meningoenzephalitis, interstitielle Pneumonie mit Bronchialepithelnekrosen sowie Tubuluszelldegeneration und interstitielle Nephritis. Der immunhistochemische Nachweis des Influenzavirusantigens war in Lunge (Pneumozyten), Leber (Hepatozyten), Herz

(Kardiomyozyten), Nebenniere, den lymphatischen Organen (Makrophagen) und ZNS (Neuronen) möglich (Songserm et al., 2006; Klopfleisch et al., 2007).

Die Läsionen in Lunge und Leber werden als Hauptbefunde und die Beeinträchtigung der Leberfunktion als entscheidend in der Pathogenese der Influenzavirusinfektion bei Katzen angesehen (Klopfleisch et al., 2007).

Experimentell führte eine okulo-oro-pharyngeale Infektion von Hauskatzen mit  $10^6$ EID<sub>50</sub> pro Tier (Influenza A/cat/Germany/R606/2006) zu vergleichbaren Läsionen wie nach natürlicher Infektion. Ein Tier überlebte diese Virusdosis. Bei immunhistologischer Untersuchung konnte, wie auch bei Katzen der geringeren Dosisgruppen, kein Influenzavirusantigen nachgewiesen werden (Vahlenkamp et al., 2008). Intratracheal mit  $2,5 \times 10^4$  KID<sub>50</sub> infizierte Hauskatzen entwickelten neben Fieber und Lethargie respiratorische Symptome und eine Konjunktivitis (Kuiken et al., 2004). Eine Katze verstarb sechs Tage p. i. Der Nachweis von Influenzavirusantigen gelang im Lungengewebe. Die gleichen Ergebnisse wurden nach der Verfütterung infizierter Hühner an Katzen erzielt. Bemerkenswert ist hier der Antigennachweis in den intramuralen Ganglien des Darmes (Kuiken et al., 2006).

#### **2.4.4 Hühner**

Klinisch sind neben dem perakuten Verlauf auch akute und zeitlich protrahierte Verläufe möglich, in denen die Tiere lethargisch oder komatös sind. Die Futter- und Wasseraufnahme ist reduziert, die Legeleistung von Hennen sinkt oder stagniert vollständig. Liegt ein subakuter Verlauf vor, können die Tiere zentralnervöse Symptome wie Tremor, Torticollis, Opisthotonus, Nystagmus, Paresen, Ataxien etc. entwickeln (Swayne und Pantin-Jackwood, 2008).

Experimentelle Studien haben gezeigt, dass die Läsionen in Vögeln und Säugern u. a. von der Spezies, dem Alter des Tieres, der Infektionsdosis, der Infektionsroute und dem Virusisolat abhängen. Bei Hühnern ist es bei perakuten Verläufen möglich, dass die Tiere keine Läsionen aufweisen. Beim akuten Verlauf treten häufig gestäubtes Gefieder, Ödeme und Blutungen auf. Im protrahierten Verlauf sind Degenerationen und Nekrosen der Parenchyme (Pankreas, Herz, Leber, Niere) und der Haut der Körperanhänge bzw. Ständer zu finden, sowie Ergüsse in Körperhöhlen verbunden mit einer ausgedehnten Blutungsneigung. Die Lunge ist häufig ödematös, gestaut, eine interstitielle Pneumonie kommt vor. Die lymphatischen Organe (Thymus, Milz, Bursa),

insbesondere von Jungtieren, sind depletiert, die Lymphfollikel zentral nekrotisch. Bei Legehennen entwickelt sich häufig eine Dotter-Peritonitis, die aus einer Infektion meist mit *Escherichia coli* resultiert (Swayne und Pantin-Jackwood, 2008). Histopathologisch sind bei perakuten Verläufen möglicherweise keine Läsionen nachweisbar, meist finden sich jedoch zumindest Nekrosen der Endothelien und der Kardiomyozyten mit geringgradiger Entzündungsreaktion. Nekrosen der Parenchyme, vorwiegend in Haut, Pankreas, ZNS, Herz, Lunge, Nebenniere und den lymphatischen Organen, sind in der Regel der Hauptbefund in akuten und subakuten Verläufen (Perkins und Swayne, 2001). Je protrahierter der Verlauf, desto eher stehen Nekrosen der Parenchyme im Vordergrund, wobei Entzündungsreaktionen mit der Überlebensdauer zunehmen (Swayne und Pantin-Jackwood, 2008). Das Influenzavirusantigen ist in den Parenchymenten zahlreicher Organe, den Gefäßendothelien, dem ZNS und PNS nachweisbar (Mo et al., 1997; Jones und Swayne, 2004).

#### **2.4.5 Entenvögel**

##### **Hausenten (Pekingenten und Masthybride)**

Die H5N1 HPAIV Isolate aus den Jahren 1997-2000 replizieren nur im Respirationstrakt von Hausenten und induzieren hier geringgradige respiratorische Läsionen (Perkins und Swayne, 2002). Lediglich die natürliche Infektion mit H7N1 HPAIV in Italien, 1999-2000, führte bei Moschusenten (*Cairina moschata*) zu Todesfällen. Das ZNS war hierbei das Hauptzielorgan (Capua und Mutinelli, 2001).

Seit 2001 zeigen HPAIV in Hausenten häufiger einen Neurotropismus und infizieren das Pankreas. Die Infektionen verlaufen mit hoher Mortalität unter der Ausprägung von schweren zentralnervösen klinischen Anzeichen (Kim et al., 2009). Ein Vergleich mit einem thailändischen Isolat aus dem Jahr 2004 zeigte, dass Hausenten eine deutlich höhere Morbidität und Mortalität entwickeln als Stockenten und Kreuzungsrassen (Saito et al., 2009). Londt et al. (2008) konnten nach der Infektion von 4 Wochen alten Pekingenten mit einem H5N1-Isolat (Influenza A/turkey/Turkey/1/2005) eine 100 %ige Mortalität innerhalb von 5 Tagen feststellen. Die Zielorgane waren das Herz und das ZNS.

Bei Hausenten fanden sich virusinduzierte Läsionen in zahlreichen Organen, wie dem Respirationstrakt, dem Pankreas, dem ZNS, den Nebennieren und dem Herz (Kwon et al., 2005b; Pantin-Jackwood und Swayne, 2007; Yamamoto et al., 2007). Allerdings ist

die Virulenz von HPAIV seit 2001 variabel und scheint abhängig zu sein vom jeweiligen Virusisolat und dem Alter des Tieres (Hulse-Post et al., 2007; Kwon et al., 2005b).

### **Wildenten**

Studien mit den Isolaten A/duck meat/Anyang/AVL-1/01 und A/whooper swan/Mongolia/244/05 bei Stockenten (*Anas platyrhynchos*), Spießenten (*Anas acuta*), Krickenten (*Anas crecca*), Rotkopffenten (*Aythya americana*) und Brautenten (*Aix sponsa*) zeigten, dass lediglich Brautenten zentralnervöse Symptome, getrübe Augen und gesträubtes Gefieder entwickelten. Die Tiere waren zwischen zehn und 16 Wochen alt (Brown et al., 2006).

Eine weitere experimentelle Untersuchung mit Influenza A/turkey/Turkey/1/2005 bei sechs Entenspezies im Alter von acht bis elf Monaten führte bei Tauchenten (Reiherente, *A. fuligula* und Tafelente, *A. ferina*) zu respiratorischen und zentralnervösen Störungen. Enten im engeren Sinne (*Anas*) entwickelten keine klinischen Anzeichen und starben nicht. Untersucht wurden hierbei Stockenten (*A. platyrhynchos*), Krickenten (*A. crecca*), Pfeifenten (*A. penelope*) und Schnatterenten (*A. strepera*) (Keawcharoen et al., 2008). Brautenten zeigten nach H5N1 HPAIV-Infektion Nekrosen im ZNS, im Pankreas, den Nebennieren und im Herz (Brown et al., 2006).

### **Schwäne**

Seit dem Auftreten von H5N1 HPAIV in Europa gelten Schwäne als Indikatorspezies (Teifke et al., 2007; Terregino et al., 2006). Höckerschwäne (*Cygnus olor*) und Singschwäne (*Cygnus cygnus*) verstarben nach natürlicher Infektion mit zentralnervösen Störungen (Teifke et al., 2007).

Untersuchungen an diversen Schwanspezies zeigten, dass Jungtiere der Rassen Höckerschwan, Singschwan, Trauerschwan (*Cygnus atratus*) und Trompeterschwan (*Cygnus buccinator*) nach H5N1 HPAIV-Infektion zu 100 % verstarben (Brown et al., 2008). Nach natürlicher und experimenteller Infektion entwickelten Schwäne eine ausgedehnte Blutungsneigung, Ödeme und Stauung der Parenchyme sowie Pankreasnekrosen. Histologisch standen Nekrosen und Entzündungen des ZNS, des Pankreas und der Leber im Vordergrund. Das Virusantigen war im ZNS, im Pankreas,

in den Nebennieren und der Leber regelmäßig nachweisbar. Ein Endotheltropismus kam gelegentlich ebenfalls vor (Teifke et al., 2007; Brown et al., 2008).

#### **2.4.6 Sperlingsvögel**

Die experimentellen Infektionen von Sperlingsvögeln zeigen eine große Variabilität hinsichtlich der Empfänglichkeit und der Virusausbreitung im Gewebe.

Zebrafinken (*Taeniopygia guttata*) waren teilnahmslos mit gekrümmter Haltung, gesträubtem Gefieder und Anorexie. Antigenassoziiert lagen Nekrosen in zahlreichen Organen, wie der Schnabelhöhle, dem Gehirn, dem Pankreas, der Milz, der Nebenniere und dem Ovar vor (Perkins und Swayne, 2003; Swayne, 2007). Hausfinken (*Carpodacus mexicanus*) entwickelten ferner zentralnervöse Störungen mit Nekrosen im Pankreasparenchym und dem ZNS. Im Gegensatz dazu waren die klinischen Erscheinungen bei Haussperlingen (*Passer domesticus*) und bei europäischen Staren (*Sturnus vulgaris*) mild oder gar nicht vorhanden. Virusantigen war nicht nachweisbar. Untersuchungen mit anderen H5N1 HPAIV-Isolaten zeigten, dass Haussperlinge erkranken und sterben können. Das Influenza-A-Virus wurde in Lunge und ZNS mittels Zellkultur nachgewiesen (Boon et al., 2007).

Nach der natürlichen Infektion von Amerikaner- und Dickschnabelkrähen (*Corvus macrorhynchos*) sowie koreanische Elstern (*Pica pica sericea*) mit HPAIV H5N1 zeigten eine nekrotisierende Pankreatitis, eine Myokarditis, eine nichteitrigende Enzephalitis, eine lymphozytäre Adrenalitis und eine Ganglioneuritis des Plexus myentericus. Virusantigen war in Neuronen, den Pankreaszellen, Granulozyten und Vorläuferzellen des Knochenmarks nachweisbar (Kwon et al., 2005a; Tanimura et al., 2006).

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Material**

#### **3.1.1 Versuchstiere**

- Mäuse des Stammes BALB/c (Charles River GmbH), sechs Wochen alt
- Katzen (Charles River GmbH), drei Monate alt
- Hühner (Lohmann Tierzucht GmbH), vier, sieben, sechs bis acht Wochen alt
- Höckerschwäne (Schwanzucht), adult
- Peking- und Moschusenten (Mastbetrieb), drei Wochen alt
- Stockenten (FLI-Nachzucht), drei Wochen alt
- Schwarzkehlchen (Max-Planck-Institut für Ornithologie), adult
- Mönchsgrasmücken (Institut für Vogelforschung, Vogelwarte Helgoland), adult
- Blutschnabelweber (Max-Planck-Institut für Ornithologie), adult

#### **3.1.2 Probenumfang**

Für die histopathologischen und immunhistologischen Untersuchungen von Vögeln und Säugern wurden folgende Organe entnommen:

##### **Vögel**

Schnabel, Trachea, Lunge, Herz, Drüsenmagen, Muskelmagen, Duodenum, Zäkum, Pankreas, Leber, Milz, Bursa cloacalis, Thymus, Gehirn, Rückenmark, Auge, Niere, Nebenniere, Gonade, Skelettmuskel, Haut.

##### **Säuger**

Nase, Trachea, Lunge, Herz, Magen, Darm (Duodenum, Jejunum, Ileum, Zäkum, Kolon, Rektum), Pankreas, Leber, Milz, Thymus, Tonsille, Lymphknoten, Gehirn, Rückenmark, Auge, Niere, Nebenniere, Gonade, Skelettmuskel, Haut.

### 3.1.3 Virusisolate

- Influenza A/duck/Vietnam/TG24-01/2005 (H5N1): **TG24-01/05**
- Influenza A/swan/Germany/R65/2006 (H5N1): **R65/06**
- Influenza A/cat/Germany/R606/2006 (H5N1): **R606/06**
- Influenza A/swan/Germany/R1372/2007 (H5N1): **R1372/07**
- Influenza A/duck/Germany/R1959/2007 (H5N1): **R1959/07**
- Influenza A/chicken/Italy/445/1999 (H7N1): **445/99 (H7N1)**

### 3.1.4 Zelllinien

- MDCK-2: CCLV-RIE 1061, Nierenepithelzellen, Hund
- DF-1: CCLV-RIE 1029, Embryofibroblasten, Huhn

### 3.1.5 Antikörper und Antiseren

- Primärer Antikörper zum Nachweis von Influenza A NP in der Zellkultur:  
Monoklonaler Antikörper (1:20), erhalten von Dr. R. Riebe, Insel Riems, Zelllinie CCLV-RIE 0890 Hy HB65
- Sekundärer Antikörper für die Zellkultur: IgG Ziege-anti-Maus, peroxidasekonjugiert (1:1000), Sigma-Aldrich
- Primärer Antikörper zum Nachweis von Influenza A NP auf Paraffinschnitten:  
Kaninchen anti-Influenzavirus NP Hyperimmunserum (1:750), erhalten von Dr. E. Mundt
- Kontrollserum auf Paraffinschnitten: Kaninchen anti-bovines Papillomavirus Hyperimmunserum (1:1000), als irrelevanter Antikörper
- Sekundärer Antikörper auf Paraffinschnitten: IgG Ziege-anti-Kaninchen, biotinyliert (1:200), Vector Laboratories
- Ziegennormalserum (aus Frischblut einer gesunden Ziege, nach Spontangerinnung Zentrifugation bei 3000 U/min für 10 min, Lagerung bei -20°C)

### 3.1.6 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Alsevers Trypsin Versen (ATV), einfach konzentriert, pH 7,1-7,3

8,0	g	NaCl	Carl Roth
0,4	g	KCl	Carl Roth
1,0	g	Dextrose	Sigma-Aldrich
0,58	g	NaHCO <sub>3</sub>	Carl Roth
0,5	g	Trypsin	Invitrogen
0,2	g	EDTA	Carl Roth

ad 1000 ml Reinstwasser, Lagerung bei -20°C

bzw. ad 500 ml Reinstwasser (= 2 x ATV, doppelt konzentriert)

Anwendung: körperwarm

ZB28, pH 7,4

2,45	g	NaHCO <sub>3</sub>	Carl Roth
8,8	g	IMDM	Sigma-Aldrich
5,32	g	Medium F12	Sigma-Aldrich
100	ml	FKS 10 %	Invitrogen

ad 1000 ml Reinstwasser, Sterilfiltration, Begasung mit CO<sub>2</sub> 2,5 %

ZB28d, pH 7,4

2,45	g	NaHCO <sub>3</sub>	Carl Roth
8,8	g	IMDM	Sigma-Aldrich
5,32	g	Medium F12	Sigma-Aldrich
5,6	ml	BSA (35 %)	MP Biomedicals

ad 1000 ml Reinstwasser, Sterilfiltration, Begasung mit CO<sub>2</sub> 2,5 %

bzw. ad 500 ml Reinstwasser (= ZB28dd, doppelt konzentriert) und

10	ml	Penizillin-Streptomycin	Invitrogen
----	----	-------------------------	------------

ZB5, pH 7,2

1,52	g	NaHCO <sub>3</sub>	Carl Roth
5,32	g	MEM Hanks	Sigma-Aldrich
4,76	g	MEM Earle	Invitrogen
0,12	g	Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich
10	ml	NEAS	Biochrom
100	ml	FKS 10 %	Invitrogen

1000 ml Reinstwasser, Sterilfiltration, Begasung mit CO<sub>2</sub> 2,5 %

ZB5d, pH 7,2

1,52	g	NaHCO <sub>3</sub>	Carl Roth
5,32	g	MEM Hanks	Sigma-Aldrich
4,76	g	MEM Earle	Invitrogen
0,12	g	Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich
10	ml	NEAS	Biochrom
5,6	ml	BSA (35 %)	MP Biomedicals

ad 1000 ml Reinstwasser, Sterilfiltration, Begasung mit CO<sub>2</sub> 2,5 %  
bzw. ad 500 ml Reinstwasser (= ZB5dd, doppelt konzentriert) und

10	ml	Penizillin-Streptomycin	Invitrogen
----	----	-------------------------	------------

Plaquetestmedium

20 ml ZB5dd oder ZB28dd  
20 ml steriler Bacto Agar, heiß  
gut mischen und warm halten bei 42°C, Wasserbad

Kristallviolett – Gebrauchslösung, 0,1 %

1,0	g	Kristallviolett	Carl Roth
270	ml	Formaldehyd 37 %	Carl Roth
730	ml	Aqua dest.	

### 3.1.7 Medien und Lösungen für die Microarray-Analyse

#### Mastermix Nr. 1

4	μl	dNTP Stammlösung: 10 mM dNTP	Ambion
1	μl	RNase Inhibitor	Ambion
2	μl	Erststrang-zehnfach-Puffer	Ambion
1	μl	Array Script	Ambion

#### Mastermix Nr. 2

63	μl	Ribonuklease-freies Wasser	Ambion
10	μl	Zweitstrang-zehnfach-Puffer	Invitrogen
4	μl	dNTP Stammlösung: je 10 mM dNTP	Ambion
2	μl	DNA-Polymerase I von <i>E. coli</i> : 5-10 U/μl	Ambion
1	μl	Ribonuklease H: 1-4 U/μl	Ambion

#### Mastermix Nr. 3

20	μl	Aufgereinigte cDNA	
12	μl	Biotin Labeled Ribonucleotides	Ambion
4	μl	10fach T7-Reaktions Puffer	Ambion
4	μl	T7 Enzyme Mix	Ambion

#### Fünffach Fragmentierungspuffer

4	ml	1 M Tris Azetat, pH 8.1	Sigma-Aldrich
640	mg	Magnesiumazetat	Aldrich
980	mg	Kaliumazetat	Sigma-Aldrich
ad 20 ml		Ribonuklease-freies Wasser	Ambion
		pH-Werteinstellung erfolgte durch Eisessig	Sigma-Aldrich

12fach MES Stammlösung

70,4	g	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure Monohydrat	Sigma-Aldrich
193,3	g	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure Natriumsalz	Sigma-Aldrich
800	ml	Wasser für die Molekularbiologie	BioWhittaker
		Filtration durch einen 0,2 Mikrometer Sterilfilter	Thermo Fisher Scientific

2fach Hybridisierungspuffer

8,3	ml	12fach MES Stammlösung	
17,7	ml	5 M NaCl, RNase frei	Ambion
4,0	ml	0,5 M EDTA	Sigma-Aldrich
0,1	ml	10 % Tween 20	Carl Roth
19,9	ml	Ribonuklease-freies Wasser	Ambion

2fach „stain buffer“

112,8	ml	Ribonuklease-freies Wasser	Ambion
41,7	ml	12fach MES Stammlösung	
92,5	ml	5 M NaCl	Ambion
2,5	ml	10 % Tween 20	Carl Roth
		Filtration durch einen 0,2 Mikrometer Sterilfilter	Thermo Fisher Scientific

Färbelösung 1

300	µl	2fach „stain buffer“	
270	µl	Ribonuklease-freies Wasser	Ambion
24	µl	Azetyliertes BSA 50 mg/ml	Invitrogen
6	µl	R-Phycoerythrin Streptavidin	Molecular Probes

Antikörperlösung, Färbelösung 2

300	µl	2fach „stain buffer“	
266,4	µl	Ribonuklease-freies Wasser	Ambion
24	µl	Azetyliertes BSA 50 mg/ml	Invitrogen
6	µl	10 mg/ml Ziegen-IgG	Sigma-Aldrich
3,6	µl	0,5 mg/ml biotinylierter Anti-streptavidin Antikörper (Ziege)	Vector Laboratories

Färbelösung 3

300	µl	2fach „stain buffer“	
270	µl	Ribonuklease-freies Wasser	Ambion
24	µl	Azetyliertes BSA 50 mg/ml	Invitrogen
6	µl	R-Phycoerythrin Streptavidin	Molecular Probes

Stringenter Waschpuffer

83,3	ml	12fach MES Stammlösung	
5,2	ml	5 M NaCl	Ambion
1,0	ml	10 % Tween 20	Carl Roth
910,5	ml	Wasser für die Molekularbiologie	BioWhittaker
		Filtration durch einen 0,2 Mikrometer Sterilfilter	Thermo Fisher Scientific

Nicht-stringenter Waschpuffer

300	ml	SSPE (3 M NaCl, 0,2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,02 M EDTA)	Ambion
1,0	ml	10 % Tween 20	Carl Roth
699	ml	Wasser für die Molekularbiologie	BioWhittaker
		Filtration durch einen 0,2 Mikrometer Sterilfilter	Thermo Fisher Scientific

### 3.1.8 Lösungen für die histopathologische Untersuchung

#### 4 % Formaldehydlösung (pH 7,3)

4	g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Carl Roth
6,5	g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Carl Roth
100	ml	Formaldehyd 37 %	Carl Roth
900	ml	Aqua dest.	

#### 20 x Phosphate-buffered saline (PBS), pH 7,3

29,25	g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Carl Roth
160	g	NaCl	Carl Roth
4	g	KCl	Carl Roth
4,9	g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Carl Roth
ad 1000	ml	Aqua dest.	

#### Eosin/Phloxin

20	ml	Eosin (1 %)	Merck
2	ml	Phloxin (1 %)	Merck
156	ml	Ethanol	Carl Roth
0,8	ml	Eisessig	Carl Roth

#### Hämalaun (nach Mayer)

1	g	Hämatoxylin	Medite
200	mg	NaJO <sub>3</sub>	Carl Roth
50	g	Kaliumalaun	Carl Roth
1	l	Aqua dest.	

schütteln bis blauviolette Lösung entsteht

50	g	Chloralhydrat	Carl Roth
1	g	Zitrat	Carl Roth

Farbumschlag zu rotvioletter Lösung

10 x Tris-buffered saline (TBS), pH 7,6

60,57 g	Tris-HCl	Merck
80,0 g	NaCl	Carl Roth
in 500 ml Aqua dest. lösen		
mit HCl auf pH 7,65 einstellen		
		Carl Roth

10 mM Zitratpuffer (pH 6,0)

2,1 g	Zitrat-Monohydrat	Carl Roth
900 ml	Aqua dest.	
mit 2 M NaOH auf pH 6,0 einstellen		
ad 1000 ml Aqua dest.		
		Carl Roth

**3.1.9 Sonstige Medien, Puffer und Lösungen**

Tupferprobenmedium

100 ml	ZB5	Zellbank, FLI
1 ml	Enrofloxacin (100 mg/ml)	Bayer
0,5 ml	Gentamicin (10 mg/ml)	Invitrogen
0,5 ml	Lincomycin (200 mg/ml)	CEVA

Organprobenmedium

100 ml	ZB5	Zellbank, FLI
1 ml	Penizillin-Streptomycin (Penizillin 10000 U/ml, Streptomycin 10 mg/ml)	Sigma-Aldrich

Bacto Agar, 1,8 %

3,6 g	Bacto Agar	Difco
ad 200 ml Aqua dest.		
autoklavieren und erkalten lassen		

### 3.1.10 Reagenzien, Chemikalien, Arzneimittel und Kits

1 % Heringssperma DNA (10 mg/ml)	Promega
3-Amino-9-Ethyl-Carbazol-staining, AEC	DAKO
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent
Agilent RNA 6000 Pico Kit	Agilent
Ammoniumazetatlösung	Sigma-Aldrich
Array Control RNA Spikes (BioB, BioC, BioD, Cre)	Affymetrix
B2-Oligo (One Cycle Target Labeling and Control Reagents)	Affymetrix
BSA, Bovines Serum Albumin 35 %	MP Biomedicals
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Roche
Decal <sup>®</sup>	Quartett Immundiagnostika
DNase I, Ribonuklease-frei 1000 units (1 u/μl)	Fermentas GmbH
Ethidiumbromid	Carl Roth
Eukitt <sup>®</sup>	Inge Hecht
Flockchek AI MultiS-Screen IDEXX	IDEXX
GeneChip Eukaryotic Poly-A RNA Control Kit	Affymetrix
Glykogenstammlösung	Ambion
In-vitro-Transkription Master Mix (Mastermix Nr. 3)	Ambion
MessageAMP <sup>®</sup> II-Biotin Enhanced Kit	Ambion
NuceloSpin <sup>®</sup> 8/96 Virus Kit	Macherey-Nagel
Paraffin Histosec	Merck
Penizillin-Streptomycin	Invitrogen
Phenol/chloroform/isoamyl alcohol	Ambion
QuantiTect SYBR Green PCR Kits	Qiagen
Reverse Transcription Master Mix (Mastermix Nr.1)	Ambion
Ribonuklease-freies Wasser	Ambion
RL-Puffer zur Organausschleusung	
RNeasy <sup>®</sup> Mini Kit	Qiagen
Rotihistol	Carl Roth
Second Strand Master Mix (Mastermix Nr. 2)	Ambion

**Fortsetzung: Reagenzien, Chemikalien, Arzneimittel und Kits**

SuperScript™ III One-Step RT-PCR System mit Invitrogen	
Platinum® Taq-DNA-Polymerase	
T7 Oligo (dT) Primer	Ambion
Trypsin 10 mg/ml	Sigma-Aldrich

**3.1.11 Verbrauchsmaterial**

BD Microtainer, SST Tubes	BD
GeneChip® Chicken Genome Array	Affymetrix
Einfrierröhrchen, 2 ml	Greiner
Einmalpipetten	Sarstedt
Flockchek AI MultiS-Screen	IDEXX
Mehrkommerzellkulturschalen	Corning
Monovette, EDTA, 9 ml	Sarstedt
Objektträger (SuperFrost® plus)	Menzel-Gläser
Objektträger (SuperFrost®)	Menzel-Gläser
Pipettenspitzen	Nerbe
Probenkassetten mit Deckel	Meditate
Reaktionsgefäße	Eppendorf
RNA Pico Lab Chip®	Agilent
Rundbodenröhrchen, 5 ml	BD Falcon
Spitzen und Kanülen	Terumo
Stahlkugeln, 3 mm Durchmesser	Isometall
Thermo-Fast® 96, Non Skirted (PCR-Platte)	Thermo scientific
Tupfer, Bakteriette	Copan Italia
Vivaspin 20, Filtrerröhrchen	Vivascience
Zellkulturflaschen TC 25, ca. 25 cm <sup>2</sup> Fläche	Corning
Zellkulturflaschen TC 75, ca. 75 cm <sup>2</sup> Fläche	Corning
Zentrifugationsröhrchen, 15 ml	Sarstedt

### 3.1.12 Geräte

Es sind nur die über die Laborgrundausrüstung hinausgehenden Geräte aufgeführt.

Affymetrix Fluidic Station 450	Affymetrix
Agilent 2100 Bioanalyser	Agilent Technologies
Ausgießstation	Medite
Autotechnikon BVM 2050/Z	Medite
Axioskop, Mikroskop	Carl Zeiss
Entwässerungsautomat BVM 2050	Medite
Fotokamera am Axioskop	Carl Zeiss
Fotokamera Canon EOS 500D	Canon
Fotokamera Olympus	Olympus
GeneChip® Scanner	Hewlett Packard, Affymetrix
GeneChip® Hybridisation Oven 640	Affymetrix
Freedom EVO, Extraktionsroboter	Tecan
Microtom SM 2000 R	Microm
MX3000p real timer RT-PCR System	Stratagene
Nano Drop 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific
Qiashreder	Qiagen
qPCR 7300 RealTime PCR System	Applied Biosystems
Schüttler	IKA Ks 260
Thermocycler Biometra, TRIO Heated Lid	Biotron
Tissue Lyzer	Qiagen
Waschstation: Fluidics Station 400	Affymetrix
Zentrifuge	Heraeus, Multifuge 1 S-R

### 3.1.13 Software

2100 Expert	Agilent
Microarray Suite statistical algorithm (MAS 5.0)	Affymetrix
MxPro QPCR Software	Stratagene
ND 1000 Version 3.30	Thermo Fisher Scientific
NetAffx™ Analysis Center	Affymetrix

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Methoden der funktionellen Untersuchung zur Pathogenese von HPAIV-Infektionen**

#### **3.2.1.1 Zellkulturen und Virusanzucht**

Die Inkubation aller permanenten Zelllinien erfolgte in feuchter Atmosphäre bei 37°C in TC 25 und TC 75 Zellkulturflaschen.

#### **3.2.1.2 Kultivierung von DF-1-Zellen**

Die Vermehrung der DF-1-Zellen erfolgte in ZB28 Kulturmedium. Im Abstand von 3-4 Tagen erreichten die Zellen eine geschlossene Zelllage und wurden umgesetzt. Hierzu wurde nach Abnahme des ZB28 einmal mit körperwarmer ATV-Lösung gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit ATV-Lösung (0,5 ml TC 25, 2 ml TC 75) bis zur Ablösung der Zellen. Die Zellen wurden in ZB28 resuspendiert und im Verhältnis 1: 6 in ein Kulturgefäß umgesetzt.

#### **3.2.1.3 Kultivierung von MDCK-2-Zellen**

Die MDCK-2-Zellen wurden in ZB5 Kulturmedium kultiviert. Die Teilung der Zellen erfolgte, wie unter 3.2.1.2 beschrieben, unter Verwendung von doppelt konzentrierter ATV-Lösung und der Aussaat im Verhältnis 1: 15.

#### **3.2.1.4 Virusvermehrung und –reinigung**

Das HPAIV R65/06 wurde in MDCK-2-Zellen vermehrt. Hierzu wurden dichtgewachsene Zellrasen von zwölf TC 75 Zellkulturflaschen mit einer „multiplicity of infection“ (MOI) von ca. 0,01 in 4 ml ZB5d Kulturmedium infiziert und für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde der Zellrasen mit ZB5d gewaschen und mit 20 ml ZB5d überschichtet. Die Inkubation erfolgte bis ein deutlicher zytopathogener Effekt (ZPE) erkennbar war. Danach wurde der Kulturüberstand geerntet. Je 10 ml des Überstandes wurden in Filterröhrchen (Vivascience 20, MWCO 100 kDa.) überführt. Die Zentrifugation (Heraeus) erfolgte mit 1500 U/min für ca. 20 min bei 4°C, bis jeweils 1-2 ml Konzentrat vorlagen. Das gleiche Protokoll diente zur Herstellung eines gereinigten, virusfreien Zellkulturüberstandes.

### 3.2.1.5 Mittlere kulturinfektiöse Dosis (KID<sub>50</sub>)

Die Bestimmung des Virustiters erfolgte über die mittlere kulturinfektiöse Dosis im Endpunkt-Verdünnungs-Verfahren in einer achtfachen Bestimmung auf 96-Loch-Zellkulturplatten. Hierzu wurden log 10-Verdünnungsreihen des gereinigten Virus in ZB5d (für MDCK-2-Zellen) oder ZB28d (für DF-1-Zellen) hergestellt. Je 100 µl einer Verdünnungsstufe wurden auf den konfluenten Zellrasen gegeben. Nach einer Stunde Adsorption bei 37°C wurden weitere 100 µl ZB5d oder ZB28d in jede Kavität („well“) gegeben. Zwei Spalten erhielten Medium ohne Virusverdünnung und dienten als Negativkontrolle. Nach drei Tagen wurden die Kavitäten mikroskopisch auf das Vorhandensein eines ZPE untersucht.

### Berechnung

Grundlage ist die Berechnung nach Spearman und Kärber:

$$\log \text{KID}_{50} / \text{Volumen} = x_0 - d/2 + d/n \times \sum x_i$$

d = log<sub>10</sub> des Verdünnungsfaktors

n = Zahl der pro Verdünnung eingesetzten Testobjekte

X<sub>0</sub> = positiver Exponent der höchsten Verdünnung, bei der alle Testobjekte positiv reagieren

Σx<sub>i</sub> = Summe aller auf die Infektion positiv reagierenden Testobjekte ab und einschließlich X<sub>0</sub>

### 3.2.1.6 Plaquetest

Die Titerbestimmung des aufgereinigten R65/06 erfolgte beim Plaquetest in einer Doppelbestimmung auf 6-Loch-Zellkulturplatten. Hierzu wurden log 10-Verdünnungsreihen des gereinigten Virus in ZB5d (für MDCK-2-Zellen) oder ZB28d (für DF-1-Zellen) hergestellt. Der konfluente Zellrasen wurde mit ZB5d oder ZB28d gewaschen. Je 500 µl einer Verdünnungsstufe wurden auf den Zellrasen gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Virusverdünnung abgesaugt, mit ZB5d oder ZB28d gewaschen und mit Plaquetestmedium überschichtet. Nach dem Erstarren des Mediums erfolgte die Inkubation bei 37°C für 72 Stunden. Anschließend wurden die Zellen mit je 3 ml Kristallviolett-Gebrauchslösung pro Vertiefung für 24 Stunden fixiert und gefärbt. Nach dem Lösen des Agars wurden die Kavitäten mit Leitungswasser gewaschen und die gefärbten Zellen ausgewertet.

### **Auswertung**

Die Zellrasenlöcher (Plaques) der letzten positiven Verdünnungsstufe wurden gezählt - nach folgender Formel wurde der Titer bestimmt:

$$\text{PBE/ml} = \text{Plaque-Anzahl} \times \text{Verdünnung} / 0,5 \text{ ml}$$

#### **3.2.1.7 Wachstumskinetik**

Zur Bestimmung der Wachstumskinetik wurden in zwei unabhängigen Versuchen  $1 \times 10^7$  MDCK-2-Zellen in ZB5 Kulturmedium und  $1 \times 10^7$  DF-1-Zellen in ZB28 Kulturmedium in TC 75 Zellkulturflaschen ausgesät und bis zur Anheftung inkubiert. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit ZB5d oder ZB28d erfolgte die Infektion mit gereinigtem R65/06 mit einer MOI von  $10^{-4}$  für 30 min. Danach wurde erneut gewaschen und mit 30 ml ZB5d oder ZB28d zur weiteren Inkubation überschichtet. Die Probennahme von 1 ml aus dem Zellkulturüberstand erfolgte zwischen 0 und 72 Stunden p. i. im Abstand von 8 Stunden. Der Überstand wurde bei 1500 U/min bei 4°C für 5 min zentrifugiert (Heraeus) und bei -70°C gelagert. Der Virustiter der Nachkommenviren wurde als Mittelwert aus zwei unabhängigen Bestimmungen der  $KID_{50}$ , wie beschrieben in Abschnitt 3.2.1.5, berechnet.

#### **3.2.1.8 RNA-Expressions-Analyse auf „GeneChip® Chicken Genome Array“**

Die Microarray-Analyse wurde zur Bestimmung der Genexpression in R65/06-infizierten DF-1-Zellen nach 2 h, 4 h, 6 h und 7,5 h durchgeführt. Die Infektion und die Behandlung mit virusfreiem, gereinigtem Zellkulturüberstand erfolgte zu jedem Zeitpunkt in Triplikaten.

### **Nomenklatur**

Die mehrheitlich englischen Begriffe aus dem Bereich der Microarray-Technologie wurden zum Teil beibehalten, um eine eindeutige Zuordnung zu gewährleisten, da eine sinngemäße Übersetzung nicht immer möglich ist. Bei der Darstellung der Ergebnisse regulierter Gene wurden die Gensymbole der „chicken.db“-Datenbank verwendet. Gegebenenfalls erfolgte eine Ergänzung mit weiteren in der Literatur üblichen Gensymbolen. Die Namen der regulierten Gene entsprechen den Angaben der Affymetrix-Plattform (NetAffx®).

### 3.2.1.8.1 Infektion von DF-1-Zellen mit R65/06

In die Kavitäten von 6-Loch-Zellkulturplatten wurden je  $1 \times 10^6$  DF-1-Zellen in ZB28 ausgesät und bis zur Anheftung für 7 h inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit ZB28d erfolgte die Infektion mit gereinigtem R65/06 mit einer MOI von 10 in ZB28d in Triplikaten für jeden Untersuchungszeitpunkt (2 h, 4 h, 6 h, 7,5 h). Nach einstündiger Virusadsorption wurde die Zellkultur mit ZB28d gewaschen und mit 2 ml ZB28d für die weitere Inkubation überschichtet. Als nicht infizierte Kontrolle wurden die Zellen mit gereinigtem, virusfreiem Zellkulturüberstand auf die gleiche Weise (in Triplikaten) behandelt.

### 3.2.1.8.2 RNA-Isolation und Qualitätskontrolle

Die **RNA-Isolation** erfolgte 2 h, 4 h, 6 h und 7,5 h nach der Infektion unter Verwendung des RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit. Hierzu wurden die Kavitäten einmalig mit PBS gewaschen und mit 0,5 ml ATV überschichtet. Nach Ablösung der Zellen erfolgte die Zugabe von 0,5 ml ZB28. Die Zellsuspension wurde mit 1000 U/min bei 4°C für 10 min zentrifugiert, das Medium abgenommen und das Zellpellet mit PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das PBS gründlich entfernt. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 600 µl RLT-Puffer (Qiagen) und anschließendem Verwirbeln bis zum Klarwerden der Lösung. Bis zur weiteren Bearbeitung im Labor von Dr. Koczan, BMFZ Rostock, erfolgte die Probenlagerung bei -20°C.

Die **chromatographische Aufreinigung** erfolgte mit dem RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit unter Verwendung des „Protocol: Purification of Total RNA from Animal Cells Using Vacuum/Spin Technology“ des Herstellers. Das Zelllysat wurde in eine „Qiashreder“-Säule (Qiagen) überführt und 1 min bei 6000 U/min zentrifugiert. Der DNase I-Verdau erfolgte nach Herstellerangaben (Qiagen) im Rahmen der Extraktion auf den Präparationssäulen („spin columns“). Zur Elution der RNA wurde zweimalig 60 µl DEPC-behandeltes Wasser auf die Membran pipettiert und jeweils für 1 min bei 6000 U/min zentrifugiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Die **Qualitätskontrolle der RNA** wurde mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer auf einem „RNA Pico Lab Chip<sup>®</sup>“ nach Herstellerangaben unter Verwendung des „Agilent RNA 6000 Pico Kit Guide“ durchgeführt und mit der 2100 Expert Software ausgewertet. Die Integrität der RNA wird als „RNA integrity number“ (RIN) zwischen 1,0 (vollständig

degradiert) und 10,0 (vollständig intakt) angegeben. Für Microarray-Experimente wird eine RIN mit einem Wert von mehr als 7,0 gefordert (Thompson et al., 2007).

Die **photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration und -Reinheit** erfolgte mit dem Nano Drop 1000 Spectrophotometer unter Verwendung des „NanoDrop 1000 User Manual“ und der Software ND 1000 Version 3.30 bei den Wellenlängen 230 nm, 260 nm und 280 nm. Wenn der Quotient der Messung (260 nm-Wert/280 nm Wert) unter 1,9 liegt, spricht dies für eine Kontamination mit löslichen Stoffen, wie zum Beispiel Proteine oder Phenol. Wenn der Quotient der Messung (260 nm-Wert/230 nm-Wert) unter 2 liegt, spricht dies für eine Kontamination mit z. B. gelösten Salzen.

### 3.2.1.8.3 Microarray-Hybridisierung und -Signalauswertung

Die **Erst- und Zweitstrangsynthese** erfolgte unter Verwendung des „MessageAMP<sup>®</sup> II-Biotin Enhanced Kit“ nach Herstellerangaben („Instruction manual, AMI1791“). Die extrahierte RNA wird zunächst in einzelsträngige cDNA umgeschrieben und ein komplementärer cDNA-Strang synthetisiert. Es folgt die Umschreibung der cDNA in biotinylierte „antisense“-RNA, die komplementär zu den auf dem Chip aufgebrachtten „perfect match“ Oligonukleotiden ist.

Für die **Erststrang-cDNA-Synthese** wurde das Volumenäquivalent von 600 ng Gesamt-RNA mit dem T7-(dT)<sub>24</sub>-Primer versetzt und mit Ribonuklease-freiem Wasser bis auf 12 µl aufgefüllt. Es folgte die Zugabe der RNA-Kontroll-Spikes (Ambion) und eine Inkubation für 10 min bei 70°C. Dem Ansatz wurden 8 µl des Mastermixes Nr. 1 zugefügt. Der Reaktionsansatz wurde 2 h bei 42°C inkubiert. Zur **Zweitstrangsynthese** wurden 80 µl des Mastermixes Nr. 2 zugesetzt und die Inkubation erfolgte für 2 h bei 16°C. Die **Aufreinigung der cDNA** erfolgte nach Herstellerangaben (MessageAMP<sup>®</sup> II-Biotin Enhanced Kit). Die Transkription der dsDNA in **biotinmarkierte antisense RNA (aRNA)** wurde mit 20 µl des Mastermix Nr. 3 durchgeführt und es wurde für 16 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 60 µl Ribonuklease-freiem Wasser abgestoppt. Zur Abtrennung von Proteinen und anderen Verunreinigungen wurde eine **aRNA Aufreinigung** auf den Präparationssäulen des „MessageAMP<sup>®</sup> II-Biotin Enhanced Kit“ durchgeführt.

**Zur Fragmentierung** wurden 12,5 µl eines fünffach Fragmentierungspuffers pro Reaktionsansatz zugesetzt und bei 94°C für 35 min inkubiert, auf Eis abgekühlt und kurz an zentrifugiert.

Zur Erstellung des **Hybridisierungsmixes** wurde dem cRNA-Fragmentierungsansatz RNase-freies Wasser, zweifach Hybridisierungspuffer, 1 % azetyliertes Bovines Serumalbumin, 1 % Heringssperma DNA (10 mg/ml), 1 % B2-Oligo (biotinyliertes Oligonukleotid zur Darstellung von Randfeldern und Kontrollfeldern) zugefügt.

Die Anlagerung der fragmentierten und biotinmarkierten cRNA wurde im „GeneChip® Hybridisation Oven 640“ für 16 h bei 45°C und 60 U/min durchgeführt.

Anschließend folgten die Wasch- und Färbeschritte unter Verwendung der „Affymetrix Fluidic Station 450“ (stringenter und nichtstringenter Waschpuffer, Färbelösungen Nr. 1-3). Zur Signalverstärkung wurde die Bindung des R-Phycoerythrin Streptavidin (Färbelösung Nr. 1) an der biotinylierten cRNA mittels biotinyliertem Antistreptavidin-Antikörper (Färbelösung Nr. 2) amplifiziert, gefolgt von einem Streptavidinphycoerythrin-Konjugat (Färbelösung Nr. 3). Die Microarrays wurden im „GeneChip® Scanner“ (Hewlett Packard, Affymetrix) mit einer Auflösung von 1,56 micron ausgelesen.

Die **Datenanalyse** erfolgte mit Hilfe von „Microarray Suite statistical algorithm“ (MAS 5.0 Affymetrix) unter Verwendung der „GeneChip® Operating Software“ (GCOS 1.4) und dem „Data Mining Tool 3.1“. Nach einer Einzelarrayanalyse folgte eine vergleichende Analyse zwischen Microarrays von infizierten und nicht infizierten Zellen.

Grundsätzlich ist auf dem Microarray für jedes Gen ein Sondensatz aufgebracht, der aus elf Sondenpaaren besteht. Jedes Sondenpaar setzt sich zusammen aus einer „perfect match“ Sonde (PM), die der Sequenz des gesuchten Transkriptes entspricht. Daneben gibt es eine „mismatch“ Sonde (MM), bei der das 13. Nukleotid ausgetauscht wurde, um Kreuzhybridisierungen aufzudecken. Auf der Basis der Signalintensität nach der Hybridierung mit den Sondenpaaren wird für den Sondensatz eines Gens ein „detection call“, ein „detection p-value“ und ein Signalwert ermittelt.

Zur Datenanalyse erfolgte der Vergleich der Sondenpaare PM mit MM. Unterschiedlich die Signalintensität eines Sondenpaares nicht, wurde dieses Paar nicht in die

Berechnung mit einbezogen und somit eine Kreuzhybridisierung ausgeschlossen. Unterschieden sich die Signalintensitäten von PM und MM, wurde die statistische Signifikanz dieses Unterschiedes als „**detection p-value**“ mit Hilfe des Wilcoxon-Tests berechnet.

Die weitere Analyse führte schließlich zum „**detection call**“. Festgelegte Grenzwerte der „detection p-values“ definierten, ob ein Transkript vorlag („present“,  $p < 0,05$ ) oder nicht („absent“,  $p > 0,065$ ).

Die Berechnung des **Signalwertes** des Sondenatzes aus den Signalintensitäten der Sondenpaare erfolgte mit Hilfe der „One-Step Tukey’s Biweight“- Methode, wobei das Signal ein relatives Maß der Häufigkeit des Transkripts in der Probe ist.

Im Anschluss folgte die vergleichende Microarrayanalyse analog zur Einzelarrayanalyse. Hier wurde der Expressionsunterschied für jeden Sondenatz als Signalwert in Form einer **Signal Ratio ( $\log_2$ )** berechnet, die die Signalintensität nicht infizierter Zellen zur Signalintensität infizierter Zellen ins Verhältnis setzt.

Der „**change p-value**“ wurde, wie zuvor der „detection p-value“, mit dem Wilcoxon-Test berechnet. Auch hier lagen Grenzwerte für die ermittelten „p-values“ vor, die die folgenden „**change calls**“ festlegten:

- „Increase“ (I) = vermehrt exprimiert
- „Marginal increase“ (MI) = grenzwertig vermehrt exprimiert
- „No change“ (NC) = keine Regulation der Expression
- „Marginal decrease“ (MD) = grenzwertig vermindert exprimiert
- „Decrease“ (D) = vermindert exprimiert

Die **Signal Ratio ( $\log_2$ )** kann in den empirischen Wert „fold change“ nach folgender Formel umgerechnet werden:

$$\begin{aligned} \text{Fold change} &= 2^{\text{Signal Ratio } (\log_2)} && \text{wenn Signal Ratio } (\log_2) \geq 0 \\ \text{Fold change} &= (-1) \times 2^{(-1 \times \text{Signal Ratio } (\log_2))} && \text{wenn Signal Ratio } (\log_2) \leq 0 \end{aligned}$$

Die **Qualitätsparameter** wurden mit Hilfe der „Software GCOS 1.4“ für jeden Microarray berechnet und nach dem Leitfaden „Gene Chip Expression Analysis“ (Affymetrix) beurteilt. Das sogenannte **Rauschen** (Raw Q) beschreibt die Pixel-zu-Pixel Variation von einer Zelle des Chips. Ursache für ein „starkes Rauschen“ ist zum einen eine schlechte Probenqualität oder „technisches Rauschen“ bedingt durch den Scanner. Grundsätzlich werden Rauschsignale in einem Bereich von 1,5 bis 3,0 akzeptiert (QA/QC for Affymetrix array data, Terry Speed, Affymetrix User Group Meeting Mai 2004, New York, nicht publiziert).

Darüber hinaus wird der **prozentuale Anteil der „present calls“** jedes Microarrays bestimmt. Dadurch kann eine Aussage zur Nachweisverlässlichkeit des Gens gemacht werden. Insbesondere wenn die Signalintensitäten generell gering (Microarray erscheint „dunkler“) vorliegen, also in Richtung Rauschgrenze verschoben sind, werden weniger Gene verlässlich nachgewiesen. Über den Anteil der „present calls“ ist folglich eine Aussage über die Qualität des Experimentes innerhalb eines Datensatzes möglich.

Weiterhin wird für eine Vergleichbarkeit von Microarrays der Skalierungsfaktor beurteilt. Dieser Faktor dient der Anpassung der Signalintensitäten der zu vergleichenden Microarrays. Eine Differenz des Skalierungsfaktors von mehr als 3,0 deutet auf signifikante Unterschiede zwischen den Microarrays hin, so dass die Ergebnisse mit besonderer Vorsicht zu interpretieren sind.

### **Normalisierung**

Um Unterschiede nicht-biologischen Ursprungs zwischen den Signalen zu minimieren, wurde eine lineare Normalisierung durchgeführt, bei der die Microarrays auf eine vorgewählte Durchschnittsintensität eingestellt wurden. Die Erstellung eines Streudiagramms erleichtert die Entscheidungsfindung, welche Normalisierungsstrategie für die Datensätze sinnvoll ist. Die Anwendung einer linearen Normalisierung ist dann geeignet, wenn die meisten Gene unverändert sind. Darüber hinaus sollten möglichst gleich viele Gene verstärkt und vermindert exprimiert vorliegen. Ist dieses ausgeglichene Verhältnis nicht gegeben, nimmt die Punktwolke im Streudiagramm eine sogenannte „Bananenform“ an. Es wurde eine lineare Normalisierung mit einer Zielintensität von 500 durchgeführt.

#### 3.2.1.8.4 Statistische Auswertung und Filterbedingungen

Die statistische Auswertung der Einzelarrays und der Vergleich zwischen infizierten und nicht infizierten Expressionsprofilen erfolgte mit Hilfe der MAS 5.0 nach den Angaben des „Statistical Algorithms Reference Guide“.

Für die Kandidatengene lagen folgende Filterbedingungen zu Grunde:

- Die Kriterien der MAS 5.0 Analyse waren erfüllt
- In allen paarweisen Microarrayvergleichen (infiziert *versus* nicht infiziert) wiesen die Gene einen erhöhten („increase call“) oder erniedrigten („decrease call“) „detection call“ auf.

Des Weiteren wurden für die Analysen mit Hilfe der Datenbanken „Gene Ontology“ (GO) und „Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes“ (KEGG) weitere Kriterien festgelegt:

- Ein Gen wurde als signifikant reguliert definiert, wenn der „change p-value“ des Wilcoxon-Testes bei erhöhten Expressionen  $p < 0,001$ , bei erniedrigt exprimierten Genen  $p > 0,999$  war.

#### 3.2.1.8.5 GO-Analyse

Bei der „Gene Ontology überrepräsentierten Analyse“ (kurz: GO-Analyse) wird ein Datensatz differentiell exprimierter Gene daraufhin untersucht, ob die Gene statistisch signifikant gehäuft in bekannten Signalwegen vorkommen. Das Ziel ist hierbei einen Hinweis zu erhalten, welche Signalwege verstärkt beschriftet werden. Hierzu wurde die Statistik-Programmiersprache „R“ verwendet, deren Funktionsumfang durch „Bioconductor“ (Gentleman et al., 2004) erweitert wurde. „Bioconductor“ ist eine Software, die verschiedene Werkzeuge zur Analyse und Interpretation genomischer Daten bereithält. Zu diesen Werkzeugen gehören folgende Daten-Pakete:

- **Chicken.db**: Datenpaket zur Annotation des Hühnergenoms (vom 16.10.2009)
- **GOstats**: Datenpaket zur statistischen Analyse (21.4.2009 (Beissbarth und Speed, 2004))

Der Vergleich der regulierten Gene des Experimentes erfolgte mit der Kategorie der „Biologischen Prozesse“ der GO-Datenbank (GO 008150: „biological process“).

#### **3.2.1.8.6 Signalweganalyse**

Die Untersuchung der differentiell exprimierten Gene hinsichtlich ihrer Einordnung in den **Toll-like-Rezeptor Signalweg** und die **Blutgerinnungskaskade** erfolgte unter Verwendung von zwei gängigen Datenbanken: der „Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes“ (KEGG) und der GO-Datenbank.

#### **3.2.1.8.7 Endothelzellmarker und SOCS**

Endothelzellen lassen sich anhand von Markern charakterisieren. Garlanda und Dejana (1997) haben hierzu eine Übersicht veröffentlicht. Zu den wesentlich Markern zählen demnach: Faktor VIII, „platelet endothelial cell adhesion molecule 1“ (PECAM-1), Angiotensin-konvertierendes-Enzym, CDH5 oder „vascular endothelial cadherin“, CD34, ICAM-2, CD51 (Vitronectin Rezeptor), CD73 (NT5E, 5' Nukleotidase), CD36, Thrombomodulin, „angio-associated migratory cell protein“ (AAMP). Zu den induzierbaren Markern gehören unter anderem: ICAM-1, VCAM-1, E-selectin, P-selectin, „fms-related tyrosine kinase 1“ (Flt-1), „kinase insert domain receptor“, Tie-1, Tie-2, CD93 und Fibronectin 1. Die in den DF-1-Zellen regulierten Gene wurden mit den bekannten Endothelzellmarkern verglichen.

Schließlich wurden gezielt die regulierten Gene der „suppressor of cytokine signaling“ (SOCS) Familie gesucht. Zahlreiche Entzündungsmediatoren (IFN, Interleukine) induzieren die Expression von SOCS, die eine überschießende Immunantwort durch negative Regulation verhindern (Krebs und Hilten, 2001; Ilangumaran et al., 2004).

#### **3.2.1.8.8 Funktionelle Zuordnung der Gene**

Die funktionelle Auswertung der veränderten Gene basierte auf gängiger Literatur (Pubmed).

#### **3.2.1.9 Validierung der RNA-Expressionsanalyse mittels real-time RT-PCR**

Zur Validierung der Microarray Ergebnisse wurden die Proben der Zeitwerte 4 h, 6 h, und 7,5 h p. i. mittels real-time RT-PCR untersucht. Die Analyse erfolgte beispielhaft an einem erhöht exprimierten (TL1a) und einem vermindert exprimierten Gen (IFN $\alpha$ R1).

### **Kontrolle der RNA-Qualität mittels Bioanalyzer**

Zur erneuten Prüfung der RNA-Qualität diente das Bioanalyzer System von Agilent, wie beschrieben unter 3.2.1.8.2. Als Ausschlusskriterium für die Verwendung der RNA in der quantitativen PCR wurde eine RIN (RNA integrity number) von  $> 6,7$  festgelegt.

### **Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration und -Reinheit**

Die Bestimmung der RNA-Konzentration und -Reinheit wurde, wie unter 3.2.1.8.2 beschrieben, mit Hilfe des Spectrophotometers „NanoDrop“ unter Verwendung des „Agilent RNA 6000 Nano Kit“ (Agilent) durchgeführt.

### **cDNA-Synthese**

Die in der Gesamt-RNA enthaltene messenger-RNA (mRNA) wurde durch eine rekombinante aviäre reverse Transkriptase mittels „Superscript-III-System“ in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Diese cDNA diente als Matrize in der quantitativen Polymerasekettenreaktion (PCR). Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

### **Polymerasekettenreaktion**

Die real-time RT-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der PCR beruht und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde der interkalierende DNA-Farbstoff „SYBR-Green“ benutzt, dessen Fluoreszenzspektrum durch Einlagerung in doppelsträngige Nukleinsäuremoleküle verändert wird. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Bei der Verwendung von interkalierenden Farbstoffen muss eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden, um unspezifische Signale auszuschließen. Bei einer Schmelzkurvenanalyse wird die DNA aufgeschmolzen, indem die Temperatur kontinuierlich erhöht wird ( $57^{\circ}\text{C}$  bis  $95^{\circ}\text{C}$ ). Bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur wird der Doppelstrang wieder zu zwei einzelsträngigen Molekülen, wobei der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt und eine Fluoreszenzabnahme registriert wird. Die Schmelztemperatur eines Fragmentes kann visualisiert werden, indem die erste negative Ableitung dieser Schmelzkurve ( $-dF/dT$ ) berechnet wird. In einer Graphik dargestellt, resultiert der Wendepunkt der

Schmelzkurve dann in einem Peak, dessen Maximum dem der Schmelztemperatur ( $t_m$ , „temperature of melting“) entspricht. Da die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt hat als unspezifisch entstehende Primerdimere, ist eine Unterscheidung möglich.

Tab. 1: **Primersequenzen für die Validierung der RNA-Expressionsanalyse**

<b>18 S-rRNA</b>	
Primer 1	CATGTCTAAGTACACACGGGCGGTA
Primer 2	GGCGCTCGTCGGCATGTATTA
<b>TL1a</b>	
Primer 1	AAAGATGATGGGCAAGGCTGTA
Primer 2	GTGCCTGAGCCATACCTTTTG
<b>IFN<math>\alpha</math>R1</b>	
Primer 1	ACCCTCGACTTTGTACTGTGTGAAA
Primer 2	TGTTCCGATGCATTCCTCTCT

Unter Verwendung des „Superscript® III OneStep RT-PCR Kit“ wurden je Probe 5  $\mu$ l als Vorlage in folgendem Ansatz amplifiziert:

Tab. 2: **Zusammensetzung des „Master Mix“ für die real-time RT-PCR**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
Proben cDNA	1,0 $\mu$ l
Rnase-freies Wasser	8,5 $\mu$ l
SYBR-Green Mastermix	12,5 $\mu$ l
Primer 1: 18S oder TL1a oder IFN $\alpha$ R1	1,5 $\mu$ l
Primer 2: 18S oder TL1a oder IFN $\alpha$ R1	1,5 $\mu$ l
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25,0 <math>\mu</math>l</b>

Jede Probe wurde zweifach untersucht und für jedes untersuchte Gen eine Negativkontrolle mitgeführt. Für diese Methode wurde das 7300 Real-Time PCR System von Applied Biosystems verwendet. Die Primer wurden in einer Konzentration von 5 pmol pro  $\mu$ l eingesetzt. Die real-time RT-PCR wurde mit 40 Zyklen unter folgendem Temperaturprofil durchgeführt und ausgelesen:

Tab. 3: Temperaturprofil für die real-time RT-PCR

Temperaturprofil				
Phase 1	Aktivierung der Taq-Polymerase		95°C	15 min
Phase 2	Denaturierung	40 x	94°C	30 s
	Anlagerung		59°C	30 s
	Verlängerung		72°C	30 s
Phase 3	Dissoziationskurve		95°C	15 s
			57°C	30 s
			95°C	15 s

### Auswertung

Ein exponentieller Anstieg der Amplifikatmenge findet in der zweiten Phase statt, in der sich die PCR-Produktmenge bei jedem Zyklus verdoppelt. Die Zunahme des Fluoreszenzsignals ist proportional zur Zunahme der PCR-Produkte. Der Zyklus, in dem eine zu untersuchende Probe den Fluoreszenzschwellenwert überschreitet, wird als Schwellenwertzyklus („Threshold Cycle“, ct) bezeichnet. Die Berechnung der Expressionsunterschiede wurde nach der „ $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode“ durchgeführt (Livak und Schmittgen, 2001). Um die Expressionsunterschiede zu ermitteln, wurden zunächst die Mittelwerte (MW) der ct-Werte der Doppeluntersuchungen jeder Probe berechnet (MWct). Anschließend erfolgte die Korrektur der Mittelwerte um die ct-Werte des Referenzgens 18-S-rRNA. Zu jeder Probe eines Zeitpunktes liegt damit ein „ $\Delta\text{ct}$ “ vor. Aus den drei Proben eines Zeitwertes wurde wiederum der Mittelwert ermittelt (MW $\Delta\text{ct}$ ). Nun konnten die Schwellenwertunterschiede ( $\Delta\Delta\text{ct}$ ) berechnet werden:

$$\Delta\Delta\text{ct} = (\text{MW } \Delta\text{ct infiziert}) - (\text{MW } \Delta\text{ct nicht infiziert})$$

Der Expressionsunterschied („fold change“, FC) wird berechnet mit der Formel

$$\begin{aligned} \text{FC} &= 2^{-\Delta\Delta\text{CT}} && \text{für } \Delta\Delta\text{CT} < 0 \\ \text{FC} &= 1/(2^{\Delta\Delta\text{CT}}) && \text{für } \Delta\Delta\text{CT} > 0 \end{aligned}$$

Die Validierung der RNA-Expressionsanalyse mittels real-time RT-PCR erfolgte im Labor von Prof. Dr. med. vet. Bernd Kaspers durch Frau Ute Breithaupt unter der Leitung von Frau Dr. Sonja Härtle.

### **3.2.2 Methoden der morphologischen Untersuchung zur Pathogenese von HPAIV-Infektionen**

#### **3.2.2.1 Tierversuche**

Das Forschungs-Sofortprogramm Influenza (FSI) des Bundes sollte relevante Wissenslücken zur H5N1-Geflügelpest und zur Pandemiegefahr schließen. Die morphologische Untersuchung ausgewählter, experimentell HPAIV-infizierter Säuger- und Vogelarten erfolgte in Zusammenarbeit mit zahlreichen Projektpartnern. Neben Vakzinestudien (Hühner) wurden Pathogenesestudien zur Beurteilung der epidemiologischen Bedeutung von Katzen, Schwänen und Sperlingsvögeln und zur Rolle der Virus- und Wirtsfaktoren bei der Krankheitsentwicklung (Hühner, Mäuse, Entenspezies) durchgeführt. Die Tierversuchsgenehmigungsnummern zu den in Tab. 4 aufgeführten Tierversuchen sind der Tabellenlegende zu entnehmen.

Tab. 4: **Übersicht zu den durchgeführten und pathomorphologisch ausgewerteten Tierversuchen**

Tierart	Alter	Anzahl Tiere	Virusisolat	Infektionsweg	Dosis
Mäuse*, BALBc	6 Wo	5	R65/06	okulo-oro-nasal	10 <sup>6</sup> EID <sub>50</sub>
		5	R1959/07		
		5	R1372/07		
Katzen <sup>#</sup>	3-4 Mo	2	R606/06	oral (Kapsel)	10 <sup>7</sup> EID <sub>50</sub>
		2		okulo-oro-nasal	10 <sup>6</sup> EID <sub>50</sub>
		2		intravenös	10 <sup>6</sup> EID <sub>50</sub>
Hühner <sup>§</sup>	4 Wo	20	R65/06	intratracheal	100 LD <sub>50</sub>
	7 Wo	5	TG24-01/05	okulo-nasal	10 <sup>6</sup> EID <sub>50</sub>
	6-8 Wo	10	445/99 (H7N1)	okulo-nasal	10 <sup>7,8</sup> EID <sub>50</sub>
Höckerschwäne*	adult	5	R65/06	okulo-oro-nasal	10 <sup>4</sup> EID <sub>50</sub>
		5			10 <sup>6</sup> EID <sub>50</sub>
Moschusenten*	3 Wo	20	R65/06	okulo-oro-nasal	10 <sup>6</sup> EID <sub>50</sub>
Pekingenten*		20	und		
Stockenten*		16	TG24-01/05		
Schwarzkehlchen*	adult	23	R65/06	okulo-oro-nasal	10 <sup>6</sup> EID <sub>50</sub>
Mönchsgrasmücken*	adult	6	R65/06	okulo-oro-nasal	10 <sup>4</sup> EID <sub>50</sub>
		5			10 <sup>6</sup> EID <sub>50</sub>
Blutschnabelweber*	adult	11	R65/06	okulo-oro-nasal	10 <sup>4</sup> EID <sub>50</sub>
		11			10 <sup>6</sup> EID <sub>50</sub>

<sup>#</sup>LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-044/06

<sup>§</sup>LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-018/07

\*LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-003/07

### **3.2.2.2 Experimentelle Infektion von Peking-, Moschus- und Stockenten**

Nach einer 24-stündigen Akklimatisierungsphase erfolgte die okulo-oro-nasale Inokulation mit einer Infektionsdosis von  $10^6$  KID<sub>50</sub> pro Tier. Je zehn Peking- und Moschusenten und acht Stockenten erhielten TG24-01/05 oder R65/06 in 100 µl ZB5 Kulturmedium. Die Enten wurden täglich klinisch beurteilt und Kloaken- sowie Rachentupferproben entnommen. Tiere, die moribund erkrankt waren oder zentralnervöse Symptome (Ataxie, Tremor) zeigten, wurden unter Vollnarkose (Isofluran) durch Blutentzug getötet. Darüber hinaus wurden vier Tage nach der Infektion die Hälfte der Tiere je Gruppe unter Vollnarkose durch Blutentzug getötet. Von jeder Spezies dienten zwei Tiere als nicht infizierte Kontrollen. Die Probenentnahme und –aufarbeitung zur pathohistologischen Untersuchung erfolgte wie unter 3.1.2 und 3.2.2.3 bis 3.2.2.6 beschrieben.

#### **3.2.2.2.1 RNA-Präparation aus Kloaken- und Rachentupferproben**

Die Tupfer wurden für 30 min in 2 ml Tupfermedium bei 280 U/min geschüttelt (IKA Ks 260), in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert. Ein Aliquot von 150 µl wurde in 650 µl RAV1-Puffer zur RNA-Isolation überführt. Die Extraktion erfolgte mit dem „Freedom EVO“ (Tecan) unter Verwendung des „Viral DNA/RNA Isolation User Manual“ (Januar 2008, Rev.02) mit dem „NucleoSpin<sup>®</sup> 96 Virus Kit“.

#### **3.2.2.2.2 RNA-Präparation aus Organproben**

Von den Organen Lunge, Zäkaltonsille und Gehirn wurden ca. erbsengroße Organproben in 1 ml Organmedium mit einer Stahlkugel für 3 min bei einer Frequenz von 3000 lysiert (Tissue Lyzer, Qiagen), in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert. Ein Aliquot von 100 µl wurde in 500 µl RL-Puffer zur RNA-Isolation überführt. Die Extraktion erfolgte wie unter 3.2.2.2.1 beschrieben.

#### **3.2.2.2.3 Nachweis viraler RNA mittels real-time RT-PCR**

Der Nachweis von AIV-RNA erfolgte durch H5-Gen- und N1-Gen-spezifische Sequenzen. Die publizierten Primersequenzen (Spackman et al., 2002) wurden durch das Europäische Referenzlabor in Weybridge modifiziert (Tab. 5), das N1 System ist eine Eigenentwicklung des Friedrich-Loeffler-Institutes (Dr. Bernd Hoffmann, Tab. 6). Stets wurden eine Negativkontrolle und eine Positivkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle wurde eine stark verdünnte AIV-RNA (R65/06) eingesetzt, um

Kontaminationen zu vermeiden. Die Herstellung der Primer-Sonden-Kombination erfolgte nach folgendem Ansatz:

Tab. 5: **Primersequenzen für den Nachweis von AIV-RNA (H5-Gen)**

<b>AIV-H5.1-Mix-HEX</b> (modifiziert nach Spackman et al., 2002)		
Primer 1	5'-ACA TAT GAC TAC CCA CAR TAT TCA G-3'	2000 pmol
Primer 2	5'-AGA CCA GCT AYC ATG ATT GC-3'	2000 pmol
Sonde	5'-HEX-TCA ACA GTG GCG AGT TCC CTA GCA- BHQ1-3'	250 pmol
0,1 x TE (pH 8,0)/200 µl		

Tab. 6: **Primersequenzen für den Nachweis von AIV-RNA (N1-Gen)**

<b>AIV-N1-3-Mix-FAM</b> (modifiziert nach Spackmann et al., 2002)		
Primer 1	5'-AGR CCT TGY TTC TGG GTT GA -3'	2500 pmol
Primer 2	5'-ACC GTC TGG CCA AGA CCA-3'	2500 pmol
Sonde	5'-FAM-ATY TGG ACY AGT GGG AGC AGC AT - TAMRA-3'	300 pmol
0,1 x TE (pH 8,0)/200 µl		

Die verwendeten Sonden sind an ihrem 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff und am 3'-Ende mit einem Fluoreszenzdämpfer („quencher“) markiert. Im Zuge der Gegenstrangsynthese baut die Taq-Polymerase das 5'-Ende der Sonde ab, wodurch der Abstand des Fluoreszenzdämpfers zum Reporterfarbstoff zunimmt und damit ein Reportersignal ermöglicht wird. Die Zunahme des Fluoreszenzsignals ist proportional zur Zunahme der PCR-Produkte. Die Messung erfolgte in der Anlagerungsphase.

Unter Verwendung des „Superscript® III OneStep RT-PCR Kit“ wurden je Probe 5 µl als Vorlage in folgendem Ansatz amplifiziert:

Tab. 7: **Zusammensetzung des „Master Mix“ für den Nachweis von AIV-RNA**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
Proben RNA, NK, PK	5,0 µl
Rnase-freies Wasser	2,5 µl
2 x Reaktions-Mix	12,5 µl
Enzym Mix	1,0 µl
Primer Sonden Mix: <b>AIV-H5.1-Mix-HEX</b>	2,0 µl
Primer Sonden Mix: <b>AIV-N1-3-Mix-FAM</b>	2,0 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25,0 µl</b>

Im MX3000p real-time RT-PCR System (Stratagene) wurde die real-time RT-PCR mit 42 Zyklen unter folgendem Temperaturprofil durchgeführt und ausgelesen:

Tab. 8: **Temperaturprofil für den Nachweis von AIV-RNA**

<b>Temperaturprofil</b>			
Reverse Transkription		50°C	30 min
Inaktivierung Reverse Transkriptase, Aktivierung Taq-Polymerase		94°C	2 min
Denaturierung	x 42	94°C	30 s
Anlagerung		56°C	30 s
Verlängerung		68°C	30 s

Die Auswertung erfolgte mit der MxPro QPCR-Software (Stratagene). Die **Organprobe** wurde als positiv bewertet, wenn der Signalschwellenwert vor Ablauf von 32 Zyklen überschritten wurde (Schwellenwertzyklus, ct < 32). Eine **Tupferprobe** wurde als positiv bewertet, wenn der Schwellenwert vor Ablauf von 35 Zyklen überschritten wurde. Die RNA-Extraktion und real-time RT-PCR wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dipl. Chem. Günter Strebelow und Mareen Grawe durchgeführt.

#### **3.2.2.2.4 Bestimmung der KID<sub>50</sub> aus Organproben**

Die Bestimmung der KID<sub>50</sub> aus den Organen Lunge, Zäkaltonsille und Gehirn erfolgte wie in 3.2.1.5 beschrieben.

### **3.2.2.3 Organentnahme, Gewebefixierung und Einbettung**

Die Organproben nach 3.1.2 wurden für 24 h in 4 % Formaldehydlösung fixiert. Es schloss sich über weitere 24 h eine Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Iso-Propanol 50 %, 70 %, 80 %, 96 %, 100 %, Roti<sup>®</sup>-Histol) und die Einbettung in Paraffin-HistoSec<sup>®</sup> an. Mittels Schlittenmikrotom wurden Schnitte von 2-4 µm Dicke angefertigt, im Streckbad bei 40°C geglättet, auf SuperFrost<sup>®</sup> oder SuperFrost<sup>®</sup> Plus Objektträger aufgezogen und für 8 h bei 40°C luftgetrocknet.

### **3.2.2.4 Hämalaun-Eosin-Färbung**

Als Übersichtsfärbung fand die Hämalaun-Eosin-Färbung (HE) nach folgendem Protokoll Anwendung:

1. Entparaffinieren der Schnitte in Xylol und n-Propanol für je 2 x 5 min
2. Rehydrieren der Schnitte in absteigender n-Propanolreihe (96 %, 80 %, 70 %, 50 %) für je 3 min
3. Spülen in Aqua dest. für 3 min
4. Färben in Hämalaun nach Mayer für 13 min
5. Bläuen in fließendem Leitungswasser für 10 min
6. Färben in Eosin/Phloxin für 2 min und kurzes Spülen in Aqua dest.
7. Kurzes Spülen mit 70 %, 80 %, 90 % 1-Propanol
8. Spülen in 1-Propanol für 2 x 1 min und in Xylol für 2 x 5 min
9. Eindecken mit Corbit-Balsam (Eukitt<sup>®</sup>)

### **3.2.2.5 Immunhistologische Untersuchungen**

Der Nachweis von Infuenza A NP Antigen im Paraffinschnitt wurde mit der ABC-Methode durchgeführt. Die Paraffinschnitte wurden hierfür auf SuperFrost<sup>®</sup> Plus Objektträger aufgezogen. Die Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur.

1. Entparaffinieren der Schnitte in Xylol und n-Propanol für je 2 x 5 min
2. Eintauchen in n-Propanol (96 %) für 2 x 3 min
3. Blockieren der endogenen Peroxidasen in 90 % Methanol und 3 % Wasserstoffperoxid für 10 min
4. Rehydrieren in absteigender n-Propanolreihe (80 %, 70 %, 50 %) für je 3 min

5. Spülen in Aqua dest. für 3 min
6. Antigendemaskierung: 10 min kochen in 10 mM Zitratpuffer (Mikrowelle, 600 W)
7. Spülen in TBS für 3 min
8. Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen mit unverdünntem Ziegennormalserum für 30 min
9. Absaugen des Ziegennormalserums
10. Inkubieren mit dem Primärantikörper Anti-Influenza-NP (polyklonales Kaninchenserum) für 60 min, Verdünnungen in TBS 1:750
11. Spülen in TBS für 3 x 3 min
12. Inkubieren mit dem biotinylierten sekundären Ziege-Anti-Kaninchen Antikörper für 30 min, Verdünnungen in TBS 1:200
13. Spülen in TBS für 3 x 3 min
14. Inkubieren mit dem ABC-Komplex für 30 min. Hierzu wurden die beiden Komponenten Avidin DH und biotinylierte Meerrettichperoxidase 30 min vor Gebrauch nach Herstellerangaben in TBS angesetzt.
15. Spülen in TBS für 3 x 3 min
16. Inkubieren mit AEC unter Sichtkontrolle bis zur Signalentwicklung (maximal 10 min)
17. Färben mit Hämalaun nach Mayer für 2 min
18. Bläuen unter fließendem Leitungswasser für 10 min
19. Eindecken mit Aquatex<sup>®</sup>

### **3.2.2.6 Vorgehensweise bei der Auswertung**

Die Beurteilung der Organproben nach immunhistochemischer Untersuchung erfolgte schematisch gemäß Abb. 5 bis Abb. 7.

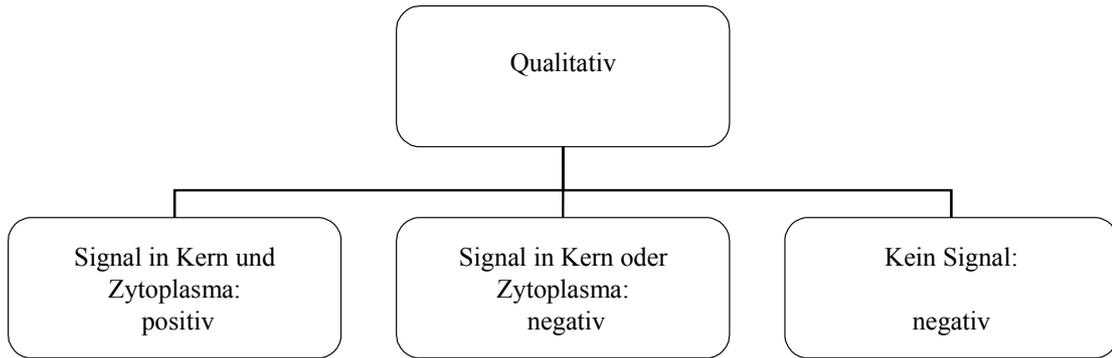


Abb. 5: **Entscheidungsbaum zur qualitativen Beurteilung nach immunhistochemischer Untersuchung von Organproben HPAIV-infizierter Tiere.** Voraussetzung für die positive Befundung war der Nachweis von NP im Zellkern und im Zytoplasma als Hinweis für ein fortgeschrittenes Infektionsstadium (Patterson et al., 1988).

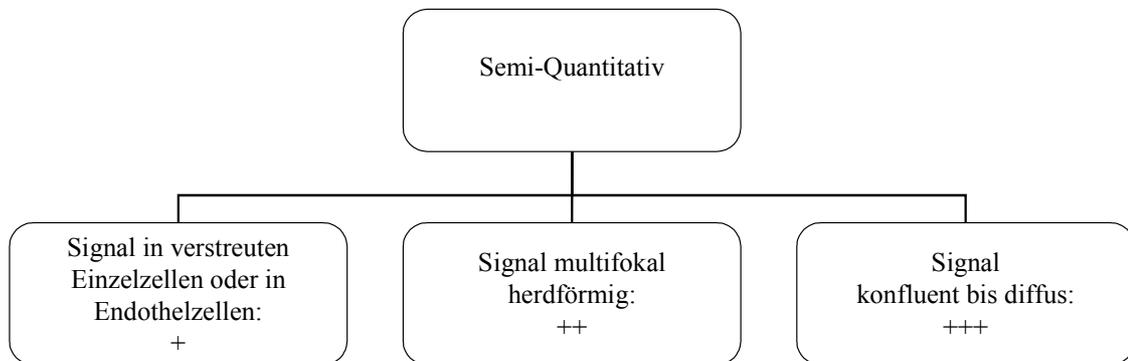


Abb. 6: **Entscheidungsbaum zur semi-quantitativen Beurteilung nach immunhistochemischer Untersuchung.** Beurteilt wurde der gesamte Gewebeschnitt. Signale in verbindungslosen Einzelzellen wurden mit „+“ und Signale in Herden von Zellen mit „++“ gekennzeichnet. Verschmolzen mehrere Antigenherde oder lag ein diffuser Antigennachweis vor, wurde das Organ mit „+++“ bewertet. Die Beurteilung des Endotheltropismus erfolgte stets mit „+“, um der stärkeren Gewichtung des Organparenchyms Rechnung zu tragen.

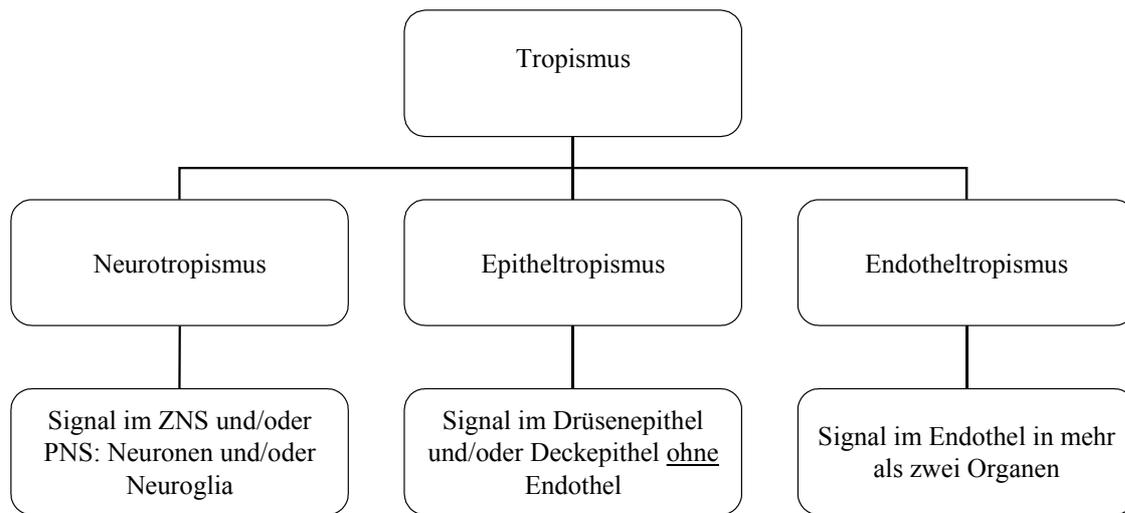


Abb. 7: Entscheidungsbaum zur Klassifikation des viralen Gewebetropismus nach immunhistochemischer Untersuchung.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Funktionelle Untersuchungen zur Pathogenese von HPAIV-Infektionen

#### 4.1.1 Vermehrung von R65/06 auf DF-1 und MDCK-2-Zellen

Das Isolat Influenza A/swan/Germany/R65/2006 H5N1 (R65/06) wurde für die Genexpressionsanalyse zunächst auf MDCK-2-Zellen und DF-1 Zellen vermehrt. Die Ergebnisse sind in Tab. 9 zusammengefasst. Abb. 8 dient der Darstellung der plaquebildenden Einheiten (PBE) eines Plaquetest auf DF-1-Zellen zur Bestimmung der Viruskonzentration.

Tab. 9: **Virustiter von R65/06-infizierten DF-1 und MDCK-2-Zellen, 48 h p. i.** Zellkultur-infektiöse Dosis ( $KID_{50}$ ) und plaquebildende Einheiten (PBE)

DF-1		MDCK-2	
$KID_{50}/ml$	PBE/ml	$KID_{50}/ml$	PBE/ml
$1,07 \times 10^7$	$1,94 \times 10^7$	$6,48 \times 10^7$	$5,73 \times 10^7$

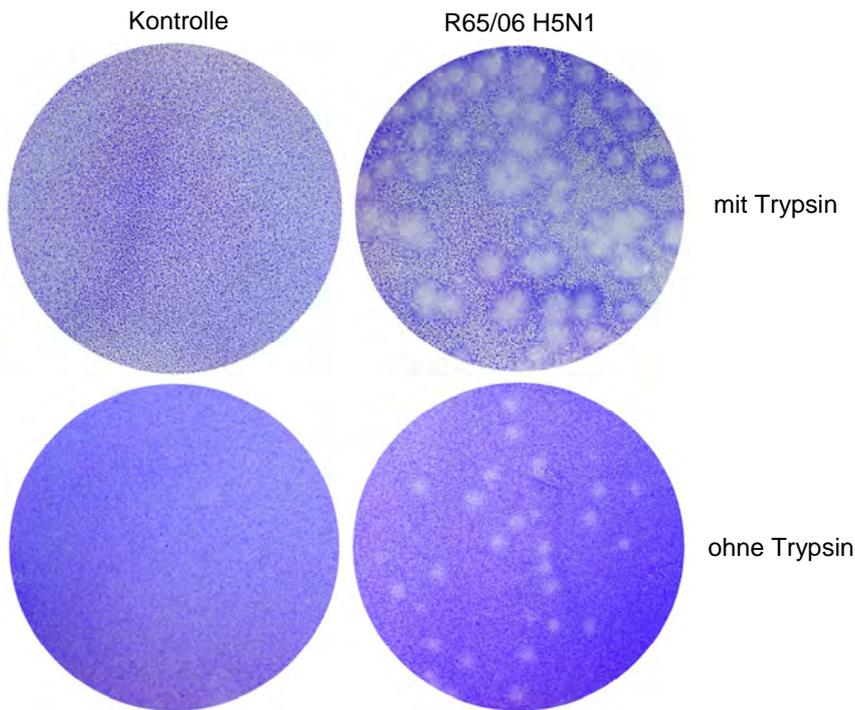


Abb. 8: **Plaquetest auf DF-1-Zellen zur Bestimmung der Viruskonzentration.** Nicht infizierte (Kontrolle) und infizierte DF-1-Zellen. Inkubation über einen Zeitraum von 72 h bei 37°C mit Trypsin (2 µg/ml) und ohne Trypsin. Nach Fixation und Färbung (Kristallviolett-Gebrauchslösung) stellen sich die Zellrasenlöcher (Plaques) farblos dar. Ohne Zugabe von Trypsin erreichten die Plaques einen Durchmesser von bis zu 2 mm, bei Zugabe von Trypsin bis zu 5 mm.

Zur Bestimmung der **Wachstumskinetik** wurden MDCK-2 bzw. DF-1-Zellen mit R65/06, wie unter 3.2.1.7 beschrieben, infiziert. Die Titer der Virusnachkommenschaft sind in Abb. 9 dargestellt.

Die Zelllinie MDCK-2 zeigte 24 Stunden p. i. einen ZPE. Die Ausdehnung des ZPE nahm fortwährend zu bis 56 Stunden p. i. ca. 65 % der Zellen betroffen waren. Nach 64 Stunden waren bereits ca. 70 %, nach 72 Stunden schließlich ca. 90 % der Zellen betroffen.

Die DF-1-Zellen wiesen nach 32 Stunden einen ZPE auf. Eine Steigerung auf ca. 75 % betroffener Zellen war 72 Stunden p. i. zu verzeichnen.

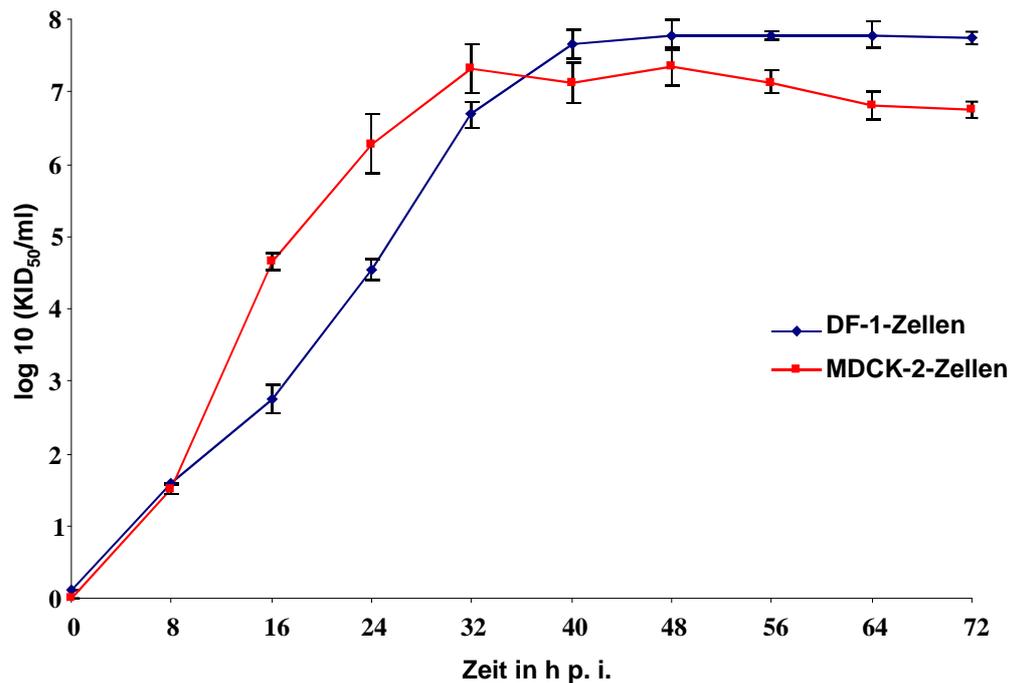


Abb. 9: **Wachstumskinetik.** Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Virustiter nach Infektion von MDCK-2- und DF-1-Zellen mit R65/06 ( $\text{MOI } 10^{-4}$ ). Die Titer der Virusnachkommenschaft wurden aus zwei unabhängigen Versuchen mittels  $\text{KID}_{50}$  in einer Doppelbestimmung zu den gegebenen Zeitpunkten ermittelt.

#### 4.1.2 Ergebnisse der Genexpressionsanalyse mittels Microarray-Technologie

Die Auswirkungen einer HPAIV-Infektion auf die Genexpression von kultivierten Hühnerfibroblasten wurden mittels Microarray-Technologie analysiert, wie unter 3.2.1.8 beschrieben.

##### 4.1.2.1 Bestimmung der RNA-Qualität und -Quantität

Der Grad der RNA-Integrität wird als „RNA integrity number“ (RIN) angegeben. Er lag bei allen Proben zwischen 9,7 und 10. Die RNA-Konzentrationen lagen zwischen 6,46 ng/ $\mu\text{l}$  bis 54,63 ng/ $\mu\text{l}$ .

##### 4.1.2.2 Qualitätskontrolle der Microarrays

Die Qualitätsparameter wurden wie unter 3.2.1.8.2 analysiert. Das Rauschsignal „Raw Q“ lag in allen Proben zwischen 1,27 und 1,84. Der prozentuale Anteil der „**present calls**“ jedes Microarrays wurde nach den Angaben der Expressionsreports berechnet und ist im Folgenden dargestellt (Abb. 10).

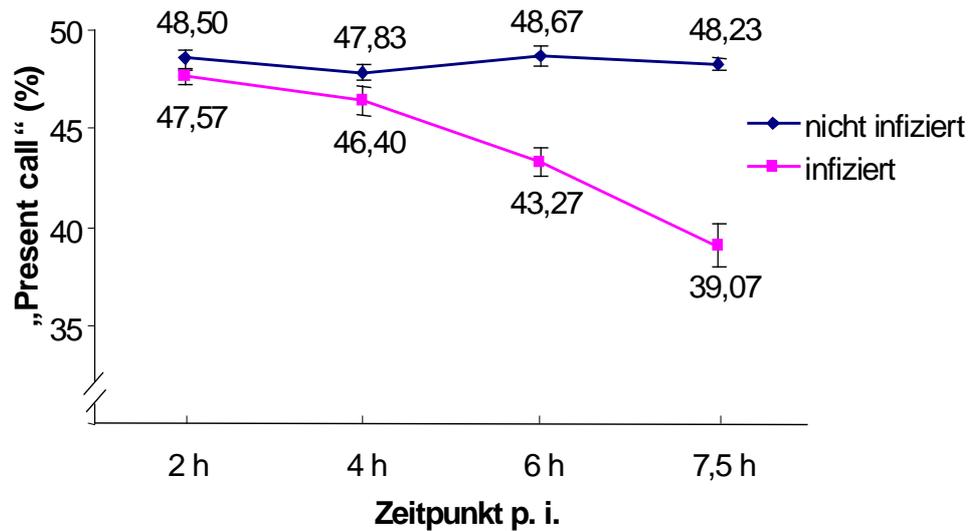


Abb. 10: „Present calls“ der 24 untersuchten Proben. Mittelwerte und Standardabweichungen der Probenreplikate zu den Zeitpunkten 2 h, 4 h, 6 h und 7,5 h p.i. Berechnung nach Expressionsreports (Software GCOS 1.4). In infizierten Proben nimmt der Anteil der „present calls“ ab, während der Anteil in nicht infizierten Proben konstant bleibt.

Die Berechnung des **Skalierungsfaktors** zur Abschätzung der Vergleichbarkeit der Microarrays zeigte, dass die Werte der nicht infizierten Proben stets unter 3 lagen. Der Skalierungsfaktor der infizierten Proben zu den Zeitpunkten 6 h und 7,5 h p. i. lag über 3,0 (Tab. 10).

Tab. 10: **Skalierungsfaktoren der 24 untersuchten Proben.** Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (in Klammern) der Triplikate. Die Berechnung erfolgte nach den Expressionsreports, die mit der Software GCOS 1.4 erstellt wurden.

Zeitpunkt p. i.	Skalierungsfaktor Mittelwert (Standardabweichung)	
	nicht infiziert	R65/06-infiziert
2 h	1,65 (0,07)	1,97 (0,11)
4 h	1,77 (0,04)	2,51 (0,17)
6 h	1,94 (0,1)	4,08 (0,32)
7,5 h	1,74 (0,27)	5,79 (0,71)

Das **Streudiagramm** erleichtert die Entscheidungsfindung, welche Normalisierungsstrategie für die Datensätze sinnvoll ist. Der Vergleich der Signalintensitäten einer R65/06-infizierten Probe erfolgte mit einer nicht infizierten Probe zu den Zeitpunkten 2 h, 4 h, 6 h und 7,5 h p. i. Jeder Punkt steht für die Signalintensität eines Sondensatzes. Die Diagonalen geben den „fold change“ (2fach, 10fach, 30fach) an (Abb. 11 C, D).

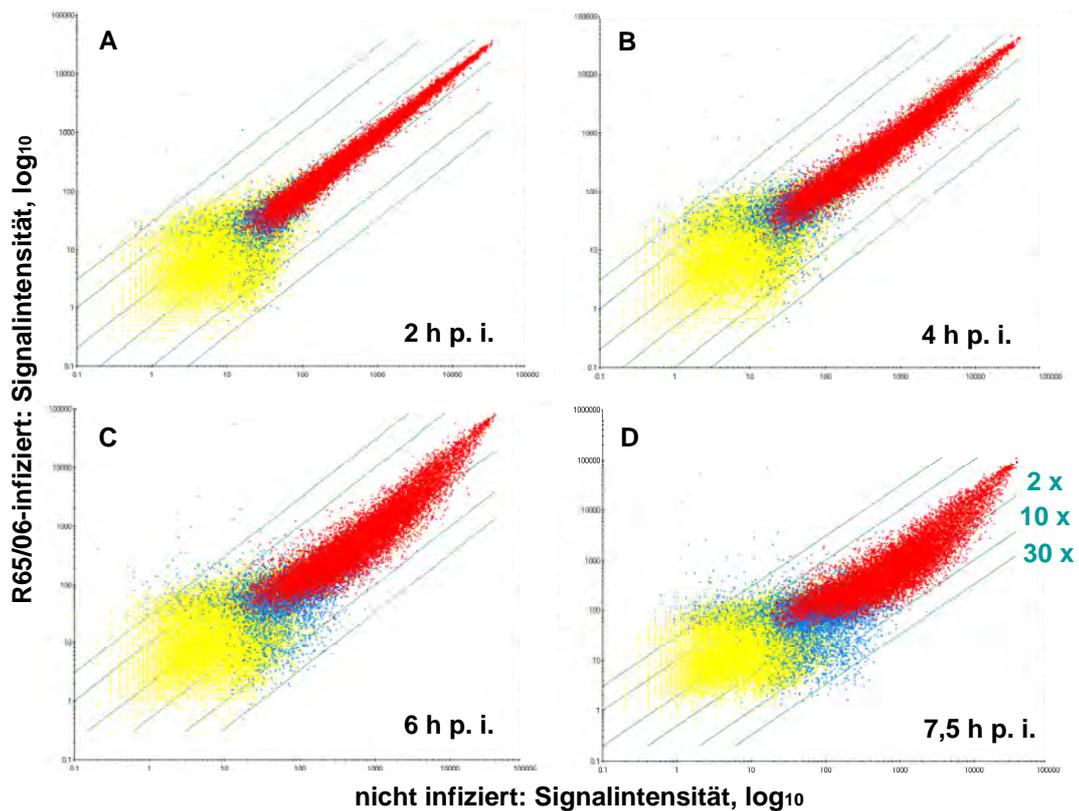


Abb. 11: **Streudiagramm.** Vergleich der Signalintensitäten einer R65/06-infizierten Probe (y-Achse, log<sub>10</sub>) mit einer nicht infizierten Probe (x-Achse, log<sub>10</sub>). Zeitpunkte: 2 h (A), 4 h (B), 6 h (C), 7,5 h (D, „Bananenform angedeutet“) p. i. Jeder Punkt steht für die Signalintensität eines Probensatzes. Die Diagonalen geben den „fold change“ an. **Rot:** Transkript liegt in beiden Probensätzen vor („present to present call“). **Blau:** Transkript liegt in einem Probensatz vor („present to absent call“ oder „absent to present call“). **Gelb:** Signalintensität liegt im „Rauschbereich“.

#### 4.1.2.3 Differenziell exprimierte Gene R65/06-infizierter DF-1-Zellen

Als differenziell exprimiert wurden Gene definiert, die die Kriterien der MAS 5.0 Analyse erfüllten. Darüber hinaus musste stets ein erhöhter („increase“) oder erniedrigter („decrease“) „detection call“ in allen paarweisen Microarray-Vergleichen (infiziert *versus* nicht infiziert) vorliegen. Im zeitlichen Verlauf stieg die Zahl der regulierten Gene von insgesamt 37 (2 h p. i.) auf 774 (4 h p. i.) an. 6 h p. i. waren 4366

Gene differentiell exprimiert und schließlich 4937 Gene zum Zeitpunkt 7,5 h p.i. Die Aufschlüsselung in erhöht und erniedrigt exprimierte Gene ist in Abb. 12 dargestellt.

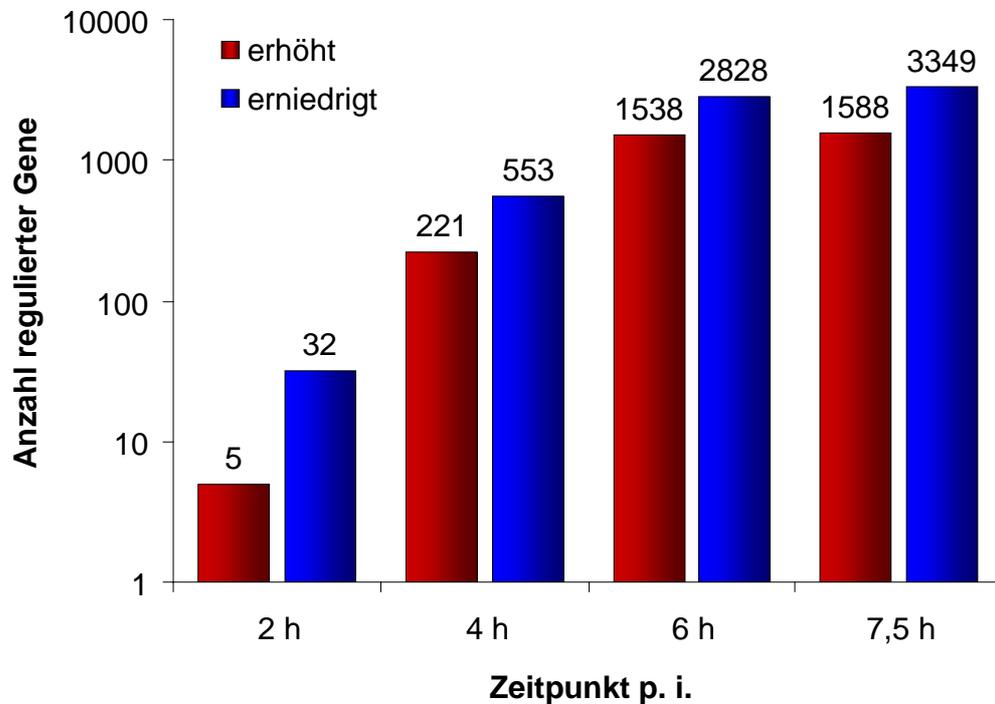


Abb. 12: **Anzahl differentiell regulierter Gene von R65/06-infizierten DF-1-Zellen.** 2 h, 4 h, 6 h und 7,5 h p. i. Es wurden ausschließlich Gene berücksichtigt, die in allen GeneChip<sup>®</sup>-Vergleichen stets erhöht oder erniedrigt exprimiert vorlagen.

Die Darstellung regulierter Gene in einem **Venn-Diagramm (Abb. 13 und Abb. 14)** ermöglicht die Betrachtung gemeinsam regulierter Gene zu den Untersuchungszeitpunkten in einer Schnittmenge.

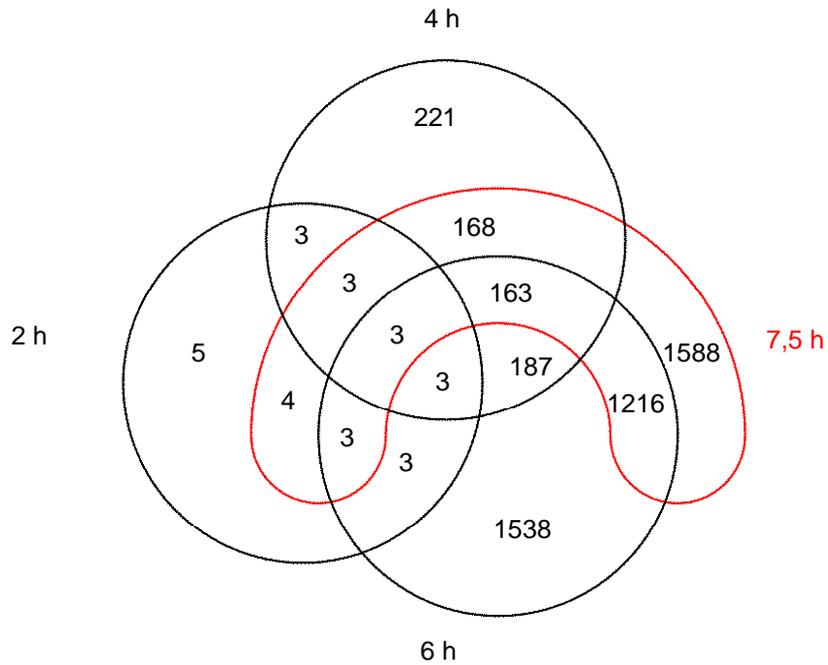


Abb. 13: **Venn-Diagramm. Anzahl der erhöht exprimierten Gene in R65/06-infizierten DF-1-Zellen.** Schnittmenge der regulierten Gene 2 h , 4 h , 6 h und 7,5 h p. i.

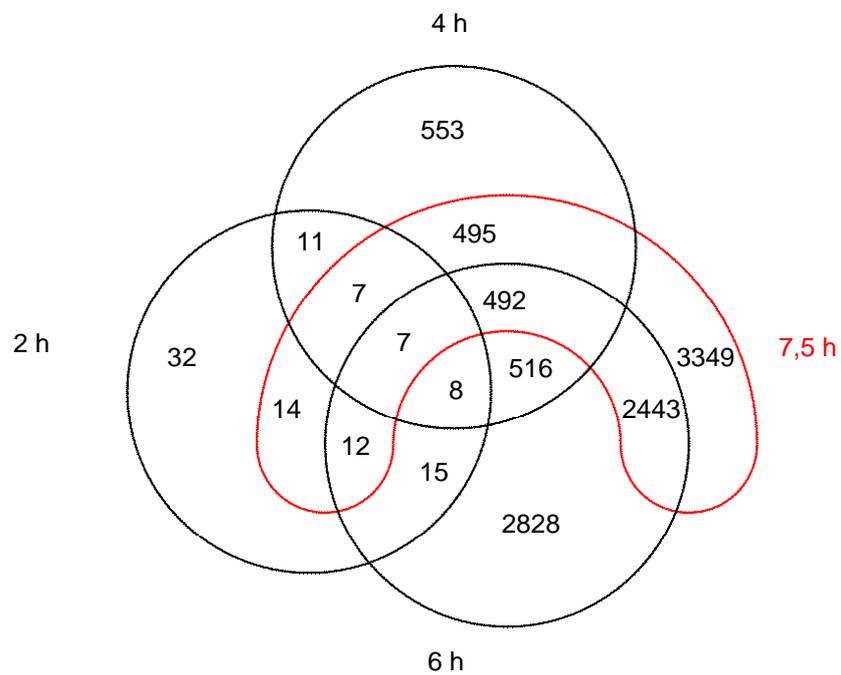


Abb. 14: **Venn Diagramm. Anzahl der erniedrigt exprimierten Gene in R65/06-infizierten DF-1-Zellen.** Schnittmenge der regulierten Gene 2 h , 4 h , 6 h und 7,5 h p. i.

#### 4.1.2.4 GO-Analyse

Die „Gene Ontology überrepräsentierte Analyse“ (kurz: GO-Analyse) zeigt auf, ob differentiell exprimierte Gene statistisch signifikant in bekannten Signalwegen vorkommen. Als Kriterien wurde  $p < 0,01$  und die Anzahl regulierter Gene  $> 1$  festgelegt. Zur übersichtlicheren Darstellung erfolgte eine Zusammenführung der GO-Kategorien, sofern die Zahl der ermittelten regulierten Gene nicht beeinflusst wurde, und es sich um die gleichen regulierten Gene handelte (Tab. 11 bis Tab. 12). Die detaillierte Aufschlüsselung der GO-Kategorien ist der Tabellenlegende zu entnehmen.

Tab. 11: **GO-Analyse von differentiell exprimierten Genen von R65/06-infizierten DF-1-Zellen, 2 h p. i.** Als Kriterium wurde bei der statistischen Berechnung mit dem Bioconductor Datenpaket „Gostats“  $p < 0,01$  festgelegt.

GO-Bezeichnung des biologischen Prozesses	Anzahl Gene		
	reguliert	erhöht	erniedrigt
Biologische Regulation*	12	0	12
Regulation zellulärer Prozesse, GO: 0050794	11	0	11
Biosynthetische Prozesse <sup>#</sup>	8	1	7
Regulation biosynthetischer Prozesse <sup>§</sup>	7	0	7
Genexpression, GO: 0010467	8	1	7
Regulation der Genexpression, GO: 0010468	7	0	7
Regulation metabolischer Prozesse <sup>+</sup>	8	0	8
Transkription <sup>§</sup>	7	0	7

\*GO: 0065007: biological regulation, GO: 0050789: regulation of biological process

<sup>#</sup> GO: 0009058: biosynthetic process, GO: 0009059: macromolecule biosynthetic process, GO: 0034645: cellular macromolecule biosynthetic process, GO: 0044249: cellular biosynthetic process, GO: 0034961: cellular biopolymer biosynthetic process, GO: 0043284: biopolymer biosynthetic process

<sup>§</sup> GO: 0009889: regulation of biosynthetic process, GO: 0031326: regulation of cellular biosynthetic process, GO: 0010556: regulation of macromolecule biosynthetic process, GO: 0019219: regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process

<sup>+</sup> GO: 0019222: regulation of metabolic process, GO: 0060255: regulation of macromolecule metabolic process, GO: 0031323: regulation of cellular metabolic process

<sup>§</sup> GO: 0006350 transcription, GO: 0045449: regulation of transcription

Tab. 12: **GO-Analyse von differentiell exprimierten Genen von R65/06-infizierten DF-1-Zellen, 4 h p. i.** Als Kriterium wurde bei der statistischen Berechnung mit dem Bioconductor Datenpaket „Gostats“  $p < 0,01$  festgelegt.

GO-Bezeichnung des biologischen Prozesses	Anzahl Gene		
	reguliert	erhöht	erniedrigt
Metabolische Prozesse GO: 0008152	156	31	125
Metabolische Prozesse, zellulär GO: 0044237	135	28	107
Metabolische Prozesse, primär GO: 0044238	133	27	106
Metabolische Prozesse, Makromoleküle GO: 0043170	122	25	96
Metabolische Prozesse, biopolymer GO: 0043283	98	17	81
Metabolische Prozesse, Proteine GO: 0019538	72	17	55
Metabolische Prozesse, zellulär, Makromoleküle GO: 0044260	69	17	52
Metabolische Prozesse, zellulär, Proteine GO: 0044267	68	16	52
DNA metabolische Prozesse GO: 0006259	16	1	15
Translation GO: 0006412	16	7	9
Zellzyklus, mitotisch GO: 0000278	7	0	7
Mitose GO: 0007067	6	0	6
M-Phase*	6	0	6
RNA splicing GO: 0008380	5	1	4
DNA Rekombination GO: 0006310	5	1	4
Rekombinationsreparatur <sup>#</sup>	3	1	2
DNA Katabolische Prozesse GO: 0006308	3	1	2
Chromosomen Segregation GO: 0007059	3	0	3
Koenzym A metabolische Prozesse GO: 0015936	2	0	2
Abbau zellulärer Komponenten <sup>§</sup>	2	0	2
Zellkern Organisation und Biogenese GO: 0006997	2	0	2
Zellveränderungen durch Apoptose GO: 0030262	2	0	2

\*GO: 0000279: M phase, GO: 0000087: M phase of mitotic cell cycle

<sup>#</sup>GO: 0000725: recombinational repair GO: 0000724: double-strand break repair via homologous recombination

<sup>§</sup> GO: 0022411 cellular component disassembly, GO: 0006921: cell structure disassembly during apoptosis, GO: 0006309: DNA fragmentation during apoptosis

#### 4.1.2.5 Differentiell exprimierte Gene in R65/06-infizierten DF-1-Zellen, 2 h p. i.

Neben den Kriterien der MAS 5.0 statistischen Analyse und der Forderung eines stets erhöhten oder erniedrigten „detection call“ wurde als „change p-value“ bei erhöhten Expressionen  $p < 0,001$ , bei erniedrigt exprimierten Genen  $p > 0,999$  gefordert (Darstellung im Fettdruck). Bekannte Proteinannotationen lagen für einen Teil der Gene vor und sind im Folgenden dargestellt (Tab. 13). Für sieben Gene lagen keine Proteinannotationen vor. Von den auf dem Microchip aufgebrauchten AIV-spezifischen Transkripten des Influenzavirus A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) konnten die Gene für NS2, NP und M2 nachgewiesen werden.

Tab. 13: **Differentiell exprimierte Gene in R65/06-infizierten DF-1-Zellen, 2 h p. i.** Darstellung nach MAS 5.0 Analyse. Erniedrigt oder erhöht exprimierte Gene mit  $p < 0,001$  bzw.  $p > 0,999$  im Fettdruck

<b>Gensymbole</b> <b>Affymetrix-ID</b>	<b>Name (nach Affymetrix)</b>	<b>Signal</b> <b>Ratio (log<sub>2</sub>)</b>	<b>Konfidenz-</b> <b>intervall</b>	
<b>ID1</b> Gga.892.1.S1_at	Inhibitor of DNA binding 1	-2,11	-1,98	-2,25
<b>ID2</b> Gga.3125.1.S1_at	Inhibitor of DNA binding 2	-1,51	-1,38	-1,65
<b>ID3</b> Gga.4048.1.S1_at	Inhibitor of DNA binding 3	-1,31	-1,21	-1,41
<b>SNAI2</b> Gga.19934.1.S1_at	Snail homolog 2	-1,19	-1,07	-1,31
<b>SMAD6</b> Gga.3878.1.S1_at	SMAD family member 6	-1,13	-1,05	-1,21
<b>ID2</b> Gga.3125.1.S2_at	Inhibitor of DNA binding 2	-1,10	-1,04	-1,17
<b>RASGRP3</b> Gga.1287.1.S1_at	RAS guanyl releasing protein 3	-1,06	-0,92	-1,21
<b>BHLHB2</b> Gga.15700.1.S1_at	Basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2	-1,01	-0,94	-1,07
<b>EDN1</b> GgaAffx.8070.1.S1_at	Endothelin 1	-0,99	-0,84	-1,15
<b>CIRBP</b> Gga.4756.1.S1_a_at	BU143760	-0,99	-0,89	-1,09
<b>SOCS3</b> Gga.915.1.S1_at	Suppressor of cytokine signaling 3	-0,92	-0,75	-1,09
<b>SNAI1</b> Gga.3851.1.S1_at	Snail homolog 1	-0,82	-0,69	-0,96
<b>PRRX2</b> Gga.12997.1.S1_s_at	Paired related homeobox 2	-0,78	-0,72	-0,84
<b>ANKRD1</b> Gga.5751.1.S1_at	Ankyrin repeat domain 1	-0,70	-0,57	-0,83
<b>PDE4B</b> Gga.19233.1.S1_s_at	Phosphodiesterase 4B, cAMP-specific	-0,66	-0,61	-0,71

<b>Fortsetzung: differentiell exprimierte Gene, 2 h p. i.</b>				
<b>SNAI1</b> Gga.3851.1.S2_at	Snail homolog 1	-0,63	-0,56	-0,70
<b>LMCD1</b> GgaAffx.5267.1.S1_at	LIM and cysteine-rich domains 1	-0,55	-0,52	-0,59
<b>FILIP1L</b> GgaAffx.24639.1.S1_at	Similar to GPBP-interacting protein 130b	-0,52	-0,42	-0,63
<b>LOC771339</b> GgaAffx.20160.2.A1_at	Hypothetical protein LOC771339	-0,51	-0,42	-0,60
<b>RASGRP3</b> GgaAffx.12948.1.S1_s_at	RAS guanyl releasing protein 3	-0,51	-0,47	-0,55
<b>RCAN1</b> Gga.5465.1.S1_at	Regulator of calcineurin 1	-0,43	-0,34	-0,53
<b>ATOH8</b> Gga.8360.1.S1_at	Atonal homolog 8	-0,42	-0,38	-0,47
<b>TIPARP</b> Gga.2353.1.S1_at	TCDD-inducible poly(ADP-ribose) Polymerase	-0,38	-0,32	-0,43
<b>RHOJ</b> Gga.12598.1.S1_at	Ras homolog gene family, member J	-0,36	-0,33	-0,40
<b>BAMBI</b> Gga.6306.1.S1_at	BMP and activin membrane-bound inhibitor homolog	-0,34	-0,30	-0,38
<b>RPS16</b> Gga.4479.1.S1_at	Ribosomal protein S16	0,44	0,38	0,51
<b>RGS2</b> Gga.8500.1.S1_at	Regulator of G-protein signaling 2, 24kDa	0,68	0,59	0,77

#### 4.1.2.6 Differentiell exprimierte Gene in R65/06-infizierten DF-1-Zellen, 4 h, 6 h und 7,5 h p. i.

Zum Zeitpunkt 4 h p. i. lagen nach der Datenanalyse mit Hilfe der „chicken.db“ Datenbank Proteinannotationen zu 600 der insgesamt 774 regulierten Gene vor. 6 h p. i. lagen zu 3553 Genen Proteinannotationen der insgesamt 4366 differentiell exprimierten Gene vor. Entsprechend lagen 7,5 h p. i. Annotationen zu 3938 Genen von 4937 regulierten Genen vor. Die AIV-spezifischen Gene NP, PA, NS1, NS2, PB1, M1 und M2 wurden zu allen drei Zeitpunkten nachgewiesen.

#### 4.1.2.7 Signalweganalyse: Toll-like-Rezeptor Signalweg

Der Vergleich regulierter Gene mit der KEGG-Datenbank (Nr. gga04620 toll-like receptor signaling pathway, Gallus gallus) zeigte mehr Übereinstimmungen als die GO-Datenbank (GO 0002224: toll-like receptor signaling pathway). Daher wurde dieser Signalweg mit Hilfe der KEGG-Datenbank untersucht. 2 h p. i. waren keine Gene des

TLR-Signalweges reguliert. Die Kandidatengene der Zeitpunkte 4 h, 6 h und 7,5 h p. i. sind in den Tab. 14 bis Tab. 16 dargestellt.

Tab. 14: **TLR-Signalweg: Differentiell exprimierte Gene in R65/06-infizierten DF-1-Zellen 4 h p. i.** KEGG-Datenbank (Nr. gga04620). Erniedrigt oder erhöht exprimierte Gene mit  $p < 0,001$  bzw.  $p > 0,999$  im Fettdruck

<b>Gensymbole Affymetrix-ID</b>	<b>Name (nach Affymetrix)</b>	<b>Signal Ratio (log<sub>2</sub>)</b>	<b>Konfidenz- intervall</b>	
<b>NFKBIA, IκB-α</b> GgaAffx.1.1.S1_s_at	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	-0,78	-0,71	-0,86
<b>IKBKB, IKK-β</b> GgaAffx.13004.1.S1_at	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta	-0,69	-0,63	-0,76
<b>IFNAR1, IFNαR1</b> Gga.4185.1.S2_at	Interferon receptor 1	-0,66	-0,61	-0,71
<b>MYD88</b> Gga.17397.1.S1_at	Myeloid differentiation primary response gene (88)	-0,59	-0,52	-0,66
<b>JUN</b> Gga.1473.1.S1_at	Jun oncogene	-0,50	-0,45	-0,56
<b>TNFSF15, TL1a</b> Gga.12614.1.S1_at	Tumor necrosis factor superfamily 15	1,52	1,77	1,27

Tab. 15: **TLR-Signalweg: Differentiell exprimierte Gene in R65/06-infizierten DF-1-Zellen 6 h p. i.** KEGG-Datenbank (Nr. gga04620). Erniedrigt oder erhöht exprimierte Gene mit  $p < 0,001$  bzw.  $p > 0,999$  im Fettdruck

Gensymbole Affymetrix-ID	Name (nach Affymetrix)	Signal Ratio (log <sub>2</sub> )	Konfidenz- intervall	
<b>PIK3CB, PI3K</b> GgaAffx.3455.1.S1_at	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, beta polypeptide	-2,00	-2,19	-1,82
<b>NFKBIA, IκB-α</b> GgaAffx.1.1.S1_s_at	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	-1,93	-1,98	-1,87
<b>TICAM1, TRIF</b> Gga.12009.1.S1_at	Toll-like receptor adaptor molecule 1	-1,73	-1,78	-1,68
<b>MYD88</b> Gga.17397.1.S1_at	Myeloid differentiation primary response gene (88)	-1,72	-1,81	-1,63
<b>TRAF 6</b> GgaAffx.4973.1.S1_at	TNF receptor-associated factor 6	-1,62	-2,04	-1,21
<b>IFNAR1, IFNαR1</b> Gga.4185.1.S1_at	Interferon receptor 1	-1,47	-1,54	-1,41
<b>IFNAR1, IFNαR1</b> Gga.4185.1.S2_at	Interferon receptor 1	-1,44	-1,49	-1,40
<b>NFKB1, NF-κ B</b> Gga.4408.2.S1_a_at	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	-1,24	-1,32	-1,16
<b>MYD88</b> GgaAffx.3703.1.S1_at	Myeloid differentiation primary response gene (88)	-1,10	-1,21	-0,98
<b>RCJMB04_19h23, IKK-α</b> GgaAffx.2058.1.S1_s_at	Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	-1,07	-1,13	-1,01
<b>TRAF 3</b> Gga.12655.1.S1_at	TNF receptor-associated factor 3	-1,02	-1,20	-0,83
<b>JUN</b> Gga.1473.1.S1_at	Jun oncogene	-0,99	-1,04	-0,94
<b>MAP3K7IP2, TAB2</b> GgaAffx.23874.1.S1_s_at	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 interacting protein 2	-0,62	-0,70	-0,53
<b>MAP2K4</b> GgaAffx.644.2.S1_s_at	Mitogen-activated protein kinase kinase 4	-0,58	-0,66	-0,50

<b>Fortsetzung: TLR-Signalweg: differentiell exprimierte Gene, 6 h p. i.</b>				
<b>CASP8</b> Gga.2451.1.S1_at	Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	-0,54	-0,57	-0,51
<b>TLR16, CHTLR1-TYPE2</b> GgaAffx.11201.3.S1_s_at	Toll-like receptor 1 type 2	-0,50	-0,58	-0,41
<b>TIRAP</b> Gga.12311.5.S1_a_at	Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein	-0,48	-0,57	-0,40
<b>MAPK14, P38</b> GgaAffx.11847.1.S1_s_at	Mitogen-activated protein kinase 14	0,87	0,78	0,95
<b>TNFSF15, TL1a</b> Gga.12614.1.S1_at	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15	3,82	3,49	4,14

Tab. 16: **TLR-Signalweg: Differentiell exprimierte Gene in R65/06-infizierten DF-1-Zellen 7,5 h p. i.** KEGG-Datenbank (Nr. gga04620). Erniedrigt oder erhöht exprimierte Gene mit  $p < 0,001$  bzw.  $p > 0,999$  im Fettdruck

<b>Gensymbole</b> <b>Affymetrix-ID</b>	<b>Name</b> (nach Affymetrix)	Signal Ratio (log2)	Konfidenzintervall	
<b>TRAF 6</b> GgaAffx.4973.1.S1_at	TNF receptor-associated factor 6	-3,72	-4,72	-2,72
<b>PIK3CB, PI3K</b> GgaAffx.3455.1.S1_at	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, beta polypeptide	-3,29	-4,21	-2,37
<b>TICAM1, TRIF</b> Gga.12009.1.S1_at	Toll-like receptor adaptor molecule 1	-2,76	-2,91	-2,60
<b>IFNAR1, IFN<math>\alpha</math>R1</b> Gga.4185.1.S1_at	Interferon receptor 1	-2,32	-2,46	-2,17
<b>MYD88</b> GgaAffx.3703.1.S1_at	Myeloid differentiation primary response gene (88)	-2,17	-2,92	-1,42
<b>NFKBIA, I<math>\kappa</math>B-<math>\alpha</math></b> GgaAffx.1.1.S1_s_at	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	-2,12	-2,21	-2,03
<b>RCJMB04_19h23, IKK-<math>\alpha</math></b> GgaAffx.2058.1.S1_s_at	Nuclear factor NFkappaB inhibitor kinase alpha	-2,02	-2,34	-1,70
<b>MYD88</b> Gga.17397.1.S1_at	Myeloid differentiation primary response gene (88)	-1,99	-2,11	-1,87

<b>Fortsetzung: TLR-Signalweg: differentiell exprimierte Gene, 7,5 h p. i.</b>				
<b>IFNAR1, IFN<math>\alpha</math>R1</b> Gga.4185.1.S2_at	Interferon (alpha, beta and omega) receptor 1	-1,86	-1,90	-1,82
<b>NFKB1, NF-<math>\kappa</math> B</b> Gga.4408.2.S1_a_at	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	-1,73	-1,80	-1,66
<b>IKBKB, IKK-<math>\beta</math></b> GgaAffx.13004.1.S1_at	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta	-1,36	-1,46	-1,26
<b>MAP3K7IP2, TAB2</b> GgaAffx.23874.1.S1_s_at	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 interacting protein 2	-1,29	-1,49	-1,09
<b>MAPK1, ERK</b> Gga.2163.1.S1_at	Mitogen-activated protein kinase 1	-1,27	-1,39	-1,14
<b>MAP2K4, MKK 4/7</b> GgaAffx.644.2.S1_s_at	Mitogen-activated protein kinase kinase 4	-1,21	-1,28	-1,14
<b>MAP2K4, MKK 4/7</b> GgaAffx.644.1.S1_at	Mitogen-activated protein kinase kinase 4	-1,17	-1,32	-1,02
<b>JUN</b> , Gga.1473.1.S1_at	Jun oncogene	-1,17	-1,24	-1,09
<b>TLR16, CHTLR1-Type2</b> GgaAffx.11201.3.S1_s_at	Toll-like receptor 1 type 2	-1,04	-1,16	-0,93
<b>CASP8</b> Gga.2451.1.S1_at	Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	-0,92	-0,96	-0,88
<b>TOLLIP</b> GgaAffx.12382.1.S1_s_at	Toll interacting protein	-0,91	-1,00	-0,82
<b>MAP3K7IP2, TAB2</b> Gga.17529.1.S1_s_at	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 interacting protein 2	-0,90	-1,01	-0,79
<b>TIRAP</b> Gga.12311.2.S1_x_at	Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein	-0,73	-0,98	-0,49
<b>MAP3K7, TAK 1</b> Gga.17079.1.S1_s_at	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7	0,84	0,80	0,88
<b>MAPK14, P38</b> GgaAffx.11847.1.S1_s_at	Mitogen-activated protein kinase 14	1,21	1,07	1,34
<b>TLR5</b> , Gga.3252.1.S1_at	Toll-like receptor 5	1,58	1,41	1,76
<b>TNFSF15, TL1-a</b> Gga.12614.1.S1_at	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15	2,68	2,52	2,84

#### 4.1.2.8 Signalweganalyse: Hämostase

Der Vergleich regulierter Gene mit dem Hämostase Signalweg der GO-Datenbank (GO: 007599: „hemostasis“) zeigte eine größere Zahl von Übereinstimmungen als die KEGG-Datenbank (Nr. hsa04610 complement and coagulation cascades, Homo sapiens). Daher wurde dieser Signalweg mit Hilfe der GO-Datenbank untersucht. 2 h und 4 h p. i. wurden keine regulierten Gene im Hämostase Signalweg nachgewiesen. Die Kandidatengene der späteren Zeitpunkte sind im Folgenden aufgeführt.

Tab. 17: **Hämostase Signalweg: Differenziell exprimierte Gene in R65/06-infizierten DF-1-Zellen 6 h p. i.** GO-Datenbank (GO: 007599: „hemostasis“). Erniedrigt oder erhöht exprimierte Gene mit  $p < 0,001$  bzw.  $p > 0,999$  im Fettdruck

Gensymbole Affymetrix-ID	Name (nach Affymetrix)	Signal Ratio (log2)	Konfidenz- intervall	
<b>Blutgerinnung (GO 007596: „blood coagulation“)</b>				
<b>F2RL1</b> GgaAffx.12054.1.S1_s_at	Coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1	-1,39	-1,47	-1,30
<b>TFPI</b> Gga.11741.4.S1_a_at	Tissue factor pathway inhibitor	-0,95	-1,12	-0,78
<b>Plättchenaktivierung (GO 0030168: „platelet activation“)</b>				
<b>PIK3CB, PI3K</b> GgaAffx.3455.1.S1_at	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, beta polypeptide	-2,00	-2,19	-1,82
<b>Fibrinolyse (GO 0042730: „fibrinolysis“)</b>				
<b>ANXA2</b> Gga.3641.1.S1_at	Annexin A2	0,55	0,47	0,62

Tab. 18: **Hämostase Signalweg: Differentiell exprimierte Gene in R65/06-infizierten DF-1-Zellen 7,5 h p. i.** GO-Datenbank (GO: 007599: „hemostasis“). Erniedrigt oder erhöht exprimierte Gene mit  $p < 0,001$  bzw.  $p > 0,999$  im Fettdruck

<b>Gensymbole Affymetrix-ID</b>	<b>Name (nach Affymetrix)</b>	<b>Signal Ratio (log2)</b>	<b>Konfidenz- intervall</b>	
<b>Blutgerinnung, (GO 007596: „blood coagulation“)</b>				
<b>F2RL1</b> GgaAffx.12054.1.S1_s_at	Coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1	-2,20	-1,97	-2,43
<b>THBD</b> GgaAffx.5274.1.S1_at	Thrombomodulin	-1,44	-1,22	-1,65
<b>F2RL2</b> Gga.11368.1.S1_at	Coagulation factor II (thrombin) receptor-like 2	-1,25	-1,20	-1,30
<b>TFPI</b> Gga.11741.4.S1_a_at	Tissue factor pathway inhibitor (lipoprotein- associated coagulation inhibitor)	-1,24	-1,09	-1,39
<b>DTNBP1</b> GgaAffx.12167.1.S1_s_at	Dystrobrevin binding protein 1	-0,78	-0,70	-0,86
<b>Plättchenaktivierung (GO 0030168: „platelet activation“)</b>				
<b>PIK3CB, PI3K</b> GgaAffx.3455.1.S1_at	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, beta polypeptide	-3,29	-2,37	-4,21
<b>Fibrinolyse (GO 0042730: „fibrinolysis“)</b>				
<b>ANXA2</b> Gga.5092.1.S1_s_at	Annexin A2	0,98	1,03	0,93

#### 4.1.2.9 Regulierte Endothelzellmarker

Die regulierten Gene, die als wesentliche Endothelzellmarker angesehen werden oder deren Expression auf Endothelzellen induziert werden kann (Garlanda und Dejana, 1997), waren: PECAM-1, CDH5, CD51, CD73, Thrombomodulin, AAMP und Flt-1.

#### 4.1.2.10 Regulierte Gene der SOCS-Familie

Die regulierten Gene der SOCS-Familie sind in den Tab. 19 bis Tab. 22 erfasst.

Tab. 19: **Regulierte SOCS-Gene, 2 h p. i.**

Gen Symbol, Affymetrix-ID	Name (nach Affymetrix)	Signal Ratio ( $\log_2$ )	Konfidenzintervall	
SOCS3, Gga.915.1.S1_at	Suppressor of cytokine signaling 3	-0,92	-1,09	-0,75

Tab. 20: **Regulierte SOCS-Gene, 4 h p. i.**

Gen Symbol, Affymetrix-ID	Name (nach Affymetrix)	Signal Ratio ( $\log_2$ )	Konfidenzintervall	
SOCS1, Gga.10606.1.S1_at	Suppressor of cytokine signaling 1	-1,26	-1,37	-1,14

Tab. 21: **Regulierte SOCS-Gene, 6 h p. i.**

Gen Symbol, Affymetrix-ID	Name (nach Affymetrix)	Signal Ratio ( $\log_2$ )	Konfidenzintervall	
SOCS1, Gga.10606.1.S1_at	Suppressor of cytokine signaling 1	-1,85	-1,94	-1,77
SOCS4, Gga.16094.1.S1_at	Suppressor of cytokine signaling 4	-1,65	-1,93	-1,36
SOCS5, GgaAffx.6294.1.S1_at	Suppressor of cytokine signaling 5	-1,41	-1,76	-1,07

Tab. 22: **Regulierte SOCS-Gene, 7,5 h p. i.**

Gen Symbol, Affymetrix-ID	Name (nach Affymetrix)	Signal Ratio ( $\log_2$ )	Konfidenzintervall	
SOCS1, Gga.10606.1.S1_at	Suppressor of cytokine signaling 1	-1,83	-1,95	-1,71
SOCS2, Gga.2190.2.S1_a_at	Suppressor of cytokine signaling 2	-0,65	-0,70	-0,60
SOCS4, Gga.16094.1.S1_at	Suppressor of cytokine signaling 4	-1,79	-1,96	-1,62
SOCS5, GgaAffx.6294.1.S1_at	Suppressor of cytokine signaling 5	-4,12	-4,42	-3,82

#### 4.1.2.11 Validierung der Microarray-Ergebnisse mittels real-time RT-PCR

Zur Validierung der Microarray-Ergebnisse wurde ein erhöht exprimiertes (TL1a) und ein vermindert exprimiertes Gen (IFN $\alpha$ R1) mittels real-time RT-PCR untersucht (Abb. 15 und Abb. 16). Die Expressionsunterschiede wurden nach der  $\Delta\Delta$ Ct-Methode als „fold change“ berechnet (Livak und Schmittgen, 2001).

##### Bestimmung der RNA-Konzentration und –Reinheit

Von den 18 untersuchten Proben wiesen zwei Proben eine RNA-Konzentration von unter 20 ng/ $\mu$ l auf. Eine weitere Probe wies eine RIN < 6,7 auf. Diese Proben wurden nicht weiter untersucht. Bei allen verbliebenen Proben lag die RIN über 6,7.

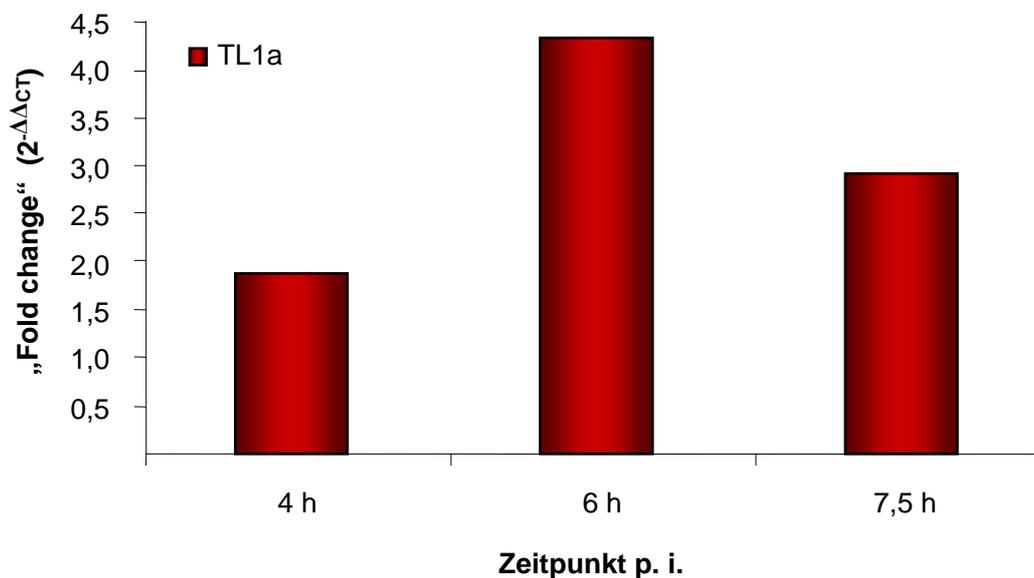


Abb. 15: Expressionsunterschiede von TL1a in R65/06-infizierten DF-1-Zellen nach real-time RT-PCR. Berechnung nach der  $\Delta\Delta$ CT-Methode.

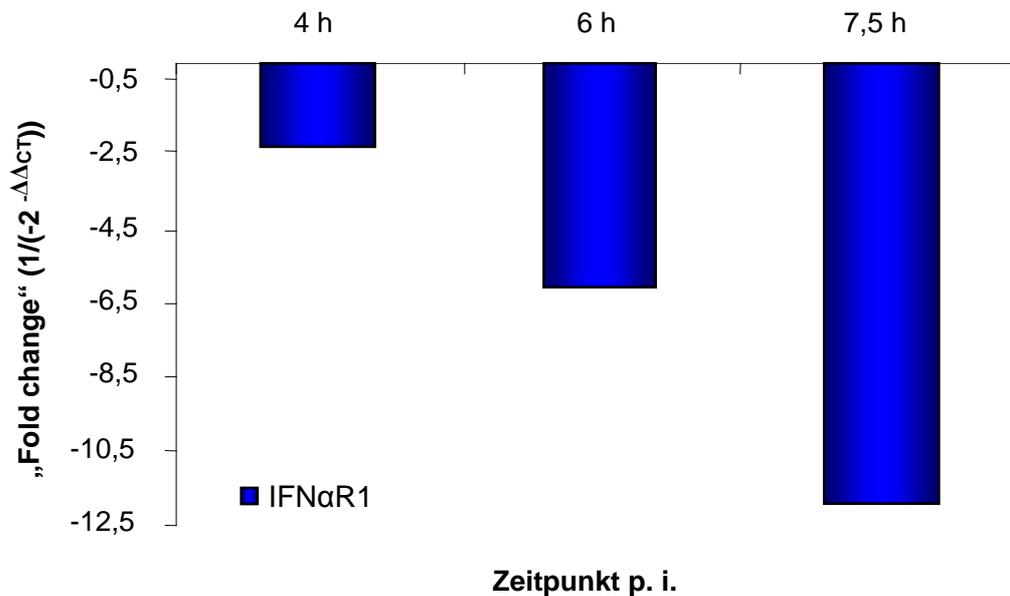


Abb. 16: **Expressionsunterschiede von IFN $\alpha$ R1 in R65/06-infizierten DF-1-Zellen nach real-time RT-PCR.** Berechnung nach der  $\Delta\Delta$ CT-Methode.

Die Expressionsunterschiede („fold change“) wurden im Folgenden mit den „fold changes“ aus den Microarray-Daten verglichen (Abb. 17 und Abb. 18).

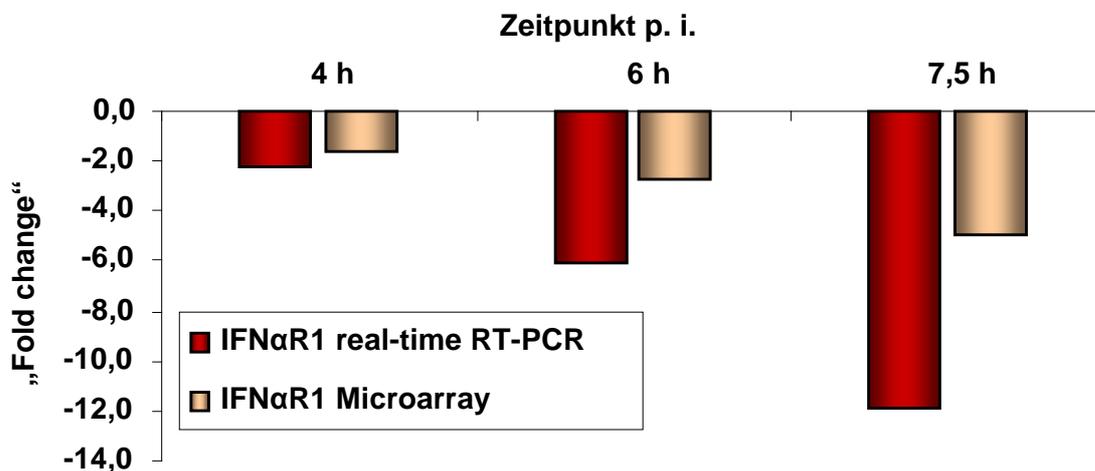


Abb. 17: **Validierung der differentiellen Genexpression mittels real-time RT-PCR des Gens für IFN $\alpha$ R1.** Vergleich der Expressionsunterschiede der real-time RT-PCR ( $\Delta\Delta$ CT Methode) und der Microarray-Ergebnisse

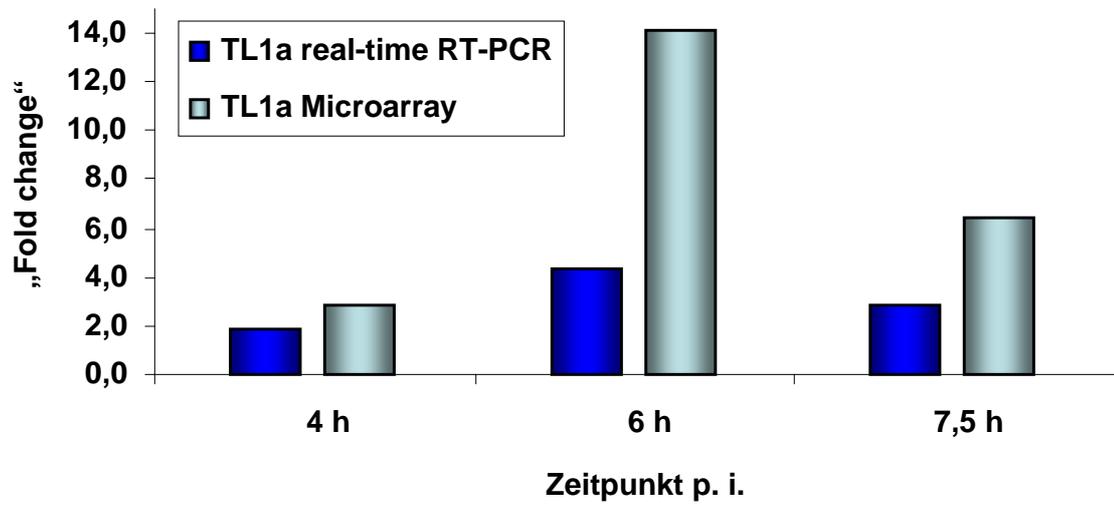


Abb. 18: **Validierung der differentiellen Genexpression mittels real-time RT-PCR des Gens für TL1a.** Vergleich der Expressionsunterschiede der real-time RT-PCR ( $\Delta\Delta\text{CT}$  Methode) und der Microarray-Ergebnisse

## **4.2 Morphologische Untersuchungen zur Pathogenese von HPAIV-Infektionen**

Im Folgenden werden pathomorphologische Befunde und der daraus abgeleitete Organotropismus nach experimentellen HPAIV-Infektionen von Säugern und Vögeln gegenübergestellt. Darüber hinaus werden Empfänglichkeit, Unterschiede in der Inkubationszeit, im klinischen Verlauf und der Überlebenszeit beschrieben.

### **4.2.1 Pathomorphologische Befunde nach HPAIV-Infektion von Säugern**

#### **4.2.1.1 Mäuse**

Die untersuchten Tiere gehen aus Tab. 4 hervor. Drei Tiere dienten als nicht infizierte Kontrollen.

#### **Empfänglichkeit, Überlebensdauer, Klinik**

Fünf Mäuse, die mit dem Isolat R1372/07 infiziert wurden, starben oder mussten aufgrund von schweren zentralnervösen Erscheinungen und schlechten Allgemeinbefinden (Zittern, Anorexie, aufgekrümmter Rücken, hochfrequente Atmung, gestäubtes Fell) durch okzipitale Dislokation am siebten Tag p. i. getötet werden. Vergleichbare klinische Erscheinung waren bei fünf R65/06-infizierten Tieren, die zwischen dem siebten und neunten Tag p. i. getötet wurden, zu beobachten. Von fünf mit R1959/07-inokulierten Tieren verstarb eine Maus am neunten Tag p. i., die übrigen Tiere zeigten für wenige Tage ein gestäubtes Fell und einen aufgekrümmten Rücken. Am neunten Tag p. i. wurden diese Tiere getötet.

#### **Makroskopische Befunde**

Bei der Sektion waren keine makroskopischen Veränderungen nachweisbar.

#### **Histopathologische und immunhistochemische Befunde**

Die Organe der nicht infizierten Kontrolltiere waren frei von Läsionen und Influenzavirusantigenen. Eine Zusammenfassung der immunhistologischen Befunde infizierter Mäuse findet sich in Tab. 23.

Alle erkrankten und verstorbenen Tiere wiesen Neuronen- und Gliazellnekrosen sowie herdförmige Gliazellproliferationen auf und zeigten in diesen Arealen Influenzavirusantigen. Bei wenigen Tieren lag eine nichteitrige Meningoenzephalitis vor. Weiterhin war in degenerierten Neuronen peripherer Ganglien (Niere) Antigen nachweisbar. Die betroffenen Neuronen zeichneten sich durch eine degenerative Kernschwellung oder Kernwandhyperchromatose aus. In der Lunge fanden sich Bronchialepithelnekrosen, die mit dem Nachweis des Influenza-NP korrelierten. Nekrosen fanden sich auch im respiratorischen Epithel der Nasenschleimhaut (1372/07-infiziert). Die Milz in jeweils vier Mäusen (R65/06 und R1959/07-infiziert) zeigte eine follikuläre Hyperplasie. Vereinzelt lagen Herde hepatozellulärer Nekrosen (R65/06-infiziert) vor. In den folgenden Organen wurden kein Influenzavirusantigen und keine Läsionen nachgewiesen: Auge, Dünndarm, Dickdarm, Magen, Gonade, Haut, Herz, Leber, Milz, Nebenniere, Ösophagus, Pankreas, Skelettmuskel, Trachea und Thymus.

Tab. 23: Nachweis von Influenzavirusantigen bei HPAIV-infizierten Mäusen

Organ	Antigennachweis <sup>#</sup>				Zelltyp
	Quantität	R1372/07	R65/06	R1959/07	
		Anzahl			
Lunge	+	1/5	0/5	0/5	Bronchialepithel
Nase	+	1/5	0/5	0/5	Respiratorisches Epithel
Niere	+	1/5	0/5	0/5	Neuronen (PNS)
ZNS	++	5/5	5/5	1/5	Neuronen, Gliazellen

<sup>#</sup> Semiquantitativer Antigennachweis: + (vereinzelt), ++ (herdförmig)

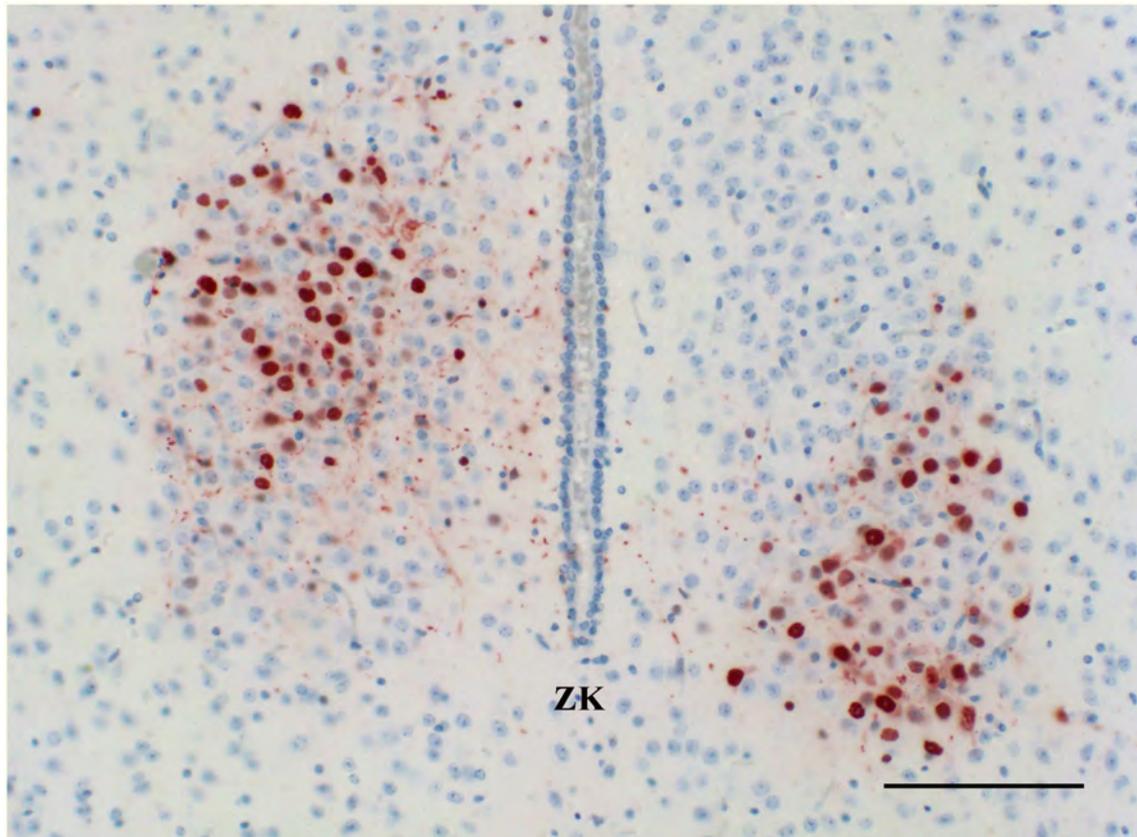


Abb. 19: **Rückenmark einer R65/06-infizierten Maus. Immunhistochemischer Nachweis des Influenza A Virus NP.** ABC-Methode mit AEC-Färbung und Hämalaun-Gegenfärbung. Antigen fand sich in zahlreichen Neuronen und Gliazellen der grauen Substanz. Bar 100 µm. ZK = Zentralkanal.

#### 4.2.1.2 Katzen

Die untersuchten Tiere gehen aus Tab. 4 (Seite 49) hervor. Eine Katze diente als Kontaktkontrolle (Tierversuchsdurchführung: PD Dr. Dr. Thomas Vahlenkamp).

#### **Empfänglichkeit, Überlebensdauer, Klinik**

Die Tötung der Katzen unter Narkose erfolgte durch Blutentzug. Die zwei intranasal inokulierten Tieren wurden zwei und vier Tage p. i. euthanasiert. Beide intravenös infizierten Katzen wurden am vierten Tag getötet. Am sechsten Tag folgten die beiden oral infizierten Tiere. Innerhalb von zwei Tagen zeigten die Tiere einen verminderten Appetit, entwickelten Fieber und respiratorische Symptome.

### Makroskopische Befunde

**Intranasal** infizierte Tiere zeigten multifokale, verwaschen grau-rote Verdichtungs-herde in der Lunge. Der Magen war leer und der Inhalt des Rektums war fest. Sechs Tage p. i. wiesen beide **oral** infizierten Tiere Nekroseherde in der Leber (Abb. 20) auf sowie eine Lymphadenitis simplex der Mesenteriallymphknoten. Eine Katze zeigte darüber hinaus einen allgemeinen Ikterus sowie einen leeren Magen, das andere Tier multifokale verwaschen grau-rote Verdichtungen im Lungenparenchym. Katzen, die eine **intravenöse** Infektion erhielten, zeigten vier Tage p. i. einen leeren Magen und eine Lymphadenitis simplex der Mesenteriallymphknoten. Die Lunge eines Tieres war zu 80 % verdichtet (Abb. 20). Die zweite Katze zeigte einen geringgradigen Ikterus und bis zu 1 mm große Nekroseherde im Leberparenchym. Das Kontrolltier zeigte keine Veränderungen.



Abb. 20: **Leber und Lunge einer Katze, infiziert mit R606/06.** Leber mit zahlreichen, bis zu 1 mm im Durchmesser großen, hellbeigen Nekroseherden. Lunge mit verwaschen grau-rotem, verdichtetem Parenchym.

### **Histopathologische und immunhistochemische Befunde nach intranasaler Infektion**

Die Lunge beider Tiere wies eine eitrig-nekrotisierende Bronchopneumonie mit Pneumozyten Typ II Hyperplasie und Infiltration zahlreicher Alveolarmakrophagen auf. Das Leberparenchym war von zahlreichen hepatozellulären Nekroseherden durchsetzt und die Tonsille von neutrophilen Granulozyten infiltriert. Der Nachweis des Influenzavirusantigens erfolgte bei beiden Katzen in der Lunge (Pneumozyten, Bronchialepithel, Alveolarmakrophagen). Zwei Tage p. i. gelang der Nachweis im Kleinhirn (Gliazellen, Neuronen) und vier Tage p. i. in der Leber (Hepatozyten, Lymphozyten, Makrophagen) und der Tonsille (Makrophagen).

### **Histopathologische und immunhistochemische Befunde nach oraler Infektion**

Die beiden oral infizierten Katzen zeigten eine katarrhalisch-eitrige Bronchopneumonie, in einigen Bereichen mit nekrotisierenden Anteilen. Weiter Nekroseherde fanden sich bei beiden Tieren in der Leber. Ferner zeigte eine Katze Malazieherde im Großhirn, eine nichteitrig Meningoenzephalitis und zahlreiche Gliaknötchen. In der Nebenniere des zweiten Tieres fanden sich Nekrosen in der Zona fasciculata. Darüber hinaus wies dieses Tier eine Infiltration mit neutrophilen Granulozyten in der Tonsille und einem Mesenteriallymphknoten auf. Das Influenzavirusantigen konnte korrespondierend zu den nekrotischen Arealen in der Leber (Hepatozyten, Makrophagen, Lymphozyten), der Nebenniere und dem Großhirn nachgewiesen werden. Eines der Tiere zeigte Antigensignale in Pneumozyten und Alveolarmakrophagen sowie dem Bronchialepithel. Vereinzelt waren positive mononukleäre Zellen in Tonsille und Mesenteriallymphknoten zu finden.

### **Histopathologische und immunhistochemische Befunde nach intravenöser Infektion**

Die intravenös infizierten Katzen wiesen Areale nekrotisierten Parenchyms der Leber (Hepatozyten) und der Nebenniere (Zona fasciculata) auf. In den Lungen fand sich eine katarrhalisch-eitrige, teils nekrotisierende Bronchopneumonie. Ein Tier zeigte eine eitrig-nekrotisierende Lymphadenitis bzw. Tonsillitis. Der Nachweis des Antigens erfolgte in nekrotischen Herden der Leber und der Nebenniere beider Tiere. Eines der

Tiere wies ferner in Lunge (Pneumozyten, Bronchialepithel), Großhirn (Neuronen, Gliazellen), Tonsille und Mesenteriallymphknoten (mononukleäre Zellen) Influenzavirusantigen auf.

Die Organe des **Kontrolltieres** waren frei von Läsionen und Influenzavirusantigen.

## **4.2.2 Pathomorphologische Befunde nach HPAIV-Infektion von Vögeln**

### **4.2.2.1 Hühner**

#### **4.2.2.1.1 Befunde nach HPAIV-Infektion von vier Wochen alten Hühnern mit definiertem Tötungszeitpunkt**

Die untersuchten Tiere gehen aus Tab. 4 hervor. Je fünf Tiere wurden zu den Zeitpunkten 5 h, 12 h, 24 h, und 48 h p. i. in Narkose durch Blutentzug getötet. Zwei Hühner dienten als nicht infizierte Kontrolltiere (Tierversuchsdurchführung: Dr. Jutta Veits, Dr. Carsten Krohmann).

#### **Empfänglichkeit, Überlebensdauer, Klinik**

Die Tiere erkrankten in einem Zeitraum zwischen 24 h und 48 h p. i. und zeigten Lethargie, gesträubtes Gefieder und Schnabelatmung. Zwischen 24 h und 48 h p. i. verstarben fünf Tiere.

#### **Makroskopische Befunde**

In geringem Maß fand sich bei zahlreichen Hühnern, auch in nicht infizierten Tieren, ein alveoläres Lungenödem. Die ersten Läsionen waren bei Hühnern **12 h** nach der Infektion zu finden. Hier zeigten zwei Tiere verwaschen grau-rote Verdichtungsherde in der Lunge. Nach **24 h** war bei allen Hühnern dieser Gruppe das Lungenparenchym verdichtet. Zwei Tiere wiesen Petechien im Herzkranzfett auf. Die Gruppe der nach **48 h** untersuchten Hühner zeigte Petechien und Ekchymosen auf der Sklera, den Konjunktiven, der Unterhaut, der Haut der Ständer und dem Herzkranzfett. Im Schnabel fand sich ein klarer, zäher Schleim. Die Lunge wies bei zwei Tieren verwaschen grau-rote Verdichtungsherde auf. Gelegentlich kamen ein Hydroperikard und geschwollene, hellbeige Nieren vor. Das Pankreasparenchym eines Huhnes wies konfluierende Koagulationsnekrosen auf.

### **Histopathologische und immunhistochemische Befunde**

Die Organe der nicht infizierten Kontrolltiere und der Hühner, die **5 h** nach der Infektion getötet wurden, waren frei von Läsionen und Influenzavirusantigenen.

Bei Tieren, die **12 h** nach der Infektion getötet wurden, konnte in der Lunge von zwei Tieren eine diffuse, gemischtzellige Pneumonie bevorzugt im Bereich der Primärbronchien festgestellt werden. Bei drei Tieren lag eine Depletion der Lymphfollikel in der Bursa cloacalis vor. Einzeltiere zeigten eine gemischtzellige Rhinitis (akut, mittelgradig, diffus), Myokardblutungen, eine heterophile Ovariitis (akut, mittelgradig, herdförmig ausgedehnt) und Nekroseherde im Thymus. Antigensignale fanden sich in veränderten Lungenarealen in Bronchien, Parabronchien und in mononukleären Zellen der BALT. Vereinzelt hatten Tiere Influenzavirussignale in mononukleären Zellen des Ovars, der Milz und der Schnabelhöhle. Ein Huhn zeigte Signale in Endothelzellen der Schnabelhöhle. Es konnte somit ein **Epitheltropismus** in zwei Tieren und ein **Endotheltropismus** in einem Tier nachgewiesen werden.

Hühner, die **24 h** nach der Infektion zur Untersuchung vorlagen, wiesen zum Teil eine gemischtzellige Rhinitis auf. Ein gestautes Lungenparenchym war stets zu finden und bei drei Hühnern lag eine diffuse, heterophile Pneumonie vor. Die lymphatischen Organe wie Milz, Bursa und Zäkaltonsille waren gering- bis hochgradig depletiert. Vereinzelt waren Herde von Lymphozytennekrosen zu sehen, in der Milz mit Fibrin. Hier war auch eine geringgradige, retikuloendotheliale Hyperplasie zu verzeichnen. Die Ovarien wiesen häufig eine Infiltration mit heterophilen Granulozyten im Bereich degenerierter und nekrotischer Zellen auf. Die Schleimhaut des Drüsenmagens und der Speiseröhre war ödematös und von heterophilen Granulozyten infiltriert. Bei zwei Tieren lagen im ZNS Neuronendegenerationen, vereinzelt auch Neuronennekrosen vor. Degenerierte Neuronen zeigten feine Zytoplasmavakuolen (vakuoläre Degeneration), und häufig wiesen die Zellkerne eine degenerative Kernschwellung oder Kernwandhyperchromatose auf. Einzeltiere zeigten herdförmig Degenerationserscheinungen in Kardiomyozyten mit Verlust der Querstreifung, heterophile Infiltrate im Thymus und Hepatozytennekrosen. Eine Übersicht der immunhistologischen Befunde findet sich in Tab. 24. Neben einem **Epithel-** und **Endotheltropismus** bei allen Tieren wurde der **Neurotropismus** bei vier von fünf Tieren nachgewiesen.

Tab. 24: Nachweis von Influenzavirusantigenen bei R65/06-infizierten vier Wochen alten Hühnern, 24 h p. i.

Organ	Antigennachweis #		Zelltyp (ggf. abweichende Anzahl positiver Tiere <sup>§</sup> )
	Quantität	Anzahl	
Schnabel	++	5/5	Endothel, mononukleäre Zellen, resp. Epithel (2)
Trachea	+	1/3	Endothel
Lunge	++	5/5	Pneumozyten, Bronchialepithel (1), mononukleäre Zellen (2)
Herz	++	3/4	Endothel, Kardiomyozyten
Drüsenmagen	+	4/5	Endothel, mononukleäre Zellen, Drüsenepithel (3)
Muskelmagen	+	2/5	Endothel, glatte Muskulatur (1)
Zäkum	+	4/5	Endothel (1), mononukleäre Zellen, Mukosaepithel (2)
Duodenum	+	4/5	Endothel (2), Mukosaepithel (3)
Pankreas	+	4/5	Endothel (3), Azini
Leber	+	5/5	Endothel (3), Hepatozyten (3)
Milz	++	5/5	Endothel (2), mononukleäre Zellen
Bursa	++	4/5	Mononukleäre Zellen, Mark-Rinden Übergang
Thymus	+	3/5	Endothel (1), mononukleäre Zellen
ZNS	++	4/5	Endothel (3), Neuronen, Neuroglia mit Ependym
Auge	+	1/5	Endothel des Pecten oculi
Niere	+	4/5	Endothel (3), Tubuli (3)
Nebenniere	+	2/5	Mononukleäre Zellen
Gonade	++	4/5	Endothel (2), mononukleäre Zellen, Thekazellen, spinozelluläres Bindegewebe
Skelettmuskel		n. u. *	
Haut		0/5	

# Semiquantitativer Antigennachweis: + (vereinzelt), ++ (herdförmig)

\* n. u. = nicht untersucht

§ Anzahl positiver Tiere: Angabe zur Tierzahl mit Antigennachweis im aufgeführten Zelltyp erfolgt, wenn die Anzahl der betroffenen Tiere von der Angabe der vorangehenden Spalte abweicht

Bei Tieren, die **48 h** nach der Infektion getötet wurden, war eine gemischtzellige Rhinitis von ausgedehnten Epithelnekrosen mit weitgehender Desquamation des Epithels begleitet. Die Lunge war bei allen Tieren gestaut. Zwei Hühner zeigten eine teils heterophile, teils gemischtzellige Bronchopneumonie. Die lymphatischen Organe Milz, Bursa und Zäkaltonsille waren hochgradig depletiert und zeigten ausgedehnte, teils fibrinöse Follikelnekrosen. Eine retikuloendotheliale Hyperplasie war gering bis hochgradig einzustufen. Die Lymphozytennekrosen im Thymus waren geringgradig ausgeprägt. Wenige Tiere wiesen hier heterophile Infiltrate auf. In Niere, Leber, Ovar und Pankreas lag häufig eine gering- bis mittelgradige Infiltration mit heterophilen (Niere) oder gemischtzelligen (Leber, Ovar) Entzündungszellen vor, darunter heterophile Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen. Herdförmige Degenerationserscheinungen der Parenchyme waren häufiger und ausgedehnter zu sehen als Nekroseherde. In Nebennierenrinde und -mark lag gelegentlich eine geringgradige, heterophile Adrenalitis vor. Das Parenchym und das assoziierte PNS wiesen herdförmige Degenerationserscheinungen auf. Die Darmschleimhaut im Bereich der Zäkaltonsillen war bei einigen Tieren heterophil infiltriert. Die Lymphfollikel des Drüsenmagens waren depletiert, die Schleimhaut ödematös und von heterophilen Granulozyten infiltriert. Im Neuropil des ZNS fand sich eine aktivierte Mikroglia mit Bildung von Gliaknötchen sowie zahlreiche Nekroseherde. Die Neuronen waren häufig degeneriert oder nekrotisch, Neuronophagie war gelegentlich zu finden. Einzeltiere zeigten eine gemischtzellige Ösophagitis (akut, mittelgradig, herdförmig, erosiv) und Myokardblutungen im Herz mit gemischtzelliger Myokarditis (akut, geringgradig, diffus). Eine Zusammenfassung der immunhistologischen Befunde der Tiere, die nach **48 h** zur Untersuchung vorlagen, findet sich in Tab. 25. Bei allen Tieren konnte ein **Endothel-, Epithel- und Neurotropismus** festgestellt werden.

Tab. 25: Nachweis von Influenzavirusantigen bei R65/06-infizierten vier Wochen alten Hühnern, 48 h p. i.

Organ	Antigennachweis <sup>#</sup>		Zelltyp (ggf. abweichende Anzahl positiver Tiere <sup>§</sup> )
	Quantität	Anzahl	
Schnabel	++	5/5	Endothel, Schleimhautepithel (2), Drüsenepithel (1), mononukleäre Zellen (1)
Trachea	++	4/4	Endothel, Epithel, mononukleäre Zellen (1)
Lunge	+++	5/5	Endothel, Pneumozyten, Bronchien (1)
Herz	++	5/5	Endothel (4), Kardiomyozyten
Drüsenmagen	++	5/5	Endothel, mononukleäre Zellen (4), Epithel (1), Drüsenepithel (5)
Muskelmagen	++	5/5	Endothel, Epithel (4), mononukleäre Zellen (1)
Duodenum	++	3/5	Endothel, mononukleäre Zellen (2), Mukosaepithel (2)
Zäkum	++	5/5	Endothel, mononukleäre Zellen, Mukosaepithel (2)
Pankreas	+++	5/5	Endothel, Azini
Leber	++	5/5	Endothel, mononukleäre Zellen (3), Hepatozyten (3), Kupffer-Zellen (2)
Milz	++	5/5	Endothel, mononukleäre Zellen
Bursa	++	5/5	Endothel, mononukleäre Zellen
Thymus	++	5/5	Endothel, mononukleäre Zellen
ZNS	+++	5/5	Endothel, Neuronen, Neuroglia mit Ependym
Auge	+	4/5	Endothel
Niere	++	5/5	Endothel, Tubuli, mononukleäre Zellen (1)
Nebenniere	+++	5/5	Endothel, Rinde, Mark, PNS (2)
Gonade	+++	5/5	Endothel, mononukleäre Zellen (1), Thekazellen, spinozelluläres Bindegewebe (4)
Skelettmuskel		n. u.	
Haut	++	3/5	Endothel, Federfollikel (1), Epidermisepithel (1)

<sup>#</sup> Semiquantitativer Antigennachweis: + (vereinzelt), ++ (herdförmig), +++ (konfluent bis diffus)

\* n. u. = nicht untersucht

<sup>§</sup> Anzahl positiver Tiere: Angabe zur Tierzahl mit Antigennachweis im aufgeführten Zelltyp erfolgt, wenn die Anzahl der betroffenen Tiere von der Angabe der vorangehenden Spalte abweicht

#### **4.2.2.1.2 Befunde nach HPAIV-Infektion von sieben Wochen alten Hühnern**

Die untersuchten Tiere gehen aus Tab. 4 hervor (Tierversuchsdurchführung: Dr. Jutta Veits, Dr. Daniela Deckers).

#### **Empfänglichkeit, Überlebensdauer, Klinik**

Die Infektion verlief meist perakut. Zwei Tiere waren geringgradig lethargisch. Die Tiere verstarben zwei Tage p. i.

#### **Makroskopische Befunde**

Alle Tiere wiesen einen klaren, zähen Schleim im Kehlkopf und der Schnabelhöhle auf sowie gestaute Parenchyme. Sie zeigten Petechien und Ekchymosen in Myokard, Herzkranzfett, Ovarien und Konjunktiven. Darüber hinaus lagen ausgeprägte Ergüsse in das Perikard und die Körperhöhlen vor. Bei vier Hühnern fanden sich ausgedehnte, akute Koagulationsnekrosen des Pankreas.

#### **Histopathologische und immunhistochemische Befunde**

Die Parenchyme der untersuchten Organe waren diffus gestaut. In Schnabelhöhle und Trachea war das nekrotische Epithel weitgehend desquamiert, die Mukosa ödematisiert und gemischtzellig infiltriert. Die Lunge zeichnete sich durch ein diffuses, alveoläres und interstitielles Ödem sowie eine hochgradige, diffuse Bronchopneumonie mit vorwiegend heterophilen Infiltraten und Fibrin aus. Insbesondere das Infundibular-epithel war weitgehend nekrotisch und degeneriert. Im Herz zeigten AIV-positive Kardiomyozyten Degenerationserscheinungen (Verlust der Querstreifung). Das Pankreas war den makroskopischen Befunden entsprechend bei vier Tieren von Koagulationsnekrosen durchsetzt. In Niere, Leber, Ösophagus, Muskel- und Drüsenmagen, Eierstöcken, Hoden und Darm waren betroffene Epithelzellen häufig degeneriert oder nekrotisch. In Milz, Bursa, Thymus, den Lymphfollikeln von Zäkaltonsille und Drüsenmagen sowie dem BALT lag eine hochgradige Depletion der Lymphozyten vor. Darüber hinaus fanden sich zahlreiche Herde von nekrotischen Lymphozyten in Milz und Thymus, die mit großen Mengen von Fibrin durchsetzt waren. Die Lymphozyten der Portalfelder waren ebenfalls depletiert. Im Neuropil des ZNS fand sich eine aktivierte Mikroglia mit Bildung von Gliaknötchen und zahlreiche

Nekroseherde. Gelegentlich waren ein herdförmig ausgedehntes Unterhautödem sowie Nekrosen der Federfollikel zu finden. Bei den untersuchten Tieren zeigte das Virus einen **Neuro-, Epithel- und Endotheltropismus**. Eine detaillierte Übersicht der immunhistologischen Befunde infizierter Hühner findet sich in Tab. 26.

Tab. 26: **Nachweis von Influenzavirusantigen bei TG24-01/05-infizierten sieben Wochen alten Hühnern**

Organ	Antigennachweis <sup>#</sup>		Zelltyp (ggf. abweichende Anzahl positiver Tiere <sup>§</sup> )
	Quantität	Anzahl	
Schnabel	++	5/5	Endothel, respiratorisches Epithel (3), Drüsenepithel (1)
Trachea	+	5/5	Endothel, Epithel (1)
Lunge	+++	5/5	Endothel, Pneumozyten, mononukleäre Zellen, Bronchien (2)
Herz	+++	5/5	Endothel, Kardiomyozyten
Drüsenmagen	+++	5/5	Endothel, mononukleäre Zellen (2), Drüsenepithel, Schleimhautepithel (4)
Muskelmagen	+++	5/5	Endothel, Schleimhautepithel, glatte Muskulatur (1)
Duodenum	++	5/5	Endothel, mononukleäre Zellen (3), Mukosaepithel (3)
Zäkum	++	5/5	Endothel, mononukleäre Zellen (3), Mukosaepithel (2)
Pankreas	++	5/5	Endothel, Azini
Leber	++	5/5	Endothel, mononukleäre Zellen (1), Hepatozyten
Milz	+++	5/5	Endothel, mononukleäre Zellen
Bursa	++	5/5	Endothel, mononukleäre Zellen: Übergang Mark-Rinde der Follikel
Thymus	++	5/5	Endothel, mononukleäre Zellen
ZNS	++	5/5	Endothel, Neuronen, Neuroglia
Auge		n. u. *	
Niere	++	5/5	Endothel, Tubuli

**Fortsetzung: Nachweis von Influenzavirusantigen bei TG24-01/05-infizierten sieben Wochen alten Hühnern**

Organ	Antigennachweis <sup>#</sup>		Zelltyp (ggf. abweichende Anzahl positiver Tiere <sup>§</sup> )
	Quantität	Anzahl	
Nebenniere	+++	5/5	Endothel, Rinde, Mark, PNS (2)
Gonade	+++	5/5	Endothel, Thekazellen (3), spinozelluläres Bindegewebe (3), Interstitium Hoden (2), PNS (1)
Skelettmuskel		n. u.	
Haut	+++	5/5	Endothel, Federfollikel (4)

<sup>#</sup> Semiquantitativer Antigennachweis: + (vereinzelt), ++ (herdförmig), +++ (konfluent bis diffus)

\* n. u. = nicht untersucht

<sup>§</sup> Anzahl positiver Tiere: Angabe zur Tierzahl mit Antigennachweis im aufgeführten Zelltyp erfolgt, wenn die Anzahl der betroffenen Tiere von der Angabe der vorangehenden Spalte abweicht

**4.2.2.1.3 Befunde nach HPAIV-Infektion von sechs bis acht Wochen alten Hühnern**

Im Zusammenhang mit Vakzinestudien (Schroer et al., 2009; Kalhoro et al., 2009) erfolgte die Infektion wie beschrieben in Tab. 4. Fünf weitere Hühner dienten als nicht infizierte Kontrolltiere.

**Empfänglichkeit, Überlebensdauer, Klinik**

Die Tiere erkrankten in einem Zeitraum zwischen 24 und 48 h. Sie waren lethargisch, zeigten gestäubtes Gefieder, Schnabelatmung und ödematöse Schwellungen des Kopfes. In der Gruppe der sechs Wochen alten Hühner verstarben zwei Tiere drei Tage p. i. Die übrigen Hühner erlagen nach vier Tagen der Infektion.

**Makroskopische Befunde**

Alle Hühner wiesen einen klaren, zähen Schleim im Kehlkopf und im Schnabel auf. Bei zahlreichen Tieren lag eine ausgedehnte Blutungsneigung vor. Petechien und Ekchymosen fanden sich in der Haut vorwiegend im Bereich des Tarsometatarsus, Kamms und Kehllappens, im Myokard und Herzkranzfett, in Konjunktiva und Sklera, in den Magenschleimhäuten (Abb. 21, A) sowie in den Drüsenausführungsgängen des Drüsen-

magens. Multifokale, scharf begrenzte Koagulationsnekrosen waren im Pankreas, ausgedehnte Nekrosen der Haut am Kamm zu finden (Abb. 21, B). Ein subkutanes Ödem im Kopfbereich fand sich in drei Tieren. Die Nieren weniger Tiere erschienen blass-braun und geschwollen. Ein Tier zeigte ein hochgradiges Hydroperikard.

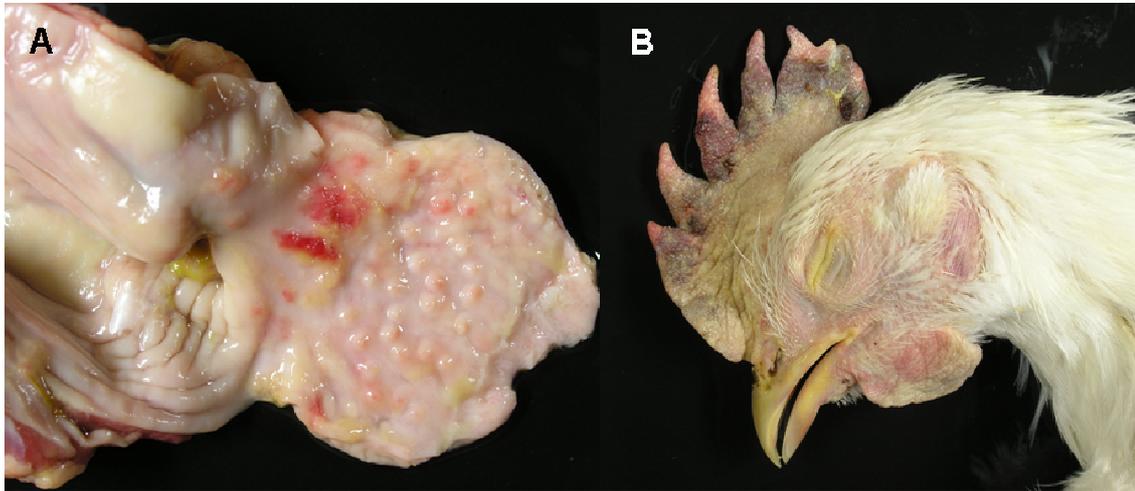


Abb. 21: **Drüsenmagen und Kopf, Huhn infiziert mit 445/99 (H7N1)**. Magenschleimhautblutungen am Übergang vom Drüsen- zum Muskelmagen (A), ausgedehnte Hautnekrosen am Kamm (B).

### **Histopathologische und immunhistochemische Befunde**

Neben einer gemischtzelligen, teils nekrotisierenden Rhinitis war das respiratorische Epithel weitgehend desquamiert. Im darunterliegenden Bindegewebe lag eine Proliferation der Fibroblasten vor. Entsprechende Veränderungen fanden sich in der Trachea. Das Parenchym der Lunge war gestaut und zeigte ein interstitielles und alveoläres Ödem. Neben der Proliferation von Pneumozyten Typ II und der Einwanderung zahlreicher Makrophagen war das Alveolar- und Bronchialepithel weitgehend degeneriert, teils nekrotisch und gemischtzellig infiltriert. Dabei fanden sich ausgedehnte Fibrinmengen in den Bronchien und Alveolen, und gelegentlich waren kapillare Thromben nachweisbar. Regelmäßig lagen multifokale Degenerationen der Kardiomyozyten (Verlust der Querstreifung), der Hepatozyten, der Tubulusepithelien der Niere, der interrenalen Zellen der Nebenniere (vakuoläre Degeneration, Kernwandhyperchromatose) und der glatten Muskulatur des Muskelmagens (hypereosinophil) vor. Im Herz waren multifokal meist subepikardial gelegene Blutungsherde zu finden, zum Teil begleitet von einer lymphohistiozytären Myokarditis. Die ausgedehnten Koagulationsnekrosen des Pankreasparenchyms, vorwiegend des exokrinen Anteils,

waren in der Gruppe der sechs Wochen alten Tiere hochgradig und häufiger ausgeprägt als bei den älteren Tieren. Die Schleimhaut des Drüsenmagens war ödematös und häufig lymphohistiozytär infiltriert. In Bursa, Milz und Zäkum lag eine mittel- bis hochgradige Depletion der Lymphfollikel mit zahlreichen schaumig-degenerierten Retikulumzellen und Lymphozytennekrosen vor. Die Depletion der Lymphozyten im Thymus war geringgradig ausgeprägt. Im ZNS fanden sich ausgedehnte Nekroseherde von Neuronen und Neuroglia, eine aktivierte Mikroglia mit Bildung von Gliaknötchen mit Neuronophagie. Gelegentlich war eine geringgradige lymphohistiozytäre Meningoenzephalitis festzustellen. Bei zwei Tieren fand sich eine gemischtzellige Konjunktivitis. Eine detaillierte Übersicht der immunhistologischen Befunde infizierter Hühner findet sich in Tab. 27. Bei allen infizierten Tieren lag ein **Neurotropismus**, **Epitheltropismus** und **Endotheltropismus** vor. Die Organe der nicht infizierten Kontrolltiere waren frei von Läsionen und Influenzavirusantigenen.

Tab. 27: **Nachweis von Influenzavirusantigen bei 445/99 (H7N1)-infizierten, sechs bis acht Wochen alten Hühnern**

Organ	Antigennachweis <sup>#</sup>		Zelltyp (ggf. Anzahl positiver Tiere <sup>§</sup> )
	Quantität	Anzahl	
Schnabel	+++	10/10	Endothel, resp. Epithel (3), mononukleäre Zellen (3)
Trachea	++	8/10	Endothel (7), Epithel (4), mononukleäre Zellen (3), glatte Muskulatur (1)
Lunge	+++	10/10	Endothel, (Para-) Bronchialepithel (2), Pneumozyten, mononukleäre Zellen
Herz	+++	10/10	Endothel, Kardiomyozyten
Drüsenmagen	+	8/10	Endothel, Drüsenepithel (1), Mukosaepithel (2), mononukleäre Zellen (1)
Muskelmagen	++	10/10	Endothel, Mukosaepithel (3), glatte Muskulatur (2), mononukleäre Zellen (1)
Duodenum	+	10/10	Endothel, mononukleäre Zellen (2)
Zäkum	+	7/10	Endothel, mononukleäre Zellen (3), glatte Muskulatur (1), PNS (1)
Pankreas	+++	10/10	Endothel, Azini (9), PNS (1)
Leber	++	6/10	Endothel, Hepatozyten, Kupffer-Zellen (5)

**Fortsetzung: Nachweis von Influenzavirusantigen bei 445/99 (H7N1)-infizierten, sechs bis acht Wochen alten Hühnern**

Organ	Antigennachweis <sup>#</sup>		Zelltyp (ggf. abweichende Anzahl positiver Tiere <sup>§</sup> )
	Quantität	Anzahl	
Milz	++	8/10	Endothel (7), mononukleäre Zellen
Bursa	++	8/10	Endothel, mononukleäre Zellen (4)
Thymus	++	7/7	Endothel, mononukleäre Zellen (5)
ZNS	+++	10/10	Endothel, Neuronen, Neuroglia mit Ependym
Auge	+	4/5	Endothel, Skleraepithel (1)
Niere	++	9/10	Endothel (8), Tubuli, mononukleäre Zellen (2)
Nebenniere	++	7/7	Endothel (5), Rinde, PNS (1)
Gonade	++	6/8	Endothel (5), Interstitium Testis (1), Thekazellen (1), spinozelluläres Bindegewebe (1)
Skelettmuskel	+	7/7	Endothel
Haut	+	7/9	Endothel

<sup>#</sup> Semiquantitativer Antigennachweis: + (vereinzelt), ++ (herdförmig), +++ (konfluent bis diffus)

<sup>§</sup> Anzahl positiver Tiere: Angabe zur Tierzahl mit Antigennachweis im aufgeführten Zelltyp erfolgt, wenn die Anzahl der betroffenen Tiere von der Angabe der vorangehenden Spalte abweicht

#### 4.2.2.2 Entenvögel

##### 4.2.2.2.1 Befunde nach HPAIV-Infektion von Höckerschwänen

Die experimentelle Infektion von adulten Höckerschwänen (*Cygnus olor*) erfolgte wie in Tab. 4 angegeben. Zu den Tieren, die die niedrige Dosis von  $10^4$  EID<sub>50</sub> pro Tier („S<sub>4</sub>“) erhielten, wurden am ersten Tag p. i. zwei Tiere als Kontaktkontrollen zugestellt. Unter den Schwänen, die mit  $10^6$  EID<sub>50</sub> („S<sub>6</sub>“) infiziert wurden, befand sich ein Tier mit präexperimentellen Antikörpern gegen Influenza A. Dieser S<sub>6</sub>-Gruppe wurde einen Tag p. i. je ein serologisch AIV-positives und ein AIV-negatives Tier als Kontaktkontrolle zugestellt (Kalthoff et al., 2008).

### **Empfänglichkeit, Überlebensdauer, Klinik**

Die Tiere der S<sub>4</sub>-Gruppe erkrankten ab dem siebten Tag, die der S<sub>6</sub>-Gruppe nach vier Tagen. Der überwiegende Teil der Schwäne war lethargisch. Drei Vögel verstarben ohne klinische Symptome. Drei weitere Tiere zeigten zentralnervöse klinische Erscheinungen wie Opisthotonus, Torticollis und Ataxie. Gelegentlich wurden erkrankte Schwäne von ihren Gruppenmitgliedern am Schnabel attackiert und dadurch von der Gruppe abgesondert.

Die beiden Schwäne mit präexperimentell nachweisbaren Antikörpern überlebten bis zum Versuchsende 21 Tage p. i. Alle Tiere der S<sub>6</sub>-Gruppe verstarben zwischen dem fünften und neunten Tag p. i. Innerhalb der S<sub>4</sub>-Gruppe erlagen die Schwäne zwischen dem achten und vierzehnten Tag p. i. der Infektion, das größte Tier dieser Gruppe überlebte bis zum Versuchsende.

### **Makroskopische Befunde**

Bei Tieren beider Gruppen stand als Hauptbefund eine ausgedehnte Blutungsneigung im Vordergrund. Es fanden sich Petechien und Ekchymosen in zahlreichen Parenchymenten und auf den serösen Häuten (Abb. 22, A, C, D). Darüber hinaus lagen häufig ein diffuses, alveoläres Lungenödem sowie Ergüsse in die Körperhöhlen und das Perikard vor. Pankreasnekrosen waren bei zwei Tieren feststellbar (Abb. 22, D). Der Darm von Tieren, die ZNS Symptome aufwiesen, war mit geringen Mengen Ingesta gefüllt. Vereinzelt kamen eine mukopurulente Rhinitis (akut, mittelgradig, diffus), eine serofibrinöse Polyserositis (Akut, hochgradig, diffus) und Erosionen am Schnabel vor. Einblutungen in das Myokard und ein diffuses, alveoläres Lungenödem konnten auch bei den Tieren festgestellt werden, die am Tag 21 p. i. euthanasiert wurden.

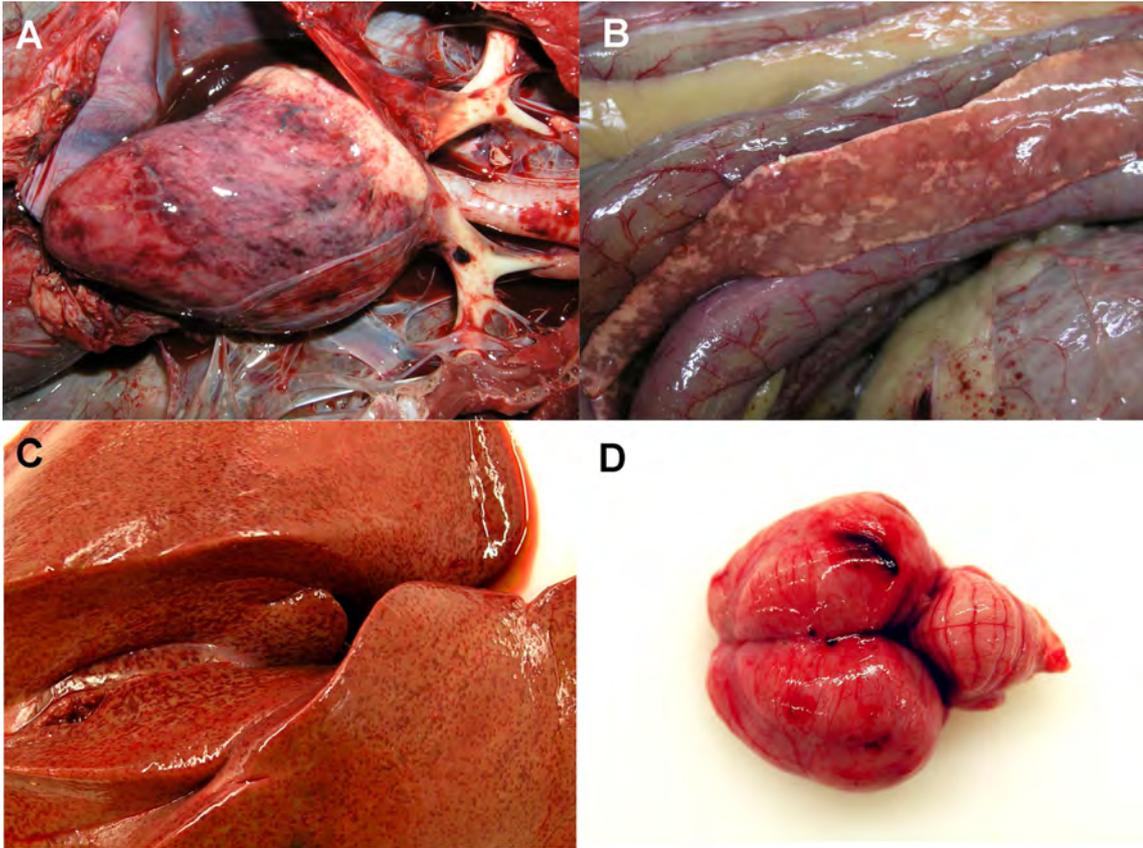


Abb. 22: **Makroskopische Veränderungen nach R65/06-Infektion bei Schwänen.** Multifokale, streifenförmige Blutungsherde im Myokard (A), großflächig konfluierende Koagulationsnekrosen im Pankreas (B), multifokale Petechien in der Leber (C) und submenigeale Blutungen an den Großhirnhemisphären (D).

### **Histopathologische und immunhistochemische Befunde**

Histologisch fanden sich Blutungen in den Meningen der Großhirnhemisphären, in der Lunge, dem Herz, der Niere und der Leber. In der Schnabelhöhle fand sich häufig eine gemischtzellige Rhinitis mit intraläsionalen Bakterienwolken und Nekrosen des respiratorischen Epithels. In der Lunge lag ein diffuses, alveoläres Lungenödem vor. Es konnten bei fünf Schwänen Koagulationsnekrosen des Pankreas festgestellt werden, die geringgradig von einer gemischtzelligen Pankreatitis begleitet wurden. Korrespondierend zu Degenerations- und Nekroseherden in der Leber (Hepatozyten), der Niere (Tubuli) und dem Ovar (Thekazellen) und der Nebennieren (interrenale Zellen) erfolgte der Nachweis von Influenzavirusantigen. Die Milz war bei vier Vögeln lymphodepletiert, selten lagen eine retikuloendotheliale Hyperplasie oder Lymphozytennekroseherde mit Fibrinausschwitzungen vor. Die Populationen der

periportalen Lymphozyten und Makrophagen der Leber waren vermehrt und häufig mit heterophilen Granulozyten durchsetzt. Im ZNS lagen Einzelzellnekrosen von Neuronen und eine aktivierte Mikroglia mit Bildung von Gliaknötchen vor. Bei neun Tieren fand sich eine geringgradige vorwiegend lymphohistiozytäre Meningoenzephalitis. Darunter waren auch Tiere, die die Infektion überlebt hatten. Auch im PNS war der AIV-Antigennachweis mit Neuronennekrosen assoziiert.

Einzeltiere zeigten eine Depletion der Lymphfollikel der Zäkaltonsille, herdförmige Epithelnekrosen der Trachea, eine mittelgradige, herdförmige, eine heterophile Pneumonie mit Pneumozytennekrosen, Trematoden (nicht klassifiziert) in Blutgefäßen von Duodenum, Jejunum, Ileum, Kolon, Nebenniere und Ovar, eine Dilatation der Lymphgefäße im Darm, eine granulomatöse Hepatitis und Splenitis (mit intraläsionalen Trematoden) und eine mittelgradige, diffuse Polyserositis. Eine detaillierte Übersicht der immunhistologischen Befunde infizierter Höckerschwäne findet sich in Tab. 28. Bei Schwänen, die bis zum Versuchsende überlebten, konnte kein Influenzavirusantigen nachgewiesen werden. Die Klassifikation des Tropismus in **Neuro-, Epithel- und Endotheltropismus** ist in Tab. 29 dargestellt. In Abb. 23 ist beispielhaft der immunhistochemische Antigennachweis in Cerebrum (A), Retina (B), Leber (C), Federfollikel (D), Haut (E) und Nasenmuschel (F) zu finden.

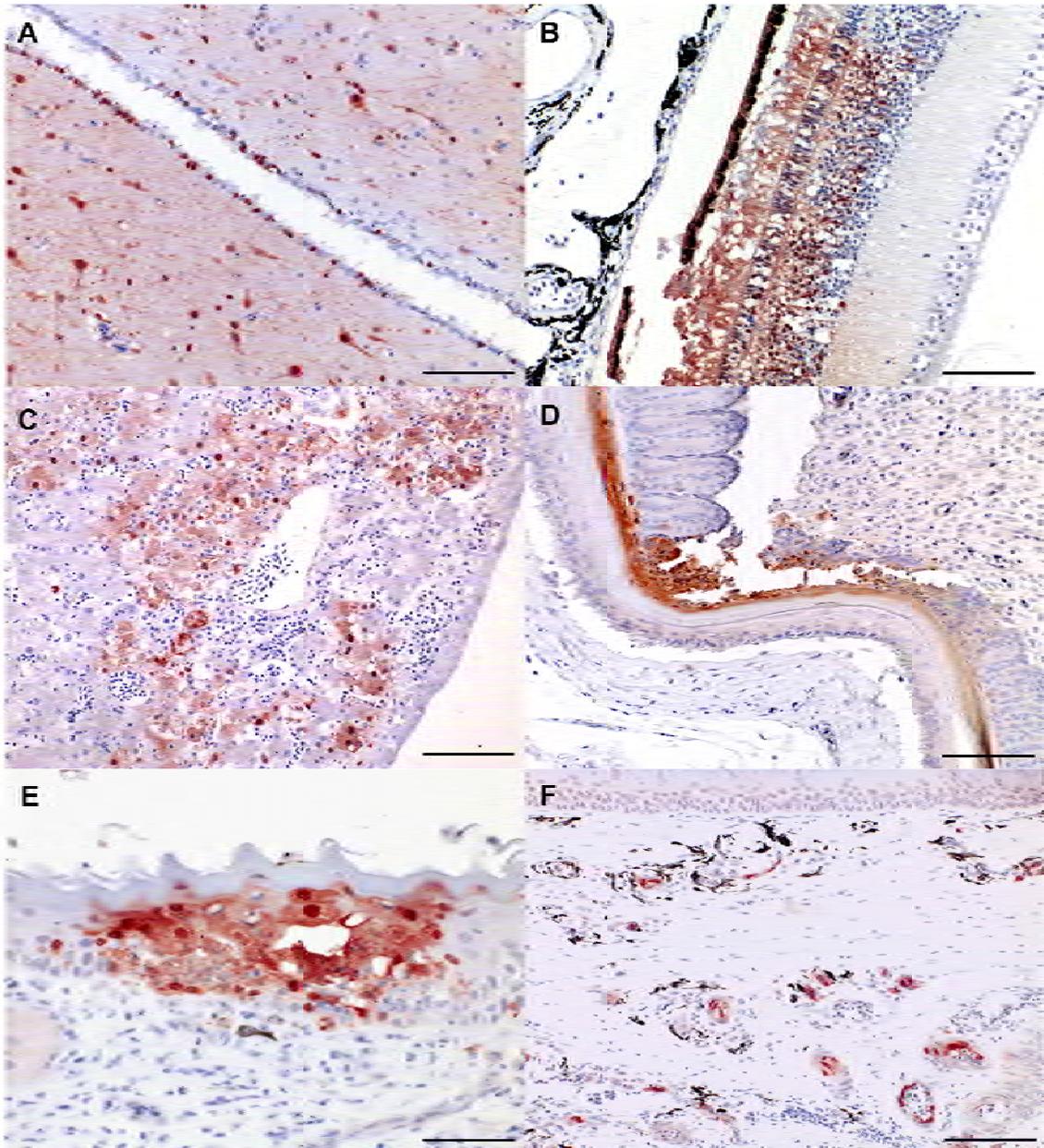


Abb. 23: **Immunhistochemischer Nachweis des Influenza A Virus NP in Geweben R65/06-infizierter Höckerschwäne.** ABC-Methode mit AEC-Färbung und Hämalaun-Gegenfärbung. (A) Cerebrum: Antigensignal in Neuronen und Glia- und Ependymzellen, Bar 200  $\mu\text{m}$ . (B) Auge, Retina. Zellen der pigmentierten Epithelschicht, Photorezeptorzellen und der inneren und äußeren Körnerschicht zeigen rot-braune Signale. Bar 100  $\mu\text{m}$ . (C) Leber. Degenerierte Hepatozyten mit AIV-Antigensignalen. Bar 100  $\mu\text{m}$ . (D) Haut. Positive Zellen der Keratinschicht von einem Federfollikel. Bar 100  $\mu\text{m}$ . (E) Nasenmuschel, nicht-respiratorische Schleimhaut. Intraepitheliale Nekrosen mit korrespondierendem Antigennachweis. Bar 50  $\mu\text{m}$ . (F) Nasenmuschel. Disseminierter AIV-Nachweis in Endothelzellen subkutaner Blutgefäße. Bar 100  $\mu\text{m}$  (Kalthoff et al., 2008).

Tab. 28: Nachweis von Influenzavirusantigen bei R65/06-infizierten Höckerschwänen

Organ	Quantität	Antigennachweis <sup>#</sup>		Anzahl Gesamt	Zelltyp (ggf. abweichende Anzahl positiver Tiere <sup>§</sup> )
		10 <sup>4</sup> EID <sub>50</sub>	10 <sup>6</sup> EID <sub>50</sub>		
		Anzahl			
Schnabel	++	2/7	2/7	4/14	Endothel (3), nichtresp. Epithel (3)
Trachea	+	1/7	1/7	2/14	Endothel
Lunge	++	2/7	2/7	4/14	Endothel (3), Pneumozyten, Bronchien (1)
Herz	+	1/7	1/7	2/14	Endothel, Kardiomyozyten
Drüsenmagen	+	1/7	1/7	2/14	Endothel
Muskelmagen	+	0/5	1/5	1/10	Endothel
Duodenum	++	1/6	1/7	1/13	Endothel (1), Glatte Muskulatur
Zäkum	++	1/7	1/7	2/14	Endothel, Drüsenepithel und PNS (1)
Pankreas	+++	3/7	4/7	7/14	Endothel (2), Azini
Leber	+	2/7	2/7	4/14	Endothel (3), Hepatozyten, Gallengangsepithel
Milz	+	2/7	1/7	3/14	Endothel (2), mononukleäre Zellen (2)
Bursa	+	0/5	1/5	1/10	Endothel
Thymus	+	1/6	0/2	1/8	Endothel
ZNS	+++	6/7	5/7	11/14	Endothel (1), Neuronen, Neuroglia mit Ependym
Auge	+++	2/6	2/3	4/9	Endothel (1), Neuronen der Retina
Niere	+	1/7	1/7	2/14	Endothel, Tubuli
Nebenniere	+++	2/7	3/7	5/14	Endothel (1), Rinde, Mark, PNS (2)
Gonade	++	3/7	3/7	5/14	Thekazellen (4), Spermatozoen (1), PNS (1), Ovariepithel (4)
Haut	++	1/7	2/7	3/14	Endothel (2), Federfollikelepithel

<sup>#</sup> Semiquantitativer Antigennachweis: + (vereinzelt), ++ (herdförmig), +++ (konfluent bis diffus)

\*n. u. = nicht untersucht

<sup>§</sup> Anzahl positiver Tiere: Angabe zur Tierzahl mit Antigennachweis im aufgeführten Zelltyp erfolgt, wenn die Anzahl der betroffenen Tiere von der Angabe der vorangehenden Spalte abweicht

Tab. 29: **Klassifikation des Gewebetropismus nach R65/06-Infektion von Höckerschwänen**

<b>Tropismus</b>	<b>10<sup>4</sup> EID<sub>50</sub></b>	<b>10<sup>6</sup> EID<sub>50</sub></b>	<b>Gesamt</b>
Neurotropismus	6/7	5/7	11/14
Epitheltropismus	3/7	4/7	7/14
Endotheltropismus	2/7	1/7	3/14

#### **4.2.2.2.2 Befunde nach HPAIV-Infektion von drei Entenspezies**

Die untersuchten Tiere gehen aus Tab. 4 hervor. Je zehn Moschus- und Pekingenten und acht Stockenten erhielten das Isolat TG24-01/05. Ebenso viele Tiere erhielten R65/06. Zum Nachweis des Influenzavirusantigens wurde die Hälfte der Tiere vier Tage p. i. unter Narkose (Isofluraninhalation) durch Blutentzug getötet. Zeigten die Tiere zentralnervöse klinische Erscheinungen wie Tremor, Opisthotonus und Ataxien, wurden die Tiere ebenfalls getötet. Von jeder Spezies dienten zwei Tiere als Kontrollen.

#### **Empfänglichkeit, Überlebensdauer, Klinik**

##### **Moschusenten**

Innerhalb von zwei Tagen wurden die Moschusenten lethargisch. Drei Tage p. i. erlagen alle Tiere der TG24-01/05-Infektion oder mussten aufgrund schwerer Ataxie, Opisthotonus und Ruderbewegungen getötet werden. Die Infektion mit R65/06 führte drei Tage p. i. bei sieben Tieren zu vergleichbaren Symptomen. An den Tagen vier und sieben mussten zwei weitere Tiere mit zentralnervösen klinischen Erscheinungen getötet werden. Ein Tier überlebte die Infektion und war bis zum achten Tag lethargisch.

##### **Pekingenten**

Vier Tage nach der Infektion mit TG24-01/05 waren die Enten ruhiger und fünf Tiere wurden planmäßig getötet. Bis zum sechsten Tag erlagen die verbliebenen fünf Tiere mit zentralnervösen klinische Erscheinungen der Infektion. Bei R65/06-infizierten Pekingenten konnte bei einem Tier eine Konjunktivitis festgestellt werden. Die übrigen vier und acht Tage p. i. getöteten Tiere zeigten keine Symptome.

### **Stockenten**

Die Infektion mit TG24-01/05 führte ab dem vierten Tag zu Lethargie. Nach planmäßiger Tötung von vier Tieren mussten bis zum sechsten Tag zwei weitere Enten aufgrund zentralnervöser klinischer Erscheinungen getötet werden. Die bis zum Versuchsende überlebenden Enten zeigten eine geringgradige Kopfschiefhaltung und waren lethargisch. Stockenten, die mit R65/06 infiziert wurden, überlebten bis zum Versuchsende ohne klinische Symptome.

### **Makroskopische Befunde**

#### **Moschusenten**

Als pathomorphologische Hauptbefunde fanden sich ausgedehnte Koagulationsnekrosen des Pankreas und ein gestautes, ödematisiertes Lungenparenchym. Zwei Tiere zeigten keine Pankreasnekrosen nach der R65/06-Infektion und drei Tiere dieser Gruppe keine Veränderungen in der Lunge. Darüber hinaus wiesen Einzeltiere, nach TG24-01/05-Infektion, Leberparenchymnekrosen, eine Rhinitis, blasse und geschwollene Nieren auf. Blutungen waren am Schnabel, in der Nasenschleimhaut, der Haut der Gliedmaßen, der Pia mater des ZNS und im Meckelschen Divertikel zu finden.

#### **Pekingenten**

Die Infektion mit R65/06 führte bei acht Tieren, die Infektion mit TG24-01/05 bei vier Tieren zu Koagulationsnekrosen des Pankreas. Je drei Tiere pro Virusgruppe zeigten ein Hydroperikard, zum Teil begleitet von Myokardblutungen oder einer hellbeigen, streifigen Verfärbung der Muskulatur (Abb. 24). Vereinzelt fanden sich in Pekingenten beider Virusgruppen eine Luftsackentzündung, ein Lungenödem (Abb. 24) mit Lungenstauung, eine lymphohistiozytäre Epikarditis, ein Ascites, eine folliculäre Hyperplasie der Milz sowie Blutungen im Schnabel, in der Nasenschleimhaut und im Drüsenmagen. Zwei Pekingenten waren frei von Läsionen nach der TG24-01/05-Infektion.

### Stockenten

Koagulationsnekrosen des Pankreas fanden sich in zwei Stockenten nach TG24-01/05-Infektion. Vereinzelt traten eine Entzündung der Luftsäcke, ein gestautes und ödematisiertes Lungenparenchym, eine Thymusatrophie und eine Trübung des Kammerwassers (Iridozyklitis) in beiden Virusgruppen auf. Drei TG24-01/05-infizierte und sechs R65/06-infizierte Stockenten zeigten keine Veränderungen.



Abb. 24: **Thoraxübersicht einer TG24-01/05-infizierten Pekingente.** Das Myokard erscheint hellbeige, streifig (Pfeil: Myokarddegeneration, Myokarditis), aus dem Lungengewebe tritt feinblasig-weiße Flüssigkeit hervor (Lungenödem).

### **Histopathologische und immunhistochemische Befunde**

Die Organe der Kontrolltiere waren frei von Läsionen und Influenzavirusantigen. Eine detaillierte Übersicht der immunhistologischen Befunde infizierter Enten findet sich in den Tab. 30 bis Tab. 35.

### **Moschusenten**

In den Geweben ging die zelluläre Degeneration oder Nekrose mit dem Nachweis des Virusantigens einher. Entzündliche Reaktionen zeigten sich häufig begleitend in der Schnabelhöhle (gemischtzellige Rhinitis), der Trachea (gemischtzellige Tracheitis), der Leber (gemischtzellige Hepatitis), der Milz (heterophile Splenitis), der Nebenniere (heterophile Adrenalitis), der Haut (heterophile Follikulitis), im Thymus (heterophile Entzündung), im Auge (gemischtzellige Choroiditis) und in betroffenen Ganglien oder Neuronen (lymphozytäre Ganglioneuritis). In der Lunge wiesen wenige Tiere eine geringgradige Infiltration mit heterophilen Granulozyten auf. Ein Tier hatte eine ausgedehnte fibrinös-nekrotisierende Pneumonie (Abb. 25: Nachweis des Influenza A Virus NP im Parabronchialepithel). In das Lungenparenchym eingewanderte Makrophagen beinhalteten häufig phagozytiertes, nekrotisches Material. Die lymphatischen Strukturen wie Milz, Bursa, Thymus und GALT waren häufig lymphodepletiert und von zahlreichen Histozyten infiltriert. Diese wiesen erneut nekrotisches Material im Zytoplasma auf. Daneben fanden sich ausgedehnte Nekrosen der Lymphozyten und Makrophagen. Im ZNS lag frequent eine aktivierte Mikroglia mit Bildung von Gliaknötchen vor. Eine teils heterophile, teils lymphozytäre Meningoenzephalitis war gelegentlich zu finden.

Tab. 30: Nachweis von Influenzavirusantigen bei TG24-01/05-infizierten Moschusenten

Organ	Antigennachweis <sup>#</sup>		Zelltyp (ggf. abweichende Anzahl positiver Tiere)
	Quantität	Anzahl	
Schnabel	++	10/10	Drüsen-, Gaumenepithel (9), (nicht-) respiratorisches Epithel (4), Tunica media (3), Nervus trigeminus (6)
Trachea	+	6/10	Epithel
Lunge	++	10/10	Bronchialepithel, Parabronchialepithel (2), Pneumozyten (3), Tunica media (1)
Herz	++	9/9	Kardiomyozyten
Drüsenmagen	+	3/8	Mukosaepithel (1), Tunica media (1), Myozyten (2)
Muskelmagen	+	2/10	Mukosaepithel (1), Muskelzellen (1)
Duodenum	++	5/10	Mukosaepithel (1), spindelförmige Zellen (5), Tunica media (1), Myozyten (2), PNS (2)
Zäkum	+	2/10	Mononukleäre Zellen
Pankreas	+++	10/10	Azini
Leber	++	5/10	Hepatozyten (3), Gallengangsepithel (4)
Milz	++	7/10	Mononukleäre Zellen, Tunica media (1), Fibrozyten (1)
Bursa	++	7/8	Mononukleäre Zellen
Thymus	++	8/8	Mononukleäre Zellen
ZNS	++	10/10	Neuronen, Gliazellen (9), Ependym (6), Meningen (2), Plexus choroideus (2)
Auge	++	10/10	Myozyten (2), Konjunktiva (6), Korneaepithel (2), Pecten oculi (3), PNS (1), Tunica media (2), Choroidea: spindelförmige (7) und pigmentierte Zellen (3)
Niere	++	10/10	Tubuli
Nebenniere	++	10/10	Rinde, Mark, PNS (1)
Gonade	++	4/9	PNS (1), Epithel (1), spinozelluläres Bindegewebe (1), Interstitium Testis (2)
Skelettmuskel	+	6/10	Myozyten, Tunica media (2)
Haut	++	6/8	Keratinozyten der Federfollikel

<sup>#</sup> Semiquantitativer Antigennachweis: + (vereinzelt), ++ (herdförmig), +++ (konfluent bis diffus)

Tab. 31: Nachweis von Influenzavirusantigenen bei R65/06-infizierten Moschusent

Organ*	Antigennachweis #		Zelltyp (ggf. abweichende Anzahl positiver Tiere§)
	Quantität	Anzahl	
Schnabel	++	9/9	(Nicht-) resp. Epithel, Gaumenepithel, Tunica media (2), Nervus trigeminus (2), Drüsenepithel (5)
Trachea	++	6/10	Epithel
Lunge	++	8/10	Parabronchial- (6), Bronchialepithel (7), Pneumozyten (5)
Herz	+	7/10	Kardiomyozyten
Drüsenmagen	+	1/10	Tunica media
Muskelmagen	-	0/10	
Duodenum	++	8/10	PNS
Zäkum	+	7/10	PNS (6), Myozyten (2)
Pankreas	++	9/10	Azini
Leber	++	8/10	Hepatozyten
Milz	+	3/8	Fibrozyten
Bursa	++	8/10	Mononukleäre Zellen, PNS (1)
Thymus	++	8/9	Mononukleäre Zellen
ZNS	+++	8/9	Neuronen, Gliazellen, Ependym
Auge	++	7/9	Neuronen (4), spindelförmige Zellen, Choroidea (4), Korneaepithel (3), Konjunktiva (1), Muskulatur (1), Tunica media (1)
Niere	++	1/10	Tubuli
Nebenniere	++	7/9	Rinde, Mark, PNS (2)
Gonaden	+	1/9	Spinozelluläres Bindegewebe
Skelettmuskel	-	0/9	
Haut	++	9/10	Keratinocyten, Federfollikel

# Semiquantitativer Antigennachweis: + (vereinzelt), ++ (herdförmig), +++ (konfluent bis diffus)

§ Anzahl positiver Tiere: Angabe zur Tierzahl mit Antigennachweis im aufgeführten Zelltyp erfolgt, wenn die Anzahl der betroffenen Tiere von der Angabe der vorangehenden Spalte abweicht

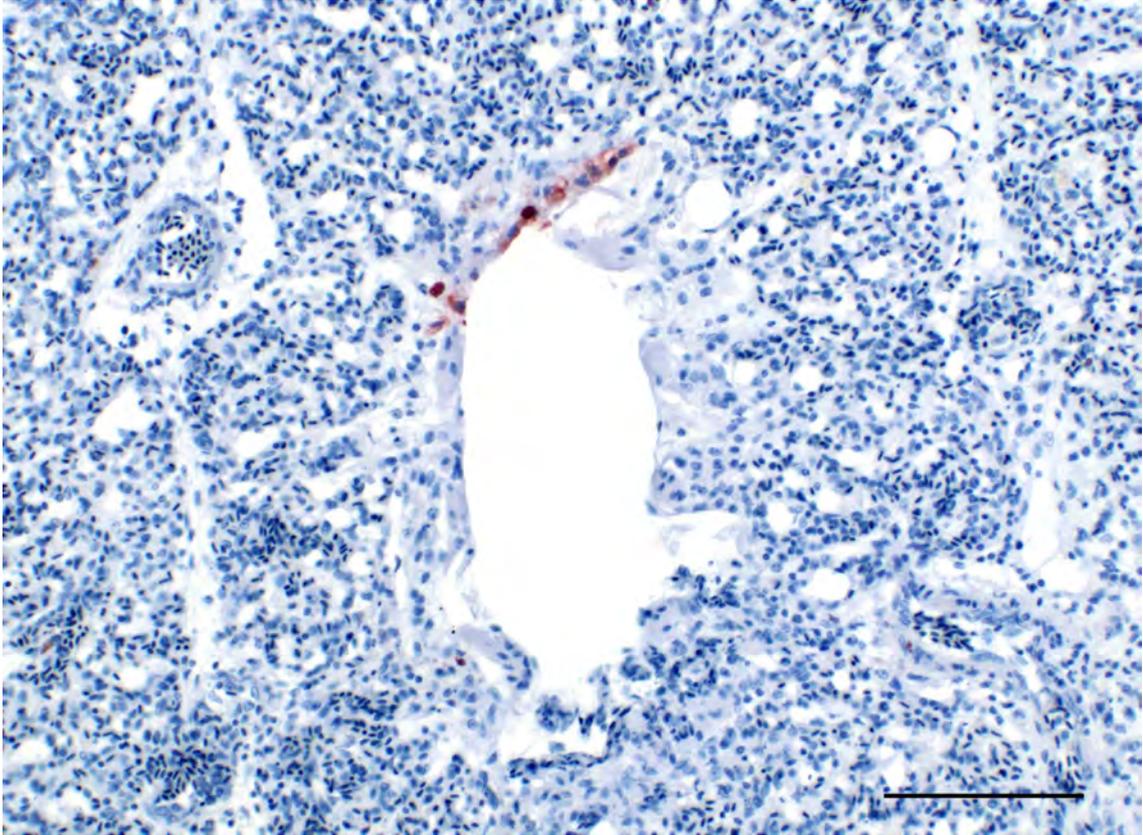


Abb. 25: **Lunge einer TG24-01/05 H5N1-infizierten Moschusente. Immunhistochemischer Nachweis des Influenza A Virus NP.** ABC-Methode mit AEC-Färbung und Hämalaun-Gegenfärbung. Im Parabronchialepithel vereinzelte Antigen-signale. Bar 100  $\mu$ m.

### **Pekingenten**

Die beschriebenen histopathologischen Befunde der Moschusenten lagen in vergleichbarer Weise antigenassoziiert in Pekingenten vor. Zusätzlich fand sich in Enten beider Virusgruppen regelmäßig eine lymphohistiozytäre Myokarditis. Die Ausprägung einer gemischtzelligen Pneumonie trat häufiger auf als bei Moschusenten. In der Milz fiel bei vier Tieren eine ausgeprägte Lymphozytostase in den großen Blutgefäßen auf.

Tab. 32: Nachweis von Influenzavirusantigen bei TG24-01/05-infizierten Pekingenten

Organ*	Antigennachweis <sup>#</sup>		Zelltyp (ggf. abweichende Anzahl positiver Tiere <sup>§</sup> )
	Quantität	Anzahl	
Schnabel	++	10/10	Tunica media (6), Gaumenepithel (8), Nervus trigeminus (2), mononukleäre Zellen (3), Drüsenepithel (1), (nicht-) respiratorisches Epithel (3)
Trachea	+	2/10	Mononukleäre Zellen, Muskulatur
Herz	++	4/10	Kardiomyozyten
Drüsenmagen	+	1/10	Myozyten
Pankreas	++	4/10	Azini
Bursa	+	1/7	Mononukleäre Zellen
Thymus	+	1/4	Mononukleäre Zellen
ZNS	++	9/10	Neuronen (8), Gliazellen (8), Ependym (5)
Auge	+	3/10	Kornea (1), spindelförmige Zellen, Choroidea (2), Muskulatur (1)
Nebenniere	++	5/10	Rinde, Mark, PNS (3)
Haut	+	3/10	Keratinozyten, Federfollikel (2), Epidermis (1)

\* Organe: Lunge, Muskelmagen, Duodenum, Zäkum, Leber, Milz, Niere, Gonaden und Skelettmuskel frei von Influenzavirusantigen

<sup>#</sup> Semiquantitativer Antigennachweis: + (vereinzelt), ++ (herdförmig), +++ (konfluent bis diffus)

<sup>§</sup> Anzahl positiver Tiere: Angabe zur Tierzahl mit Antigennachweis im aufgeführten Zelltyp erfolgt, wenn die Anzahl der betroffenen Tiere von der Angabe der vorangehenden Spalte abweicht

Tab. 33: Nachweis von Influenzavirusantigenen bei R65/06-infizierten Pekingenten

Organ*	Antigennachweis <sup>#</sup>		Zelltyp (ggf. abweichende Anzahl positiver Tiere <sup>§</sup> )
	Quantität	Anzahl	
Schnabel	++	2/10	Gaumenepithel, (nicht-) resp. Epithel, Tunica media (1)
Lunge	+	1/10	Pneumozyten
Duodenum	+	1/10	PNS
Pankreas	++	3/10	Azini
ZNS	++	3/10	Neuronen, Gliazellen (1)
Gonaden	+	1/9	PNS
Haut	+	3/10	Keratinocyten, Federfollikel

\*Organe: Trachea, Herz, Drüsenmagen, Muskelmagen, Zäkum, Leber, Milz, Bursa, Thymus, Auge, Niere, Nebenniere und Skelettmuskel frei von Influenzavirusantigen

# Semiquantitativer Antigennachweis: + (vereinzelt), ++ (herdförmig), +++ (konfluent bis diffus)

§ Anzahl positiver Tiere: Angabe zur Tierzahl mit Antigennachweis im aufgeführten Zelltyp erfolgt, wenn die Anzahl der betroffenen Tiere von der Angabe der vorangehenden Spalte abweicht

### Stockenten

In Enten beider Virusgruppen fanden sich vorwiegend gemischtzellige Infiltrate in Nasenschleimhaut, Trachea, Auge, Lunge, Milz, Nebenniere, ZNS und Gonaden. Sowohl die Milz als auch die Bursa und der Thymus waren meist depletiert und von Lymphozytennekrosen durchsetzt. Korrespondierend zu degenerierten oder nekrotischen Zellen konnte der immunhistochemische Antigennachweis erfolgen. Die Degenerationserscheinungen waren in Form von Vakuolen (vorwiegend Pankreasdrüsenzellen), Kernschwellungen und Kernwandhyperchromatose zu sehen. TG24-01/05-infizierte Stockenten zeigten eine ausgedehnte gemischtzellige Myokarditis mit Antigennachweis in Kardiomyozyten.

Tab. 34: Nachweis von Influenzavirusantigen bei TG24-01/05-infizierten Stockenten

Organ*	Antigennachweis <sup>#</sup>		Zelltyp (ggf. abweichende Anzahl positiver Tiere <sup>§</sup> )
	Quantität	Anzahl	
Schnabel	++	6/8	Gaumenepithel (6), (nicht-) respiratorisches Epithel (5), Tunica media (2), Nervus trigeminus (3)
Trachea	+	1/8	Epithel
Herz	++	6/8	Kardiomyozyten
Pankreas	+	3/8	Azini
Bursa	+	1/8	Mononukleäre Zellen
Thymus	++	4/5	Mononukleäre Zellen
ZNS	+++	7/8	Neuronen, Gliazellen, Ependym
Auge	+	2/8	Pigmentierte Zellen der Choroidea
Nebenniere	++	2/8	Rinde, Mark, PNS (1)

Legende: siehe Tab. 35

Tab. 35: Nachweis von Influenzavirusantigen bei R65/06-infizierten Stockenten

Organ*	Antigennachweis		Zelltyp (ggf. abweichende Anzahl positiver Tiere <sup>§</sup> )
	Quantität	Anzahl	
Schnabel	++	4/8	Gaumenepithel, (nicht-) respiratorisches Epithel (2)
Bursa	+	1/8	Mononukleäre Zellen
Thymus	+	1/8	Mononukleäre Zellen
ZNS	++	2/8	Neuronen, Gliazellen (1)
Auge	++	1/8	Neuronen

\*Organe: Trachea, Lunge, Herz, Drüsenmagen, Muskelmagen, Duodenum, Zäkum, Pankreas, Leber, Milz, Niere, Nebenniere, Gonade, Skelettmuskel und Haut frei von Influenzavirusantigen

<sup>#</sup> Semiquantitativer Antigennachweis: + (vereinzelt), ++ (herdförmig), +++ (konfluent bis diffus)

<sup>§</sup> Anzahl positiver Tiere: Angabe zur Tierzahl mit Antigennachweis im aufgeführten Zelltyp erfolgt, wenn die Anzahl der betroffenen Tiere von der Angabe der vorangehenden Spalte abweicht

#### 4.2.2.2.3 Nachweis AIV-RNA in Tupferproben

Über den Versuchszeitraum wurden täglich Rachen- und Kloakentupferproben untersucht. Die AIV-RNA wurde, wie unter 3.2.2.2.1 und 3.2.2.2.3 beschrieben, nachgewiesen. Schwellenwertzyklen unterhalb von 35 wurden als AIV-Genom positiv beurteilt (Abb. 26). Der AIV-Genomnachweis der individuellen Rachen- und Kloakentupferproben ist den Abbildungen im Anhang zu entnehmen (Abb. 31 und Abb. 32).

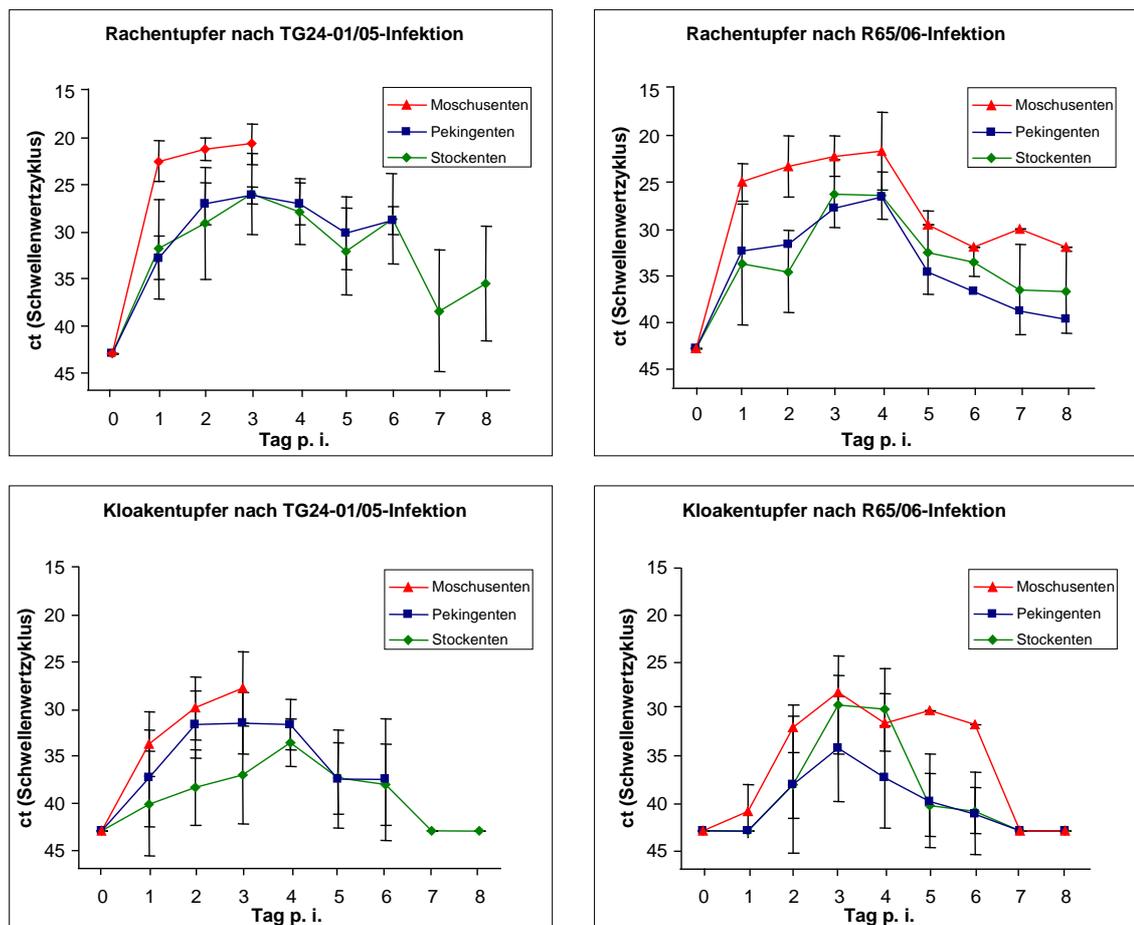


Abb. 26: Nachweis von AIV-RNA in Rachen- und Kloakentupferproben bei HPAIV-infizierten Entenspezies. Mittelwerte und Standardabweichungen der Schwellenwertzyklen untersuchter Rachen- (A und B) oder Kloakentupfer (C und D) von TG24-01/05 (A und C) oder R65/06-infizierten (B und D) Entenspezies

#### 4.2.2.2.4 Nachweis von AIV-RNA und Bestimmung der Virustiter aus Organproben

Der Nachweis der AIV-RNA in Organproben erfolgte wie unter 3.2.2.2.2 und 3.2.2.2.3 beschrieben. Schwellenwerte unterhalb von 32 Zyklen wurden als positiv beurteilt. Die Bestimmung der Virustiter wurde nach den Angaben unter 3.2.1.5 durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Organe ZNS, Lunge und Zäkum aufgeschlüsselt nach der Spezies und dem verwendeten Virusisolat.

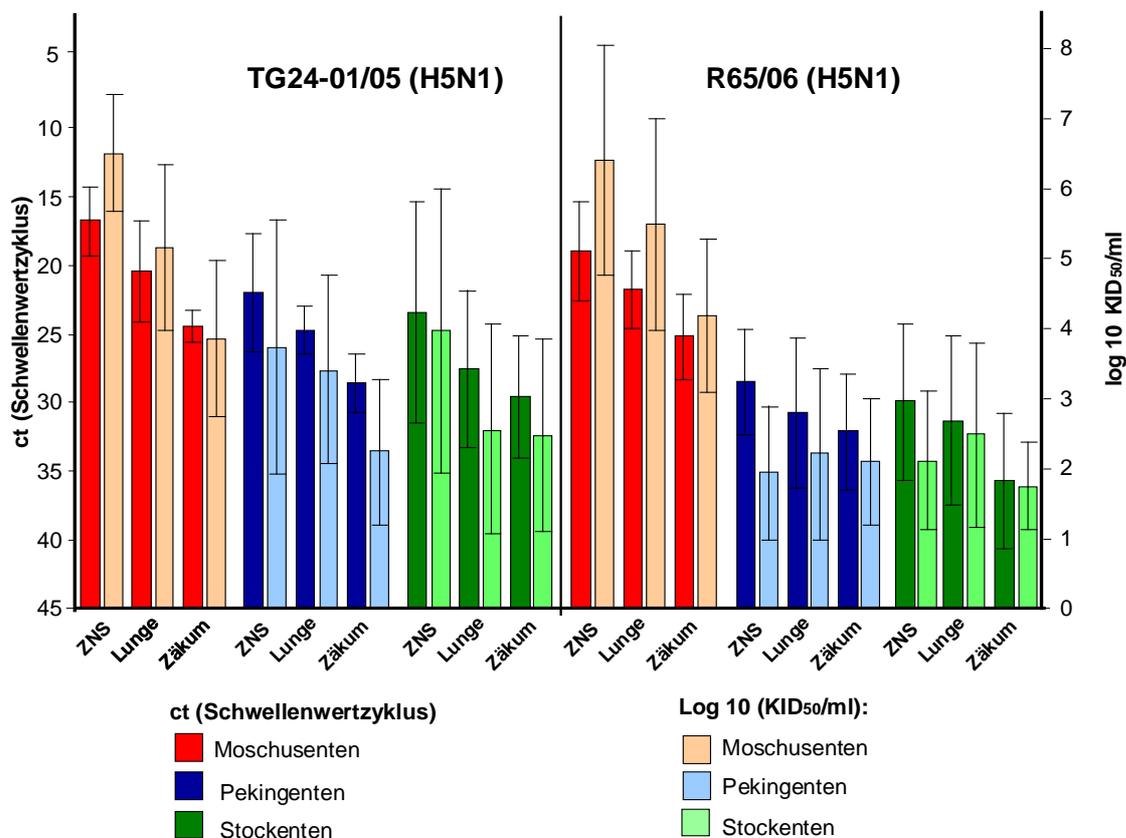


Abb. 27: Virusgenomlast und Virustiter der Organe Gehirn, Lunge und Zäkum R65/06 oder TG24-01/05-infizierter Enten. Mittelwerte und Standardabweichung der Schwellenwertzyklen (linke y-Achse) und KID<sub>50</sub>/ml (rechte y-Achse).

### **4.2.2.3 Sperlingsvögel**

#### **4.2.2.3.1 Befunde nach HPAIV-Infektion von Schwarzkehlchen**

Die untersuchten Tiere gehen aus Tab. 4 hervor (Kalthoff et al., 2009).

#### **Empfänglichkeit, Überlebensdauer, Klinik**

Die Infektion verlief bei 17 Vögeln ohne klinische Symptome. Die Inkubationszeit betrug zwischen drei und fünf Tagen. Ein Tier zeigte zentralnervöse klinische Erscheinungen wie Torticollis und Ataxie, die übrigen fünf Tiere waren lethargisch. Alle 23 infizierten Tiere starben zwischen dem dritten und siebten Tag p. i.

#### **Makroskopische Befunde**

Infizierte und nicht infizierte Vögel zeigten ein gering- bis mittelgradiges Lungenödem sowie eine Stauung des Lungenparenchyms. Vier Schwarzkehlchen wiesen Koagulationsnekrosen im Pankreas auf.

#### **Histopathologische und immunhistochemische Befunde**

In allen Organen war eine Entzündungsreaktion von geringgradigem Ausmaß festzustellen. Insgesamt war die dominierende Zellpopulation (darunter heterophile Granulozyten, Lymphozyten oder Makrophagen) aufgrund der hohen Variabilität nicht allgemein zu bestimmen. Das Epithel der Nasenschleimhaut und Trachea war weitgehend desquamiert, degeneriert (Kernwandhyperchromatose) und nekrotisch. Neben einem Lungenödem (auch bei nicht infizierten Vögeln) war das Parenchym gestaut. Bronchialepitheldegeneration und -nekrosen waren unregelmäßig zu finden. Herde von degenerierten Kardiomyozyten (Verlust der Querstreifung) wurden von einer geringgradigen, lymphohistiozytären Myokarditis umgeben. Die Milz zeichnete sich durch eine hochgradige Depletion mit zahlreichen Lymphozytennekrosen aus. Das Parenchym des Pankreas, der Harderschen Drüse und der Nebenniere zeigte hochgradige, multifokale teils konfluierende Koagulationsnekrosen. Das exokrine Pankreas und die interrenalen Zellen der Nebenniere (Rindenzellen) waren deutlich häufiger von Nekrosen betroffen als das endokrine Pankreas und die chromaffinen Zellen (Markzellen) der Nebenniere. Die Leber zeigte diese Veränderungen in

geringerem Ausmaß. Im ZNS und im peripheren Nervensystem lagen Nekrosen einzelner Neuronen und der Neuroglia vor. Eine Vakuolisierung des Neuropils war häufig, Neuronophagie gelegentlich zu finden. Eine detaillierte Übersicht der immunhistologischen Befunde findet sich in Tab. 36. Während in allen Tieren ein **Neurotropismus** nachgewiesen wurde (vier Tiere mit Antigen in peripheren neuronalen Ganglien, Abb. 28), konnte ein **Epitheltropismus** in 22 von 23 Vögeln festgestellt werden. Hinsichtlich der Klassifikation des **Endotheltropismus** ergab sich, dass zehn Tiere Antigen in Endothelzellen des Pecten oculi aufwiesen. Zwei Tiere aus dieser Gruppe reagierten darüber hinaus im Endothel des Herzens positiv und drei Tiere hatten einen multifokalen Endotheltropismus. Die Organe der Kontrollen waren frei von Influenzavirusantigenen.

Tab. 36: Nachweis von Influenzavirusantigenen bei R65/06-infizierten Schwarzkehlchen

Organ	Antigennachweis #		Zelltyp (ggf. abweichende Anzahl positiver Tiere <sup>§</sup> )
	Quantität	Anzahl	
Schnabel	++	8/9	Respiratorisches Epithel, Drüsenepithel
Trachea	++	10/20	Epithel
Lunge	++	17/23	Pneumozyten, (Para-) Bronchialepithel
Herz	+++	21/23	Endothel (6), Kardiomyozyten, PNS (1) (Abb. 28)
Drüsenmagen	+	3/23	Endothel (2), Serosa (1)
Muskelmagen	+	3/23	Endothel (1), Muskulatur (2)
Darm	+	5/23	Mukosaepithel
Pankreas	+++	22/23	Endothel (1), Azini
Leber	++	4/23	Endothel (3), Hepatozyten
Milz	+	2/13	Endothel
ZNS	+++	19/23	Endothel (1), Neuronen, Neuroglia mit Ependym
Auge	+	14/23	Hardersche Drüse, Endothel des Pecten oculi (10), PNS (1), Epidermis des Augenlides (1)

**Fortsetzung: Nachweis von Influenzavirusantigenen bei R65/06-infizierten Schwarzkehlchen**

Organ	Antigennachweis #		Zelltyp (ggf. abweichende Anzahl positiver Tiere§)
	Quantität	Anzahl	
Niere	+	9/23	Endothel (2), Tubuli (6), PNS (1)
Nebenniere	+++	13/16	Rinde, Mark, PNS (6)
Gonade	+	1/8	Spinozelluläres Bindegewebe
Skelettmuskel	-	0/22	
Haut	+	1/23	Epidermis, Federfollikel

# Semiquantitativer Antigennachweis: + (vereinzelt), ++ (herdförmig), +++ (konfluent bis diffus)

§ Anzahl positiver Tiere: Angabe zur Tierzahl mit Antigennachweis im aufgeführten Zelltyp erfolgt, wenn die Anzahl der betroffenen Tiere von der Angabe der vorangehenden Spalte abweicht

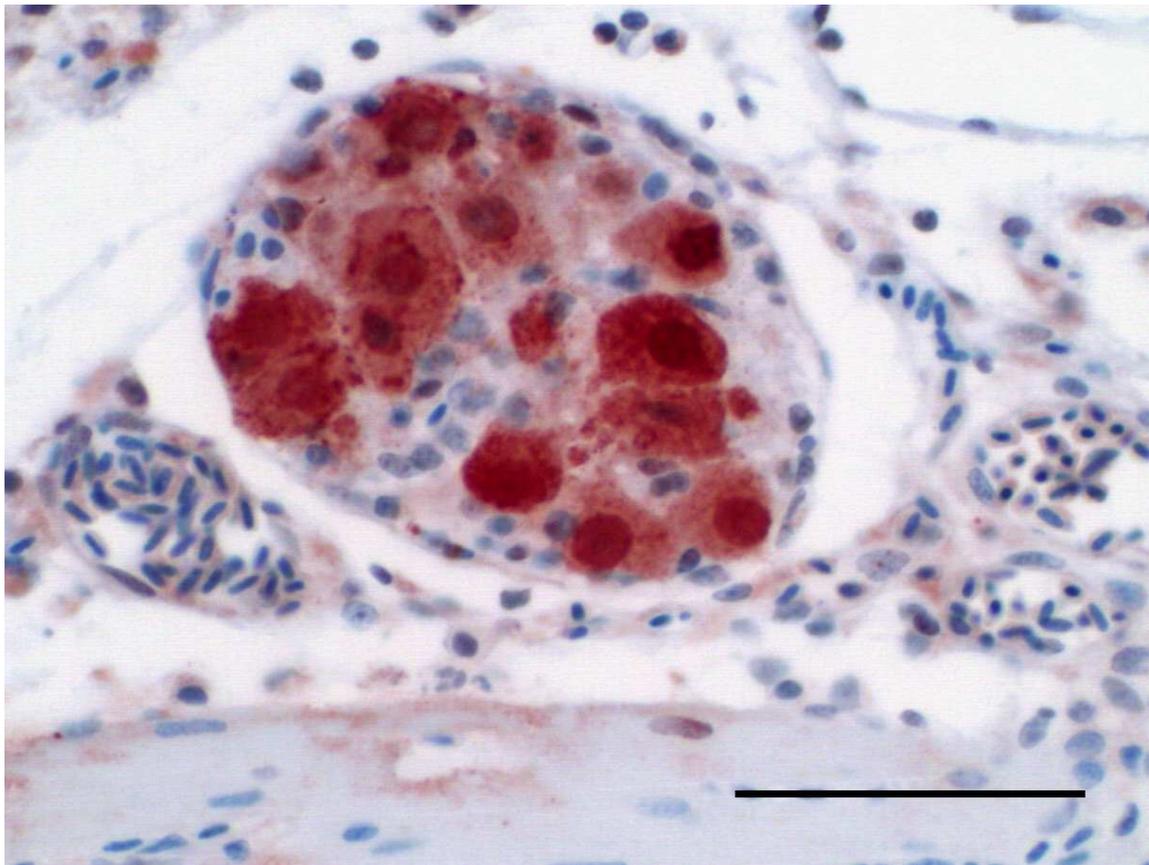


Abb. 28: **Ganglion, subepikardial im Herz eines R65/06-infizierten Schwarzkehlchens. Immunhistochemischer Nachweis des Influenza A NP.** ABC-Methode mit AEC-Färbung und Hämalaun-Gegenfärbung. Antigen signal intrazytoplasmatisch und intranukleär in Neuronen. Bar 50 µm.

#### 4.2.2.3.2 Befunde nach HPAIV-Infektion von Mönchsgrasmücken

Die untersuchten Tiere gehen aus Tab. 4 hervor. Vier nicht infizierte Mönchsgrasmücken dienten als Kontrolltiere.

##### **Empfänglichkeit, Überlebensdauer, Klinik**

Die Vögel verstarben meist perakut. In der GM<sub>4</sub>-Gruppe (Tiere, infiziert mit 10<sup>4</sup> EID<sub>50</sub> pro Tier) betrug die Inkubationszeit mindestens fünf Tage. Vier Tiere entwickelten zentral-nervöse klinische Erscheinungen (Torticollis, Ataxie). Bis zum neunten Tag verstarben alle Tiere. In der GM<sub>6</sub>-Gruppe (infiziert mit 10<sup>6</sup> EID<sub>50</sub>) betrug die minimale Inkubationszeit drei Tage und bis zum sechsten Tag waren alle Tiere verstorben.

##### **Makroskopische Befunde**

Infizierte und nicht infizierte Vögel wiesen ein gering- bis mittelgradiges Lungenödem sowie eine Stauung des Lungenparenchyms auf. Zwei GM<sub>6</sub>-Tiere und ein Vogel aus der GM<sub>4</sub>-Gruppe zeigten Koagulationsnekrosen im Pankreas.

##### **Histopathologische und immunhistochemische Befunde**

In allen Organen war eine Entzündungsreaktion von geringem Ausmaß festzustellen. In Respirationstrakt, Herz, ZNS und Harderscher Drüse entsprachen die Befunde denen der Schwarzkehlchen. In Leber, Niere und Hoden war das Parenchym vereinzelt degeneriert (hypereosinophiles Zytoplasma, vakuoläre Degeneration, Kernwandhyperchromatose) oder nekrotisch. Nekrosen des Pankreas waren auf den exokrinen Anteil, Nekrosen der Nebenniere auf die interrenalen Zellen beschränkt. Die Milz zeichnete sich durch eine mittel- bis hochgradige retikuloendotheliale Hyperplasie aus. Vereinzelt traten eine heterophile Rhinitis (akut, mittelgradig, diffus), eine gemischt-zellige Tracheitis (subakut, geringgradig, herdförmig, proliferativ) und interstitielle Nephritis (subakut, mittelgradig, multifokal, lymphohistiozytär) auf. Konstant konnte ein **Neurotropismus** des Isolates in beiden Dosisgruppen gefunden werden. Bis auf ein Tier der GM<sub>6</sub>-Gruppe war der virale **Epitheltropismus** bei allen Tieren zu finden. In dieser Gruppe fand sich ein Tier mit einem viralen **Endotheltropismus**. Eine detaillierte Übersicht der immunhistologischen Befunde findet sich in Tab. 37. Die Organe der Kontrollen waren frei von Läsionen und Influenzavirusantigenen.

Tab. 37: Nachweis von Influenzavirusantigenen bei R65/06-infizierten Mönchsgrasmücken

Organ	Quantität	Antigennachweis		Anzahl Gesamt	Zelltyp (ggf. abweichende Anzahl positiver Tiere <sup>§</sup> )
		10 <sup>4</sup> EID <sub>50</sub>	10 <sup>6</sup> EID <sub>50</sub>		
		Anzahl			
Schnabel	++	0/1	1/1	1/2	Respiratorisches Epithel
Trachea	+++	2/4	3/6	5/10	Endothel (1), Epithel
Lunge	++	2/5	5/6	7/11	Endothel (1), (Para-) Bronchialepithel, Pneumozyten (Abb. 29)
Herz	++	2/5	6/6	8/11	Endothel (1), Kardiomyozyten
Drüsenmagen	-	0/1	0/3	0/4	
Muskelmagen	+	0/5	1/6	1/11	Endothel
Darm	+	0/5	2/6	2/11	Endothel (1), Glatte Muskulatur
Pankreas	++	2/4	4/4	6/8	Endothel (1), Azini
Leber	+++	0/5	2/6	2/11	Endothel (1), Hepatozyten
Milz	+	0/2	1/2	1/4	Endothel
Bursa	n. u.				
Thymus	n. u.				
ZNS	+++	6/6	5/5	11/11	Endothel (1), Neuronen, Neuroglia mit Ependym
Auge	+	1/5	3/6	4/11	Hardersche Drüse, Endothel (1),
Niere	+	0/5	3/6	3/11	Endothel (1), Tubuli
Nebenniere	+	0/2	1/1	1/3	Rinde
Gonade	+	1/3	0/0	1/3	Hoden, Interstium (nicht klassifiziert)
Skelettmuskel	-	0/5	0/6	0/11	
Haut	-	0/4	0/6	0/10	

<sup>#</sup> Semiquantitativer Antigennachweis: + (vereinzelt), ++ (herdförmig), +++ (konfluent bis diffus)

\*n. u. = nicht untersucht

<sup>§</sup> Anzahl positiver Tiere: Angabe zur Tierzahl mit Antigennachweis im aufgeführten Zelltyp erfolgt, wenn die Anzahl der betroffenen Tiere von der Angabe der vorangehenden Spalte abweicht

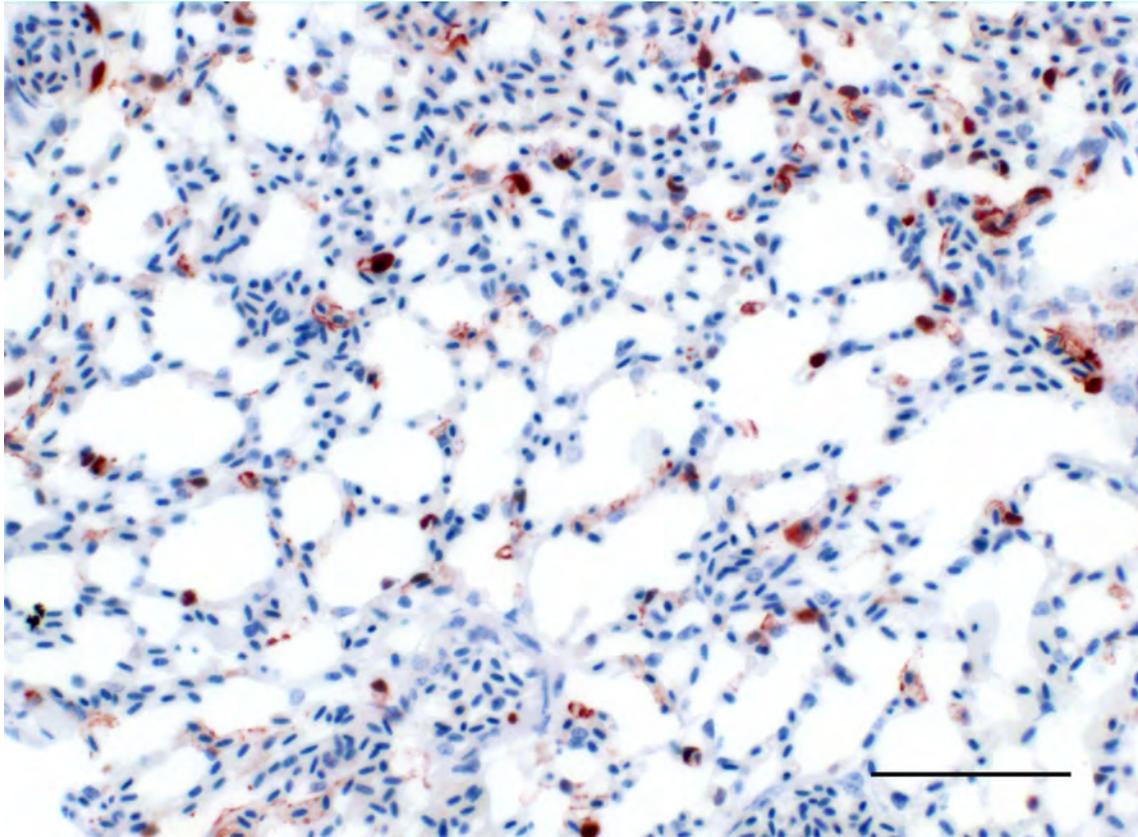


Abb. 29: **Lunge einer R65/06-infizierten Mönchsgrasmücke. Immunhistochemischer Nachweis des Influenza A NP.** ABC-Methode mit AEC-Färbung und Hämalaun-Gegenfärbung. Antigen signal intrazytoplasmatisch und intranukleär in Pneumozyten. Bar 50  $\mu$ m.

#### **4.2.2.3.3 Befunde nach HPAIV-Infektion von Blutschnabelwebern**

Die untersuchten Tiere gehen aus Tab. 4 hervor. Zwei weitere nicht infizierte Blutschnabelweber dienten als nicht infizierte Kontrolltiere.

#### **Empfänglichkeit, Überlebensdauer, Klinik**

Die Infektion verlief symptomlos, bis auf ein Tier, dessen Gefieder gesträubt war. An den Tagen sechs und sieben p. i. starben neun von elf Tieren aus der Gruppe der  $10^6$  EID<sub>50</sub>-infizierten Vögel. Aus der Gruppe der  $10^4$  EID<sub>50</sub>-infizierten Tiere starb ein Blutschnabelweber am fünften und einer am neunten Tag p. i. Es überlebten zwei Tiere die hohe Infektionsdosis und neun Tiere die niedrige Dosis.

#### **Makroskopische Befunde**

Infizierte und nicht infizierte Vögel zeigten ein gering- bis mittelgradiges Lungenödem.

#### **Histopathologische und immunhistochemische Befunde**

Das respiratorische Epithel in der Schnabelhöhle war in drei Tieren weitgehend desquamiert und nekrotisch. Die Lungen aller Tiere zeigten ein geringgradiges, alveoläres Ödem und waren geringgradig gestaut. In Pankreas, Niere und Nebenniere gingen Parenchymnekrosen stets mit dem Antigennachweis einher, wobei in der Nebenniere lymphohistiozytäre und im Pankreas vorwiegend heterophile Infiltrate zu finden waren. Im zentralen Nervensystem zeigten zahlreiche Blutschnabelweber multifokale Neuronennekrosen und Gliaknötchen mit Neuronophagie. Des Weiteren lag ein hochgradiger Befall mit nicht klassifizierten Zestoden im Dünndarm und eine multifokal ausgedehnte gemischtvakuolige Hepatozytenverfettung vor. Vereinzelt waren eine geringgradige lymphohistiozytäre Meningoenzephalitis, eine Depletion der Milz und Parenchymnekrosen in Harderscher Drüse und Gonade (gemischtzellig infiltriert) zu finden. Eine detaillierte Übersicht der immunhistologischen Befunde findet sich in Tab. 32. Alle verstorbenen Vögel wiesen einen **Neuro-** und **Epitheltropismus** auf (Abb. 30, Antigennachweis im Rückenmark). Ein **Endotheltropismus** konnte nicht nachgewiesen werden. Die Organe der Kontrolltiere und der Tiere, die die Infektion überlebt haben, waren frei von Influenzavirusantigenen.

Tab. 38: Nachweis von Influenzavirusantigenen bei R65/06-infizierten Blutschnabelwebern

Organ	Quantität	Antigennachweis <sup>#</sup>		Anzahl Gesamt	Zelltyp (ggf. abweichende Anzahl positiver Tiere <sup>§</sup> )
		10 <sup>4</sup> EID <sub>50</sub>	10 <sup>6</sup> EID <sub>50</sub>		
		Anzahl			
Schnabel	+	1/11	4/9	5/20	(Nicht-) Respiratorisches Epithel, PNS (1)
Trachea	-	0/10	0/11	0/21	
Lunge	+	1/11	2/11	3/21	(Para-) Bronchialepithel, Pneumozyten
Herz	+	0/11	2/10	2/21	Aorta: Tunica media
Drüsenmagen	-	0/9	0/11	0/20	
Muskelmagen	+	0/11	1/11	1/22	PNS
Darm	+	0/11	5/11	5/22	PNS (4), Kryptepithel (1)
Pankreas	+++	2/11	9/11	11/22	Azini
Leber	+	1/11	2/11	3/22	Hepatozyten
Milz	-	0/4	0/3	0/7	
Bursa	n. u.				
Thymus	n. u.				
ZNS	++	2/11	9/11	11/22	Neuronen, Neuroglia mit Ependym
Auge	+	1/11	3/11	4/22	Korneaepithel (2), Hardersche Drüse (2), Pecten oculi Endothel (1)
Niere	+	1/11	2/11	3/22	Tubuli
Nebenniere	++	2/8	3/5	5/13	Rinde, PNS (2)
Gonade	++	1/8	4/10	5/18	Thekazellen, spinozelluläres Bindegewebe
Skelettmuskel	-	0/11	0/11	0/22	
Haut	-	0/11	0/11	0/22	

<sup>#</sup> Semiquantitativer Antigennachweis: + (vereinzelt), ++ (herdförmig), +++ (konfluent bis diffus)

\* n. u. = nicht untersucht

<sup>§</sup> Anzahl positiver Tiere: Angabe zur Tierzahl mit Antigennachweis im aufgeführten Zelltyp erfolgt, wenn die Anzahl der betroffenen Tiere von der Angabe der vorangehenden Spalte abweicht

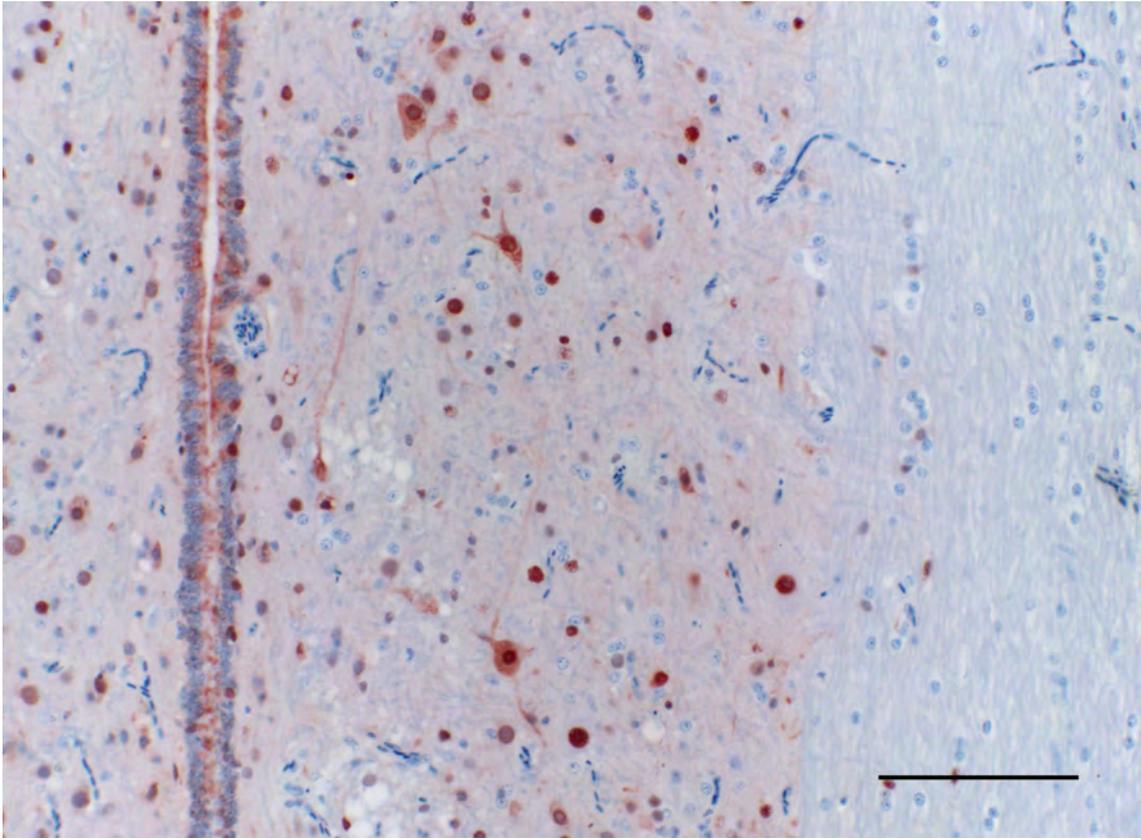


Abb. 30: **Rückenmark eines R65/06-infizierten Blutschnabelwebers. Immunhistochemischer Nachweis des Influenza A NP.** Antigen-signal intrazytoplasmatisch und intranukleär in Neuronen, Ependym- und Gliazellen. Bar 100 µm.

## **5 Diskussion**

### **5.1 Morphologische Untersuchungen zur Pathogenese von HPAIV-Infektionen**

Die Auswirkungen einer Infektion mit HPAIV wurden mittels histopathologischer und immunhistologischer Methoden untersucht. Zur Charakterisierung von Influenza A/swan/Germany/R65/2006 (H5N1) in Mäusen, Hühnern, Schwänen, Entenvögeln und Sperlingsvögeln wurden die pathomorphologischen Befunde und der Tropismus mit ausgewählten weiteren HPAIV-Isolaten und mit den Daten aus der Literatur verglichen.

Die HPAIV-Infektion bei Säugetieren ist auf mehreren Betrachtungsebenen von Bedeutung. Zum Einen kann die Infektion dazu führen, dass sich das Virus an diesen Wirt anpasst (Adaptation) und dadurch eine Virulenzsteigerung bei Säugetieren erfolgt. Eine Adaptation hinsichtlich einer effektiveren Virusreplikation und –ausscheidung würde die Gefahr der Übertragung auf den Menschen oder der Übertragung von Mensch-zu-Mensch erhöhen.

Auf dieser Grundlage sollten zunächst drei HPAIV-Isolate aus Deutschland im Mausmodell untersucht werden. Neben den pathomorphologischen Befunden und dem Gewebetropismus sollte die Virulenz der Isolate verglichen werden.

Aufgrund des engen Kontaktes zum Menschen ist die Infektion von Haussäugetieren auch aus epidemiologischer Sicht von Bedeutung. Nach den Berichten über tödlich verlaufende, natürliche Infektionen mit HPAIV bei Katzen in Thailand und Deutschland (Klopfleisch et al., 2007, Songserm et al., 2006) wurde ihre epidemiologische Rolle unter experimentellen Bedingungen untersucht (Kuiken et al., 2004; Vahlenkamp et al., 2008). Katzen, die okulo-naso-pharyngeal infiziert wurden, schieden das Virus aus und wären damit in der Lage Kontakttiere oder Menschen zu infizieren (Vahlenkamp et al., 2008). Die natürlicher Infektion von Katzen erfolgte wahrscheinlich durch die orale Aufnahme von HPAIV-infizierten Wildvögeln. Klopfleisch et al. (2007) vermuten, dass der primären Virusreplikation im Respirations- und Verdauungstrakt eine Virämie folgt. Um den natürlichen Bedingungen zu entsprechen, erfolgte die Infektion in den eigenen

Untersuchungen intranasal und oral. Die pathomorphologischen Befunde wurden denen nach intravenöser Infektion gegenübergestellt.

Die experimentelle Infektion von Mäusen führte in Übereinstimmung mit der Literatur zu Ataxie, Tremor, Hypokinesie, aufgekrümmten Rücken und Körpergewichtsverlust (Dybing et al., 2000; Jang et al., 2009; Tanaka et al., 2003). R1372/07 zeigte eine vergleichbare Virulenz wie R65/06 und führte bei allen Tieren zum Tod. Die Infektion mit R1959/07 endete bei nur einem Tier tödlich, was vermutlich auf eine Viruselimination zurückzuführen ist. Überlebende Tiere wiesen kein Influenzavirusantigen in den Organen auf. Konstant wurde das AIV-Antigen im ZNS verstorbener Tiere nachgewiesen. Nur ausnahmsweise gelang dieser Nachweis im Respirationstrakt. Der Hypothese, dass bei Mäusen der Infektion der Lunge eine über den *Nervus vagus* verlaufende, aufsteigende Infektion des ZNS folgen kann (Dybing et al., 2000), wird damit jedoch nicht widersprochen. Eine Infektion des respiratorischen Epithels fand möglicherweise in geringem Ausmaß statt, ohne dass der immunhistochemische Nachweis dies in den Gewebeschnitten erfassen konnte. Ferner könnte die Replikation in den ersten Tagen der Infektion stattgefunden haben, so dass zum Todeszeitpunkt bereits die Elimination des Virus im Lungengewebe erfolgt war. Im Experiment zeigten immunhistochemisch positive wie negative Tiere Pneumonien. Die Infiltration des Lungenparenchyms könnte ein Hinweis für die erfolgte immunologische Reaktion mit Viruselimination sein.

Der Neurotropismus bei tödlich verlaufenden Infektionen lässt den Schluss zu, dass die Pathogenese der R65/06-Infektion im Mausmodell streng an die Manifestation im ZNS gebunden ist. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Dybing et al. (2000). Hier erlagen die Tiere nach der Infektion mit aviären HPAIV-Isolaten einer schweren Pneumonie, wobei das ZNS frei von Influenzavirusantigenen war. Die Ursache hierfür könnte die Verwendung eines anderen Isolates sein. Ein ausgeprägter Neurotropismus wurde bisher den humanen HPAIV-Isolaten zugesprochen (Dybing et al., 2000; Tanaka et al., 2003; Jang et al., 2009).

Die Virulenzunterschiede in den eigenen Untersuchungen lassen sich möglicherweise durch die Betrachtung der Virusherkunft erklären. R1372/07 und R65/06 sind Isolate aus verstorbenen Wildvögeln. Damit ist von einer geringen Adaptation an den Wirt

auszugehen. Das Isolat R1959/07 stammte aus einer kommerziellen Entenhaltung. Vermutlich hatte das Virus bereits einige Tierpassagen durchlaufen und hat damit in Anpassung an den Wirt eine verminderte Virulenz ausgebildet. Die könnte auch zu einer verminderten Virulenz bei Mäusen geführt haben. Ferner zeigen phylogenetische Analysen der Genomsequenzen, dass die Genome der Wildvogelisolat deutlich von denen der Hausgeflügel zu trennen sind (Dipl. Chem. Elke Starick, mündliche Mitteilung).

Nach experimenteller Infektion von Katzen entwickelten die Tiere vereinzelt Pneumonien mit korrespondierendem Antigennachweis in Pneumozyten, Alveolarmakrophagen und dem Bronchialepithel, wie in der Literatur beschrieben (Kuiken et al., 2004; Songserm et al., 2006; Klopffleisch et al., 2007; Vahlenkamp et al., 2008). Auch in Lymphozyten der Leber und Tonsille konnte das Virus vereinzelt nachgewiesen werden. Dies könnte auf eine Virämie und den zellgebundenen Transport des Virus hinweisen. Bemerkenswert ist der AIV-Nachweis in Neuronen und Gliazellen im ZNS. Der Antigennachweis in Lunge, Leber und ZNS erfolgte in allen gewählten Infektionsrouten, war jedoch nicht konsistent in allen Tieren zu finden. Eine mögliche Ursache ist die frühzeitige Tötung der Tiere. Zudem erwies sich die verwendete Virusdosis in einer weiterführenden experimentellen Untersuchung als nicht tödlich (Vahlenkamp et al., 2008). Während Kuiken et al. (2004) die Lungenschäden für den fatalen Verlauf der Infektion verantwortlich machen, stellen Klopffleisch et al. (2007) die Einschränkung der Leberfunktion in den Vordergrund.

Seit dem Jahr 2002 hat sich das HPAIV des Subtyps H5N1 von Südostasien weiter nach Europa und Afrika ausgebreitet. In Europa sind Schwäne am häufigsten von der Infektion betroffen (Terregino et al., 2006). Jungtiere der Spezies Höckerschwan, Singschwan und Trauerschwan sind hochempfindlich für eine fatal verlaufende HPAIV-Infektion (Brown et al., 2008).

Es zeigte sich in den eigenen Untersuchungen, dass auch adulte Höckerschwäne der Infektion mit einer Dosis von  $10^4$  EID<sub>50</sub> oder einer Kontaktinfektion erliegen können. Schwäne mit präexperimentellen Antikörpern und ein sehr kräftiges Tier überlebten die Infektion (Kalthoff et al., 2008). Die Tiere zeigten typischerweise zentralnervöse

Störungen wie Opisthotonus und Ataxien (Teifke et al., 2007; Brown et al., 2008). Die makroskopischen und histologischen Veränderungen, insbesondere die Ausprägung eines Endotheltropismus, waren unabhängig von der verwendeten Virusdosis ( $10^4$  und  $10^6$  EID<sub>50</sub>). Ferner konnte keine Korrelation zwischen einem frühen Todeszeitpunkt und einem Endotheltropismus in den drei betroffenen Schwänen nachgewiesen werden. Bemerkenswert war, dass zwei dieser Tiere am 7. Tag p. i. noch keine Antikörper gegen AIV aufwiesen. Kalthoff et al. (2008) vermuten, dass die fehlende Antikörperantwort die Infektion der Endothelien begünstigt. Das dritte Tier verstarb perakut 5 Tage p. i., so dass keine serologische Untersuchung erfolgen konnte.

Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen an HPAIV-infizierten, adulten Höckerschwänen deuten darauf hin, dass hier erneut der fatale Verlauf eng mit dem Antigennachweis im ZNS und der Ausbildung zentralnervöser Störungen verknüpft ist. Während des protrahierten Verlaufes entwickelte sich eine Meningoenzephalitis, die ebenfalls die zentralnervösen Symptome erklärt.

Die Infektion von Moschus-, Peking- und Stockenten hatte zum einen das Ziel, den Einfluss des verwendeten Virusisolates auf die Pathogenese heraus zu arbeiten. Hierzu erfolgte die vergleichende Untersuchung innerhalb einer Art nach der Infektion mit zwei HPAIV aus unterschiedlichen „clades“ unter sonst gleichen Versuchsbedingungen. Ferner sollte der Einfluss der Spezies auf die Pathogenese untersucht werden. Zu diesem Zweck konnten die Befunde nach der Infektion mit je einem der Isolate in allen drei Entenarten gegenübergestellt werden.

Das Virusisolat TG24-01/05 („clade 1“) zeigt, wie in Tab. 39 zusammengefasst, innerhalb aller untersuchten Entenspezies eine höhere Virulenz als das Isolat R65/06 („clade 2“). Das verwendete Virusisolat hat innerhalb einer Spezies einen entscheidenden Einfluss auf den Verlauf der Infektion.

Tab. 39: **Letalität nach TG24-01/05 bzw. R65/06-Infektion bei Moschus-, Peking- und Stockenten**

Spezies	Letalität*	
	TG24-01/05: „clade 1“	R65/06: „clade 2“
<b>Moschusenten</b>	100 %	80 %
<b>Pekingenten</b>	100 %	0 %
<b>Stockenten</b>	50 %	0 %

\* Letalität: berechnet anhand der Tiere, die bis zum 8. Tag p. i. zur Untersuchung vorlagen.

Im Gegensatz zu den Daten von Keawcharoen et al. (2008) aus Untersuchungen an zehn bis sechzehn Wochen bzw. acht bis elf Monate alten Stockenten konnte gezeigt werden, dass auch bei dieser Spezies tödliche HPAIV-Infektionen möglich sind. Die Ursache für die Diskrepanz liegt zum einen in der Verwendung eines anderen Virusisolates. Eine größere Rolle spielt vermutlich jedoch das geringere Alter der Tiere (Pantin-Jackwood et al., 2007).

Die immunhistochemischen Befunde zeigen, dass die Infektion mit TG24-01/05 zu einem breiterem Spektrum positiver Organe und zu einem semiquantitativ höheren Antigennachweis in einer größeren Anzahl von Tieren führt. Hieraus lässt sich ableiten, dass sich dieses Isolat effizienter in den ausgewählten Entenarten vermehrt.

Auf der Ebene der Entenspezies wird deutlich, dass Moschusenten die höchste Empfänglichkeit gegenüber TG24-01/05 und R65/06 zeigen (Tab. 39). Ein mögliche Erklärung für die geringere Empfänglichkeit bei Peking- und Stockenten könnten Unterschiede in der Rezeptorausstattung der Zielzellen, insbesondere der Zellen des Respirationstraktes sein.

Eine vergleichende Sequenzanalyse der Isolate würde Aufschluss über mögliche Differenzen auf Nukleotid- und Aminosäureebene geben. Hierdurch könnten Virulenzfaktoren, die beispielweise die Speziesspezifität beeinflussen, aufgedeckt werden.

Da die Replikation der Influenzaviren im Respirationstrakt oder im Darm der Vögel stattfindet und die eigenen Untersuchungen auf die tragende Rolle des ZNS in der Pathogenese hindeuten, erfolgte die Bestimmung der Viruslast (Virusgenom und replikationsfähiges Virus) im ZNS, im Darm und in der Lunge.

Es konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit TG24-01/05 im Mittel sowohl zu einer höheren Virusgenomlast als auch zu einem höheren mittleren Virustiter in allen drei Spezies führte. Dies unterstreicht die Befunde der immunhistochemischen Untersuchung. Des Weiteren war die Virusgenomlast im Mittel stets im ZNS am höchsten, gefolgt von der Lunge und dem Darm. Damit konnte das ZNS als Hauptzielorgan bestätigt werden. Zum Teil widersprachen die Daten jedoch den Ergebnissen der immunhistochemischen Untersuchung. Insbesondere der Virus- und Virusgenomnachweis im Lungengewebe von Stockenten und Pekingenten korrelierte nicht mit dem immunhistochemischen Antigennachweis. Möglicherweise lag zum Untersuchungszeitpunkt eine Virämie vor. Dann wäre das Virus im Blut und in den Transsudaten (Ödemflüssigkeit) in großen Mengen vorhanden. Somit wäre das Virus in blutreichen und ödematisierten Organen zu finden, ohne dass eine organgebundene Replikation stattfindet. Die real-time RT-PCR und die Virustitration sind damit eine sehr sensitive, jedoch stets kritisch zu prüfende, ergänzende Methode zum immunhistochemischen Antigennachweis bei der Bestimmung des Organtropismus.

H5N1 HPAIV haben in oropharyngealen Tupferproben zu höheren Virustitern geführt als die kloakalen Tupferproben (Sturm-Ramirez et al., 2004). Dies konnte in den eigenen Untersuchungen mittels real-time RT-PCR bestätigt werden. Im Mittel war die Genomlast in beiden Tupferproben der Moschusenten am höchsten. Peking- und Stockenten schieden vergleichbar viel, jedoch weniger als Moschusenten aus. Die höchste mittlere Virusgenomlast fand sich am dritten Tag p. i. in Rachentupfern (Moschusenten, ct: 20,71) und Kloakentupfern (Moschusenten, ct: 27,87).

Die epidemiologische Bedeutung von HPAIV in der Familie der Sperlingsvögel wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Zugvögeln wird eine wichtige Rolle bei der Verbreitung von HPAIV über große Entfernungen zugesprochen (Chen et al., 2006b). Der Nachweis natürlicher HPAIV-Infektionen und der nahe Kontakt zum Menschen lassen diese Vögel als mögliche Überträger für HPAIV in Erscheinung treten. Mönchsgrasmücken sind insektenfressende Stand- oder Zugvögel in Europa und gehören dem Genus *Sylvia* an. In Vögeln dieses Genus wurden bereits LPAIV nachgewiesen (Amin et al., 1980; Gronesova et al., 2008).

Schwarzkehlchen sind als Zugvögel in der nördlichen Hemisphäre zu finden, kommen jedoch in Afrika auch als Standvögel vor. Die Untersuchung von Blutschnabelwebern ist von Bedeutung, da sie von Menschen in Afrika als Nahrungsquelle genutzt werden und zu den am weitesten verbreiteten Wildvögeln zählen (Elliot, 1989).

In der Familie der Sperlingsvögel herrscht eine sehr große Variabilität hinsichtlich der Empfänglichkeit für HPAIV und dem Nachweis des Antigens in den Geweben. Subklinische Infektionen (europäische Stare) kommen genauso vor wie milde Verläufe (Haussperlinge), Beeinträchtigungen im Allgemeinbefinden (Amerikanerkrähen, Zebrafinken) und die Ausbildung zentralnervöser Störungen (Hausfinken) (Boon et al., 2007; Perkins und Swayne, 2003). Das Virusantigen konnte u. a. in den Neuronen, in den Pankreasazini, den Granulozyten und den Vorläuferzellen des Knochenmarks nachgewiesen werden (Kwon, 2005a; Tanimura et al, 2006; Swayne, 2007). Diese Vielfalt spiegelt sich in den eigenen Untersuchungen wider.

Die HPAIV-Infektion von Schwarzkehlchen (R65/06,  $10^6$  EID<sub>50</sub>) verlief für alle Tiere innerhalb von sieben Tagen fatal, meist perakut. Nur ausnahmsweise zeigten sich zentralnervöse Störungen. Hauptzielorgane des Virus waren das ZNS, das Pankreas (Azini) und die Lunge (Pneumozyten, Bronchialepithel). Die Infektion des Nervengewebes spielt vermutlich eine zentrale Rolle in der Pathogenese der HPAIV-Infektion (Kalthoff et al., 2009). Dies konnte bereits bei anderen Spezies, wie Mäusen, Tauben, Enten und Schwänen gezeigt werden (Tanaka et al., 2003; Klopffleisch et al., 2006, Teifke et al., 2007; Vascellari et al., 2007). Das Vorkommen des Endotheltropismus korrelierte wie in anderen Untersuchungen nicht mit einem beschleunigten Krankheitsverlauf (Perkins und Swayne, 2003; Teifke et al., 2007; Brown et al, 2008; Kalthoff et al., 2008).

Weiterhin konnten die eigenen Untersuchungen an Blutschnabelwebern und Mönchsgrasmücken (R65/06,  $10^4$  EID<sub>50</sub> und  $10^6$  EID<sub>50</sub>) zeigen, dass mit einer Dosissteigerung die mittlere Überlebenszeit sank und die Letalität stieg. Sowohl Blutschnabelweber als auch Mönchsgrasmücken sind empfänglich für HPAIV. Bei allen verstorbenen Tieren konnte das Antigen im ZNS nachgewiesen werden. Insbesondere in Blutschnabelwebern waren im Gehirn vorwiegend die Ependymzellen und die umliegenden Neuronen und Gliazellen immunhistochemisch positiv. Dies

könnte ein Hinweis dafür sein, dass die Infektion des Gehirns im vorliegenden Experiment über den Liquor cerebrospinalis erfolgt ist.

Brown et al. (2009) vermuten, dass ein Multiorganversagen unter Beteiligung des Pankreas, der Nebenniere, des Herzens und der Leber für die Pathogenese der HPAIV-Infektion in Sperlingsvögeln verantwortlich sein könnte. Nach den eigenen Untersuchungen an drei Sperlingsvogelarten sollte der Infektion des ZNS eine entscheidende Rolle im Krankheitsverlauf zugesprochen werden. Die Ausprägung eines Endotheltropismus ist im Gegensatz zum Huhn bei Sperlingsvögeln vermutlich von einer untergeordneten Bedeutung.

Um Rückschlüsse auf den zeitlichen Verlauf einer HPAIV-Infektion im Huhn ziehen zu können, wurden die Organe R65/06-infizierter Tiere kinetisch untersucht. Dem typischen Verlauf einer akuten Infektion entsprechend entwickelten die Tiere nach 24 h erste Symptome und verstarben vor Ablauf der 48 h. Die Ausprägung einer Blutungsneigung, die Ausbildung von Ergüssen (Hydroperikard) und das Auftreten von Lungenparenchymverdichtungen wurden bestätigt. Im Rahmen von perakuten Verläufen ist es jedoch nicht ungewöhnlich, wenn die Tiere völlig frei von makroskopischen Läsionen sind (Swayne und Pantin-Jackwood, 2008). Der erste Antigennachweis konnte 12 h p. i. im Bronchialepithel, den Parabronchien, in mononukleären Zellen und in Endothelzellen erbracht werden. Bereits nach 24 h lag ein disseminierter Endotheltropismus vor. Die organcharakteristischen Epithelien und Parenchymzellen waren, wie in der Literatur beschrieben, variabel betroffen. Die lymphatischen Organe Thymus, Bursa und Milz zeigten eine hochgradige Lymphozytendepletion und teils fibrinöse Lymphozytennekroseherde (Perkins und Swayne, 2001; Swayne und Pantin-Jackwood, 2008).

Swayne (2007) und Swayne und Pantin-Jackwood (2008) untersuchten den Verlauf einer HPAIV-Infektion im Huhn. Hier gelang der erste immunhistochemische Nachweis im respiratorischen Epithel der Schnabelhöhle 16 h p. i. Nach 24 h waren auch die darunter liegenden Endothelien betroffen, nach 36 h die Zellen der Parenchyme. Als Infektionsroute zum ZNS wurde die Ausbreitung über das Blut und die Infektion der zerebralen Endothelzellen propagiert. In Übereinstimmung mit den genannten Daten lassen die eigenen Untersuchungen den Schluss zu, dass der primären Virusreplikation

im oberen Respirationstrakt die Infektion von Endothelzellen und Blutzellen folgte, die zur Verbreitung des Virus im Huhn beitrug. Die ausgedehnte Infektion der Parenchyme erfolgte nach etwa einem Tag, parallel mit dem Auftreten der klinischen Erscheinungen wie Lethargie, Fieber, gesträubtes Gefieder und Dyspnoe. Die Infektion des ZNS erfolgte vermutlich hauptsächlich über das Blut und die Endothelzellen. Hinweise zu einer neurogen-aszendierenden Infektion des ZNS fanden sich nicht in den repräsentativen Organschnitten. Die Anfertigung von Serienschnitten zu frühen Infektionszeitpunkten wären zur Klärung dieser Fragestellung angezeigt.

Die experimentellen Infektionen von Hühnern mit verschiedenen Isolaten werden zusammenfassend interpretiert. Die pathohistologischen Befunde sind weitgehend einheitlich in den Infektionsgruppen und Altersklassen.

Die Infektion verläuft innerhalb von 48 h tödlich. Die für HPAIV-Infektionen im Huhn typischen Symptome zeigen sich nach etwa 24 h mit gesträubtem Gefieder, Schnabelatmung und Lethargie (Swayne und Pantin-Jackwood, 2008). Makroskopisch steht die ausgeprägte Blutungsneigung im Vordergrund. Koagulationsnekrosen im Pankreasparenchym sind häufig zu finden. Die ausgedehnten Nekroseherde in den Parenchymenten könnten eine Folge der Fibrinablagerungen in kleinen Gefäßen mit daraus resultierender Mangelversorgung der entsprechenden Gewebeareale sein.

Während der Antigennachweis im oberen und unteren Respirationstrakt regelmäßig gelingt, sind die Parenchyme und Epithelzellen des Magen-Darm-Traktes (MDT) weniger häufig infiziert. Die Tiere haben bis kurz vor ihrem Tod Nahrung aufgenommen, Durchfall ist nicht regelmäßig nachweisbar. Somit scheint die Infektion des MDT eine nachgeordnete Relevanz im Krankheitsgeschehen zu haben.

Für den Krankheitsverlauf ist möglicherweise die konstante Infektion des Herzmuskels von entscheidender Bedeutung. Eine eingeschränkte Herzfunktion könnte eine Rolle bei der Entwicklung von Stauungshyperämien, Ödemen und dem finalen Herz-Kreislauf-Versagen spielen.

Erwartungsgemäß spiegeln die vorliegenden Ergebnisse die Literatur wider: Es werden Infektionen der Endothelzellen, der Zellen des ZNS und zahlreicher Parenchyme beschrieben (Mo et al., 1997; Capua und Mutinelli, 2001; Perkins und Swayne, 2001; Jones und Swayne, 2004).

Als Hauptbefund fanden sich neben der ausgeprägten Blutungsneigung und einem konstanten Endotheltropismus gelegentlich Thromben in kleinlumigen Blutgefäßen. Die Infektion der Leber könnte im Rahmen der zahlreichen Stoffwechselforgänge und der verminderten Produktion von Blutgerinnungsfaktoren einen Einfluss auf die Ausprägung der Blutungsneigung nehmen.

Ein weiterer Hauptbefund war die Depletion lymphatischer Organe sowie von BALT und GALT mit ausgedehnter Nekrose von Lymphozyten. Entzündliche Infiltrate in den Organen waren unregelmäßig zu finden und besonders bei perakuten Verläufen von geringgradiger oder mittelgradiger Ausprägung.

Im Rahmen der funktionellen Untersuchung sollten auf der Grundlage dieser Hauptbefunde Einflussfaktoren auf die Ausprägung einer disseminierten intravasalen Koagulopathie durch eine HPAIV-Infektion untersucht werden. Welche Entzündungsmediatoren Einfluss auf den perakuten Krankheitsverlauf im Huhn haben können, sollte ebenfalls Gegenstand der funktionellen Untersuchung sein.

## **5.2 Funktionelle Untersuchungen zur Pathogenese von HPAIV-Infektionen**

In den eigenen Untersuchungen konnte eine Depletion lymphatischer Organe mit ausgedehnter Nekrose von Lymphozyten nachgewiesen werden. Die Nekrose von Lymphozyten wurde im Rahmen von HPAIV-Infektionen im Huhn bereits beschrieben. TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  und andere Zytokine sollen eine Rolle bei der Induktion der Apoptose spielen (Perkins und Swayne, 2001). Daneben könnten Makrophagen durch die Infektion eine verminderte Phagozytoseleistung aufweisen. Beides zusammengekommen soll zu der Ausprägung ausgedehnter Lymphozytennekrosen beitragen (Perkins und Swayne, 2001). Bis heute konnte jedoch TNF- $\alpha$  im Huhn nicht nachgewiesen werden, so dass möglicherweise andere Zytokine eine Rolle spielen (Davison et al., 2008). Ferner entwickeln Erreger durch die Koevolution von Viren und ihren Wirten vielfältige Strategien, die Immunantwort des Wirtes zu unterdrücken oder sie zu umgehen (Garcia-Sastre, 2006). Die Lymphozytendepletion in den lymphatischen Organen sowie die zu beobachtende unregelmäßige Entzündungszellinfiltration in

infizierten Organen könnte eine Hinweis auf eine zu Grunde liegende Immunsuppression sein.

Des Weiteren ist eine Blutungsneigung ein häufiger Befund in HPAIV-infizierten Vögeln. Histopathologisch konnten sowohl Fibrinthromben in den Blutgefäßen als auch AIV-Antigen in den Endothelzellen nachgewiesen werden (Muramoto et al., 2006), wie auch die eigenen Untersuchungen gezeigt haben. Als Ursache der Hämorrhagien wird eine allgemeine intravasale Gerinnung, die als Verbrauchskoagulopathie zu charakterisieren ist, angesehen (Gagel et al., 1970).

Hauptziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen einer HPAIV-Infektion auf eine hochempfindliche Hühnerembryofibroblastenzelle zu analysieren. Es sollten Kandidatengene gefunden werden, die an der Regulation der Immunantwort, insbesondere dem Toll-like-Rezeptor Signalweg beteiligt sind. Ferner sollten die Gene ermittelt werden, die einen Einfluss auf die Blutgerinnungskaskade haben.

Hierzu erfolgte eine Microarray-basierte Analyse der Genexpression von DF-1-Zellen im zeitlichen Verlauf einer R65/06-Infektion. Eine GO-Analyse gab Auskunft über die grundlegend regulierten biologischen Prozesse.

#### Die Modell- und Methodenauswahl

Bei der Auswahl eines geeigneten Modells zur Genexpressionsanalyse besteht die Möglichkeit, Organe von in vivo infizierten Tieren zu untersuchen, Organ-Gewebe-kulturen zu verwenden oder sich primärer oder permanenter Zelllinien zu bedienen.

Die Problematik bei der Verwendung von Organen infizierter Tiere liegt in der erschwerten Reproduzierbarkeit, da unter anderem die Anteile hochempfindlicher und weniger empfindlicher Zellen innerhalb eines Organs und im Individuum variabel sind. Bei Beprobungszeitpunkten zu Beginn der Infektion kann zudem nicht ausgeschlossen werden, dass die Infektion des Parenchyms innerhalb der Tiergruppe sehr unterschiedlich fortgeschritten ist.

Die Interpretation von Untersuchungen zur Immunreaktion an Organ-Gewebekulturen und nicht-permanenten Zelllinien muss mit Vorsicht erfolgen (Reemers et al., 2009). Bisherige Arbeiten haben gezeigt, dass vielversprechende Kandidatengene der Immunantwort zu großen Teilen nicht berücksichtigt werden können. Die nicht

infizierten Kontrollgewebe weisen Regulationen der gleichen Gene auf. Als Ursache wurde die Manipulation am Gewebe mit der Folge einer Stress- oder Wundheilungsreaktion angesehen (Reemers et al., 2009). Die Verwendung einer hochempfindlichen, permanenten Zelllinie stellt die Reproduzierbarkeit der Microarray-basierten Untersuchungen sicher.

Bis heute ist keine permanente Hühnerendothelzelllinie verfügbar, die für eine Untersuchung zum Einfluss der Virusinfektion auf die Blutgerinnungskaskade als Modell dienen könnte. Fibroblasten sind als Teil des Binde- und Stützgewebes mesodermalen Ursprungs. Zu Beginn der Embryonalentwicklung besitzen die Mesenchymzellen als pluripotente Vorläuferzellen die Fähigkeit, sowohl zu ortständigen Zellen (z. B. Fibroblasten, Endothelzellen) als auch zu freien Zellen (Immunzellen) zu differenzieren. In den eigenen Untersuchungen zeigte sich, dass nach einer HPAIV-Infektion von DF-1-Zellen zahlreiche Gene reguliert wurden, die als wesentliche Endothelzellmarker gelten (Garlanda und Dejana, 1997), wie PECAM-1, CDH5, CD51, CD73, Thrombomodulin, AAMP und Flt-1. Des Weiteren wurden Endothelin-1 und der Thromboplastininhibitor (TFPI) als regulierte Gene nachgewiesen. TFPI wird unter anderem, Endothelin-1 jedoch ausschließlich auf Endothelzellen exprimiert. Dies lässt den Schluss zu, dass die ausgewählte Zelllinie ein geeignetes Modell für Endothelzellen sein könnte.

Kritisch zu hinterfragen ist die Auswahl der DF-1-Zelllinie als Modell zur Untersuchung einer Immunantwort. Die DF-1-Zelllinie ist aus einer primären Hühnerembryofibroblastenkultur (CEF) hervorgegangen, die bereits für immunbiologische Fragestellungen verwendet wurde. So konnten Jang et al. (2010) nachweisen, dass mit dem Newcastle disease virus (NDV) infizierte DF-1-Zellen eine verstärkte IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  m-RNA Expression aufweisen. Ferner gehen die Autoren davon aus, dass die Infektion zu einer Aktivierung der Protein Kinase R (PKR) geführt hat. Somit sind DF-1-Zellen in der Lage, auf eine Infektion durch eine antivirale Immunantwort zu reagieren und könnten somit als Modell zur Untersuchung einer Immunreaktion geeignet sein. Dennoch muss an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass es sich bei diesem Modell nicht um eine ausdifferenzierte Immunzelle handelt und somit die Ergebnisse mit entsprechender Vorsicht zu interpretieren sind.

Bemerkenswert hinsichtlich der Immunkompetenz von DF-1-Zellen ist auch die Untersuchung von Barber et al. (2010). Es konnte gezeigt werden, dass im Hühnergenom, und damit auch in der DF-1-Zelle kein homologes Gen für das „retinoic acid-inducible gene I-protein“ (RIG-I) vorliegt. Die Expression von RIG-I konnte bisher u. a. in humanen Endothelzellen, in gingivalen Fibroblasten, im Bronchial- und Harnblasenepithel und in glatten Muskelzellen der Blutgefäße nachgewiesen werden (Kitamura et al., 2007). RIG-I erkennt als Mustererkennungsrezeptor Pathogene wie AIV und NDV im Zytoplasma von infizierten Zellen und induziert eine antivirale IFN-Antwort, die unter anderem die Replikation der Viren hemmt (Barber et al., 2010). Barber et al. (2010) gehen davon aus, dass eine unzureichende IFN-Induktion, vor allem von IFN- $\beta$ , die Ursache für den schweren Krankheitsverlauf nach einer AIV- oder NDV-Infektion im Huhn ist. Sie geben jedoch zu bedenken, dass andere Signalwege existieren, die nach einer Infektion zu einer IFN-Induktion führen können. Darunter die TLR-Signalwege oder auch der „melanoma differentiation-associated gene 5“ (MDA-5)-vermittelte Signalweg. Aufgrund der Tatsache, dass TLR nicht nur auf Immunzellen sondern auch auf Epithelzellen und Fibroblasten zu finden sind (Saini et al., 2007), könnte die DF-1-Zelllinie für die Fragestellung zur Regulation des TLR-Signalweges ein geeignetes Modell darstellen.

Der Nachweis von Oberflächenglykoproteinen auf DF-1-Zellen mit  $\alpha$ -2,3-verknüpften Sialinsäuren deutet auf eine Empfänglichkeit für aviäre Influenzaisolate hin. Die Zellen zeigten eine hohe Replikationseffizienz von AIV (Lee et al., 2008) und sind damit permissiv für AIV.

Die vergleichende Untersuchung der kulturinfektiösen Dosis ( $KID_{50}$ ), der plaquebildenden Einheiten (PBE) und der Wachstumskinetik von DF-1 und MDCK-2-Zellen mit Influenza A/swan/Germany/R65/2006 bestätigte die Empfänglichkeit, die Fähigkeit der Plaquebildung und eine hohe Replikationseffizienz. Die Hühnerembryofibroblastenzelle DF-1 ist somit als Infektionsmodell geeignet.

Für den Infektionsversuch wurde das Inokulum auf MDCK-2-Zellen vermehrt und anschließend mittels Ultrafiltration gereinigt. Die Filterporengröße von 100 kDa hielt das Virus zurück und trennte es von den niedermolekularen Bestandteilen wie den Zytokinen. Dieses Verfahren ist der Anzucht im embryonierten Hühnerei vorzuziehen.

Es ist davon auszugehen, dass die für den Embryo tödliche Virusvermehrung zu einer massiven Ausschüttung von regulatorischen Peptiden führt. Diese können eine wesentliche nicht virusinduzierte zellbiologische Reaktion der DF-1-Zellen auslösen. Die Ultrafiltration des Inokulums soll eine nicht virusinduzierte Zellreaktion weitgehend verhindern.

Das Expressionsprofil einer Zellkultur kann sich über den Versuchszeitraum ändern. Daher müssen bei einer Genexpressionsanalyse im zeitlichen Verlauf zu jedem Untersuchungszeitpunkt nicht infizierte Kontrollzellkulturen angefertigt werden.

Bei der Wahl der Messzeitpunkte wurde dem Infektionszyklus der AIV Rechnung getragen. Es ist bekannt, dass die ersten Virionen aus der Wirtszelle bereits 3 h nach der Infektion von Hühnerembryofibroblasten entlassen werden. Nach 8 h erreicht die Freisetzung der Partikel ihren Höhepunkt (Reinacher und Weiss, 1975). Damit sind Messzeitpunkte vor Ablauf von 8 h angezeigt und für die Untersuchung der Immunreaktion nach der Virusinfektion am besten geeignet.

#### Die Gesamtbetrachtung der Genexpression R65/06-infizierter DF-1-Zellen

Im zeitlichen Verlauf der Infektion zeigte sich, dass die Anzahl regulierter Gene von 37, 2 h p. i. auf 4937, 7 h p. i. anstieg. Bemerkenswert war, dass ca. die Hälfte der regulierten Gene vermindert exprimiert wurden. Die biologische Interpretation kann nur anhand von Transkripten erfolgen, zu denen Proteinannotationen vorliegen.

An dieser Stelle muss darauf hingewiesen werden, dass eine Genexpressionsanalyse eine Betrachtung auf m-RNA-Ebene zu einem definierten Zeitpunkt darstellt („steady state“). Man muss berücksichtigen, dass mit dieser Methode keine Aussage getroffen werden kann, in welchem Umfang eine Translation in die entsprechenden Proteine erfolgt. Hierzu müsste eine Untersuchung auf der Proteinebene beispielsweise mittels „Western-Blot“ durchgeführt werden. Der gezielte Nachweis von Proteinen regulierter Gene erfordert spezifische Antikörper, die insbesondere für das Modelltier Huhn nicht verfügbar sind. Weiterhin könnte man in Frage stellen, ob der Nachweis des Proteins ausreichend ist für eine Aussage über dessen biologische Aktivität. Zahlreiche Proteine liegen in inaktiver Form vor und müssen erst, etwa durch Phosphorylierung, in ihre aktive Form überführt werden. Somit kann die Regulation eines Gens immer nur als ein Hinweis für eine biologische Reaktion verstanden werden.

Die Darstellung der regulierten Gene in einem Venn-Diagramm zeigte auf, wie viele Gene in der Schnittmenge des Genexpressionsprofils vorlagen. Es wurde deutlich, dass drei Gene über den gesamten Zeitverlauf konstant erhöht exprimiert wurden. Hierbei handelte es sich um die AIV-spezifischen Gene M2, NP und NS2. Es lagen zahlreiche Überschneidungen im Genexpressionsprofil der späteren Zeitpunkte vor. Die Regulation einer großen Anzahl von Genen zu einem frühen Zeitpunkt (4 h p. i.) konnte folglich zu den nachfolgenden Zeitpunkten bestätigt werden. Dies ist ein Hinweis für die Reproduzierbarkeit der gewonnenen Daten.

### Die GO-Analyse

Die Untersuchung gab Auskunft über die Signalwege der biologischen Prozesse (Gene Ontology, GO), die reguliert wurden. Bereits 2 h nach der Infektion waren bis auf zwei Gene sämtliche Kandidatengene der biologischen Prozesse vermindert exprimiert. Ein vergleichbares Ergebnis war nach 4 h zu verzeichnen. Die Infektion von DF-1-Zellen scheint unmittelbar zur Inhibition biologischer Zellprozesse zu führen. Bemerkenswert war, dass 4 h p. i. einer der biologischen Prozesse einen hohen Anteil verstärkt exprimierter Gene aufwies. Der Prozess der Translation beinhaltete 16 regulierte Gene, von denen 7 Gene vermehrt exprimiert wurden. Dies könnte ein Hinweis auf die Verschiebung der zellulären hin zur viralen Proteinsynthese sein.

Der sogenannte Proteinsynthese „shut-off“ und die Inhibition biologischer Funktionen durch Influenzaviren sind bekannt, konnten bis heute jedoch nicht im Detail aufgeklärt werden (Kash et al., 2006). Die virale Replikation geht mit der Bildung von dsRNA einher, die in der Wirtszelle die Doppelstrang-RNA-abhängige Protein-Kinase (PKR) aktiviert. Über eine Signalkaskade induziert PKR die Phosphorylierung des „eukaryotic initiation factor 2“ (eIF2 $\alpha$ ), was zu einem generalisierten Proteinsynthesestopp führt. Dies verhindert eine effiziente Virusreplikation. Gleichzeitig ist PKR in der Lage, die antivirale IFN-Antwort zu induzieren. Da die Replikation eines Virus große Mengen viraler Proteine erfordert, haben Viren Strategien entwickelt die PKR-Aktivierung zu hemmen und damit eine ausreichende, selektive (virale) Proteinsynthese sicher zu stellen (Kash et al. 2006).

So aufschlussreich eine GO-Analyse hinsichtlich der Gesamtregulation biologischer Prozesse sein kann, so birgt sie eine entscheidende Gefahr: Es ist anzunehmen, dass ein Signalweg bei einer mehrheitlich herunterregulierten Genexpression tatsächlich unterdrückt wird. Zu bedenken ist, dass zahlreiche Gene durch ihre verminderte Expression eine Aktivierung des Signalweges induzieren können. Als Beispiel soll hierbei dienen, dass zum Zeitpunkt 4 h p. i. der biologische Prozess „Zellveränderungen durch Apoptose“ durch vermindert exprimierte Gene (REL, MYC) repräsentiert war. Man könnte zu dem Schluss kommen, dass eine Unterdrückung der Apoptose vorlag und propagieren, dass die Influenzavirusinfektion einen antiapoptotischen Einfluss auf die Zelle hatte. In Wirklichkeit trägt das Gen REL durch seine Herunterregulation zur Apoptose bei, während MYC dadurch antiapoptotisch wirkt (Rayet et al., 2003; Hoffman und Liebermann, 2008). Damit wird deutlich, dass für eine biologische Interpretation von Microarray-Experimenten eine gezielte Betrachtung relevanter Signalwege unumgänglich ist.

#### Die Reaktion auf eine HPAIV-Infektion: die initial relevanten Kandidatengene:

Diese sogenannten basischen helix-loop-helix Proteine ID1, ID2 und ID3 sind Faktoren des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung. Die Expression dieser Gene ist durch Wachstumsfaktoren stimulierbar. Werden alle drei Gene simultan vermindert exprimiert, führt dies zu einer verzögerten DNA-Synthese und damit zu einer Hemmung des Zellwachstums (Barone et al., 1994). Bereits 2 h p. i. führte die HPAIV-Infektion zu einer verminderten Expression von ID1, ID2 und ID3 und damit möglicherweise zu einer Unterdrückung des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung. Dies könnte als erster Hinweis auf den zellulären „shut-off“ interpretiert werden.

Smad6 vermittelt die Induktion von TGF- $\beta$  (Kawabata und Miyazono, 1999), welches in zahlreichen Signalkaskaden eine Rolle spielt, so auch in der Induktion einer Immunantwort. TGF- $\beta$ 1 wird u. a. in Leukozyten gebildet. Seine Expression führt zur autokrinen und parakrinen Stimulation der Differenzierung, Proliferation und Aktivierung von Immunzellen. Darüber hinaus moduliert es die Expression von Adhäsionsmolekülen und ist beteiligt an der Ausbildung eines chemotaktischen

Gradienten (Letterio und Roberts, 1998). Smad6 konnte durch die verminderte Expression vermutlich keine TGF- $\beta$ -assoziierte Immunantwort induzieren. Im Experiment konnte auch keine verstärkte TGF- $\beta$ -Expression nachgewiesen werden. Die verminderte Expression des TGF- $\beta$ -Rezeptors 1 (TGFBR1, Daten nicht dargestellt) unterstreicht die These der Unterdrückung einer TGF- $\beta$ -vermittelten Wirtszellantwort.

Die Regulation der Zytokinexpression erfolgt unter anderem über die Proteine der „suppressor of cytokine signaling“ (SOCS) Familie. Der Induktion von Zytokinen folgt unmittelbar eine verstärkte SOCS-Expression. Diese verhindert eine überschießende Immunantwort durch negative Regulation. SOCS modulieren hierbei auf vielfältige Weise. Sie inaktivieren die Janus-Kinasen oder blockieren die „signal transducers and activators of transcription“ (STATs) (Ilangumaran et al., 2004). SOCS wurden im vorliegenden Experiment zu allen Zeitpunkten vermindert exprimiert nachgewiesen, darunter SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS4, SOCS5. Von den gut charakterisierten SOCS1, 2 und 3 ist bekannt, dass sie in sehr geringen oder nicht nachweisbaren Mengen exprimiert vorliegen, jedoch rapide mit dem Auftreten u. a. der Proteine IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$  und GM-CSF ansteigen (Krebs und Hilton, 2001). Die verminderte Expression der SOCS im Experiment könnte damit auch ein Hinweis auf die fehlende Induktion einer Zytokinantwort nach der Infektion mit HPAIV sein.

Im Rahmen der GO-Analyse wurde die Bedeutung der PKR-Hemmung als mögliche Ursache für die selektive virale Proteinsynthese diskutiert. PKR hat jedoch auch direkten Einfluss auf die Immunantwort der Zelle. PKR aktiviert MAP-Kinasen wie P38, die für die Induktion einer Zytokinantwort im TLR-Signalweg verantwortlich sind. Die PKR kann im TLR-Signalweg sowohl MyD88-abhängig als auch MyD88-unabhängig aktiviert werden. TIRAP vermittelt hierbei vermutlich die MyD88-unabhängige PKR-Aktivierung (Hornig et al., 2001). Eine verminderte Expression von TIRAP könnte die PKR-Aktivierung auf dem MyD88-unabhängigen Weg verhindern.

Das vasoaktive Peptid Endothelin 1 wurde 2 h p. i. vermindert exprimiert. Es gehört neben Angiotensin zu den potentesten Vasokonstriktoren und wird ausschließlich auf Endothelzellen exprimiert (Bassenge, 1996). Es konnte keine Literatur über eine aktive

Unterdrückung der Endothelinexpression gefunden werden. Es erscheint naheliegend, von einer Vasodilatation und damit Hypotension im Kreislaufsystem HPAIV-infizierter Hühner auszugehen. Bemerkenswert ist generell die Expression von Endothelin 1 auf DF-1-Zellen. Neben den bereits genannten Endothelzellmarkern ist die Regulation von Endothelin-1 ein weiterer Hinweis, dass die DF-1-Zellen Eigenschaften von Endothelzellen aufweisen.

Die Expression von RGS2 war zunächst verstärkt (2 h p. i.) und später (4 h bis 7,5 h, Daten nicht dargestellt) vermindert. Die Funktion von RGS2 ist vielfältig. Neben Angiotensin-II und Endothelin 1 spielt RGS2 eine Rolle in der Regulation des Blutdrucks. Unter Abwesenheit von RGS2 kommt es zu einem erhöhten Blutdruck (Le und Coffman, 2003). Im Zusammenhang mit der Hypothese einer Endothelin 1-induzierten Hypotension unterstützt eine frühe, verstärkte RGS2-Expression möglicherweise die Senkung des Blutdrucks. Die nachgewiesene Verminderung von RGS2 zu den späteren Infektionszeitpunkten wird als ein Hinweis für eine Gegenregulation interpretiert.

#### Die Regulation des Toll-like-Rezeptor Signalweges in R65/06-infizierten DF-1-Zellen

Das Interferonsystem ist eine der ersten Verteidigungsstrategien in der Bekämpfung einer Virusinfektion. Die membranassoziierten Toll-like-Rezeptoren sind u. a. für die Initiation der IFN-Antwort verantwortlich. TLR sind in der Evolution hochkonserviert. Diese Transmembranproteine werden auf Zellen der angeborenen Immunantwort (Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, natürliche Killerzellen), auf Zellen der adaptiven Immunantwort (T- und B-Lymphozyten) sowie u. a. auf Fibroblasten und Endothelzellen exprimiert (Saini et al., 2007).

Toll-like-Rezeptoren (TLR) gehören zu den zellassoziierten PRR („pattern recognition receptor“), die PAMPs („pathogen-associated molecular pattern“) auf der Zelloberfläche und auf membrangebundenen Vesikeln erkennen. TLR sind unerlässlich in der Erkennung viraler Infektionen. Eine Folge der TLR-Aktivierung ist die Expression von Typ-I-IFN und von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (Abb. 2). Infizierte und umliegende Zellen entwickeln einen sogenannten „antiviralen Status“. Die virale Proteinsynthese wird dabei blockiert und die virale RNA abgebaut. Auf dieser Grundlage haben Viren Strategien entwickelt, um diese (pro)inflammatorische

Reaktion der Wirtszelle zu umgehen (Thompson und Locarnini, 2007). Sowohl im TLR-Repertoire, als auch in der durch die TLR-Aktivierung resultierenden Zellantwort, gibt es im Huhn wesentliche Unterschiede im Vergleich zum Säuger (Boyd et al., 2007).

Viren haben Strategien entwickelt, die IFN-Antwort in der Wirtszelle zu unterdrücken. So verhindert das NS1-Protein der Influenza-A-Viren die Aktivierung der Doppelstrang-RNA-abhängigen Protein-Kinase (PKR) und damit die Induktion von interferonregulierenden Faktoren (IRF), NF- $\kappa$  B und JUN. Dadurch erfolgt keine Stimulation einer IFN-Antwort (Levy und Garcia-Sastre, 2001).

Bereits 4 h nach der Infektion mit R65/06 fand neben der verminderten TIRAP-Expression eine Herunterregulation von tragenden Faktoren des TLR-Signalweges statt. Die verminderte Expression von MyD88, IKK- $\beta$ , NF- $\kappa$  B und JUN trugen dazu bei, dass keine Zytokininduktion und keine antivirale IFN-Antwort erfolgte. Es konnte keine Regulation der mRNA proinflammatorischer Moleküle gefunden werden und eine Induktion der SOCS-Proteine blieb aus. Zusätzlich trug die Herunterregulation des IFN $\alpha$ R1 dazu bei, dass keine antivirale IFN-Antwort vermittelt werden konnte. Die HPAIV-Infektion führte demnach zu einer Unterdrückung des TLR-Signalweges.

Nach 6 h wurden zusätzlich der TLR1 Typ 2 (chTLR1/2) und die Faktoren PIK3CB, TRIF, TRAF 6, IKK- $\alpha$ , TRAF 3, TAB 2, MAP2K4, CASP8 und TIRAP herunterreguliert. Nach 7,5 h kamen noch MAPK1, TOLLIP und erneut JUN hinzu.

Die gesteigerte Expression von P38 (6 h und 7,5 h p. i.), TAK1 sowie TLR5 (7,5 h p. i.) hatte keinen stimulierenden Einfluss auf die Induktion einer Zytokinantwort. Offensichtlich spielten die hemmenden Anteile im Signalweg die dominierende Rolle. Dies bestätigt, dass auch zu den späteren Zeitpunkten keine Gegenregulation zur Unterdrückung des TLR-Signalweges stattfindet.

Die vorliegenden Ergebnisse unterstreichen die Resultate der In-vivo-Untersuchungen von Suzuki et al. (2009) im Huhn nach HPAIV-Infektion. Hier konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit einem hochvirulenten AIV zu einem rapiden Abfall der Genexpression von IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  und proinflammatorischen Zytokinen unmittelbar vor dem Tod führte.

Unabhängig von der Unterdrückung des TLR-Signalweges lag zu allen Zeitpunkten eine erhöhte mRNA-Expression von TL1a (TNFSF15) vor.

#### Rolle von TL1a bei der HPAIV-Infektion

Bis heute konnte kein Nachweis von TNF- $\alpha$  im Hühnergenom erfolgen (Davison et al., 2008). Umfangreiche Untersuchungen zur Charakterisierung der Rolle von TL1a lassen jedoch den Schluss zu, dass TL1a zahlreiche Funktionen von TNF- $\alpha$  erfüllt (Park et al., 2007; Takimoto et al., 2008). Auch im Säugetier kommt TL1a als Protein der TNF-Superfamilie vor (Takimoto et al., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass TL1a durch LPS induziert wird, die Apoptose in Hühnerembryofibroblasten auslöst und an die TNF- $\alpha$  Rezeptoren des Huhns TNFR1B und DcR3 („decoy receptor 3“) binden kann. Möglicherweise ist TL1a für die ausgedehnten Lymphozytennekrosen in den lymphatischen Organen verantwortlich. In der Literatur wurden TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  und andere Zytokine dafür verantwortlich gemacht (Perkins und Swayne, 2001).

Die Injektion von TL1a geht im Huhn mit einer verminderten Futteraufnahme und einer erhöhten Körperinnentemperatur einher (Takimoto et al., 2008). Beides sind klinische Erscheinungen, die im Rahmen einer HPAIV-Infektion zu beobachten sind. Nach einer TL1a-Injektion weisen die Tiere zudem eine verstärkte IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN- $\gamma$ -Expression auf (Takimoto et al., 2008). Damit ist offensichtlich, dass TL1a bei der Induktion proinflammatorischer Zytokine eine Rolle spielt. Die fehlende Zytokin-induktion nach verstärkter TL1a Expression in den eigenen Untersuchungen unterstreicht, dass die HPAIV-Infektion möglicherweise diese TL1a-Funktion unterdrücken kann.

Bisher ist noch nicht bekannt, ob TL1a eine vergleichbare Funktion wie TNF- $\alpha$  bei der Aktivierung von Endothelzellen aufweist. Die Bindung von TNF- $\alpha$  an den Rezeptor TNFR1B führt in Gefäßendothelien zu einer erhöhten Leukozytenadhäsion, einer verstärkten Durchlässigkeit zur transendothelialen Migration und zu der Induktion der Thrombogenese. Vermittelt wird dies durch die Aktivierung von PI3K (Bradley, 2008). Im Experiment war PI3K zusammen mit TNFR1B vermindert exprimiert, so dass auf diesem Weg anscheinend keine verstärkte Leukozytenadhäsion oder Thrombogenese vermittelt wird.

Weiterhin wurden die Gene für E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 nicht verstärkt exprimiert (Pober et al., 1986; Munro et al., 1989). Diese Proteine könnten eine erhöhte Endotheladhäsion von Leukozyten vermitteln und dadurch das Auswandern von Entzündungszellen in das betroffene Gewebe ermöglichen (Bradley, 2008). Der einzige Faktor zur Vermittlung der transendothelialen Leukozytenmigration mit einer verstärkten Expression im Experiment war PECAM-1. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass der perakute Verlauf der HPAIV-Infektion mit der Degeneration und Nekrose betroffener Parenchyme einhergeht, eine Infiltration mit Entzündungszellen jedoch nur in geringem Ausmaß festzustellen ist. Ob TL1a direkt für die gesteigerte PECAM-1 Expression verantwortlich ist, kann nicht abschließend geklärt werden.

Typisch für die HPAIV-Infektion scheint eine erhöhte Gefäßpermeabilität zu sein, die mit einer verstärkten Transsudatbildung (Ödeme, Ergüsse) einhergeht. TNF $\alpha$  ist in der Lage diese klinischen Symptome zu vermitteln (Bevilacqua et al., 1986). Die Rolle von TL1a ist hierbei noch nicht aufgeklärt. Möglicherweise spielt jedoch TL1a bei der Induktion der Thrombogenese nach einer HPAIV-Infektion eine entscheidende Rolle.

#### Einfluss der HPAIV-Infektion auf die Blutgerinnungskaskade

Grundlage für die Interpretation der vorliegenden Ergebnisse sind die Untersuchungen zur Verbrauchskoagulopathie bei der klassischen Geflügelpest (Gagel et al., 1970). Als Ursache der Hämorrhagien wird eine allgemeine intravasale Gerinnung, die als Verbrauchskoagulopathie zu charakterisieren ist, angesehen. Fibrinablagerungen in kleinen Gefäßen der Organe mit nachfolgender Nekrose unterstreichen dies.

Gagel et al. (1970) konnten zeigen, dass einer gesteigerten Gerinnungsaktivität in infizierten Hühnern eine Hypokoagulabilität folgte. Diese war gekennzeichnet u. a. durch den Abfall der Blutplättchenzahl und von Gerinnungsfaktoren (Prothrombin, Faktor VIII). Die histologischen Untersuchungen zeigten, dass trotz der verstärkten Fibrinogeninduktion nur wenig Fibrin im Gewebe nachweisbar war. Als Ursache hierfür konnte eine gleichzeitig gesteigerte Fibrinolyse nachgewiesen werden.

Die Autoren Muramoto et al. (2008) haben aus Studien an Hühnern geschlossen, dass die HPAIV-Infektion neben dem erhöhten Gehalt von Thromboplastin in Organen eine Dysfunktion der Endothelzellen verursacht. Diese führt zu einer Blutgerinnungsstörung auf Grundlage einer Verbrauchskoagulopathie.

Der TFPI (Thromboplastininhibitor) reguliert als Proteaseinhibitor den thromboplastinabhängigen Stoffwechselweg der Blutgerinnung. Dieser extrinsische Weg der Gerinnungskaskade wird durch die Ausschüttung von Thromboplastin von durch TNF- $\alpha$ , IL-1 oder TGF- $\beta$  aktivierten oder geschädigten Endothelzellen ausgelöst. Der Gerinnungsprozess beginnt hier mit der Bildung des Faktor-VIIa-Thromboplastin-Komplexes. Dieser führt über die Aktivierung von Thrombin zur Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin. TFPI bindet den Faktor-VIIa-Thromboplastin-Komplex und hemmt damit die Fibrinbildung. Dadurch wirkt TFPI zu Beginn der Gerinnungskaskade und verhindert, dass ein geringer prokoagulatorischer Stimulus eine überschießende Thrombinaktivierung auslöst (Crawley und Lane, 2008). Die im Experiment verminderte Expression von TFPI könnte zu einer verstärkten Thrombusbildung geführt haben.

Das Protein THBD (Thrombomodulin) ist ein endothelspezifischer Typ-1-Membranrezeptor. Die Bindung von Thrombin an Thrombomodulin führt zu einer verstärkten Aktivierung des Protein-C Anti-Gerinnungs-Stoffwechselweges. Die Aktivierung von Protein-C führt zu einer Degradierung der Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa und reduziert den Thrombingehalt. Der Thrombin-Thrombomodulinkomplex selbst hemmt die Aktivierung von Thrombozyten und verhindert die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin (Esmon, 1989). Eine verminderte Expression von Thrombomodulin, wie sie in der Untersuchung vorlag, wird als Marker für eine Dysfunktion von Endothelzellen angesehen. Sie führt u. a. zu einer verstärkten Thrombogenese (Sandusky et al., 2002).

Untersuchungen an humanen Endothelzellen konnten zeigen, dass Thrombomodulin auf Endothelzellen durch Endotoxine, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  herunterreguliert wird und damit im Zusammenhang mit einer gesteigerten Gerinnungsneigung im Rahmen einer Sepsis oder Entzündung zu sehen ist (Hirokawa und Aoki, 1990). Die im Experiment nachgewiesene verstärkte Expression von TL1a könnte somit zur verminderten THBD Expression beigetragen haben. Voraussetzung ist jedoch, dass TL1a in der Lage ist analog zu TNF- $\alpha$  im Säugetier, Thrombomodulin zu regulieren.

Die nachgewiesene gesteigerte Expression von Annexin 2, einem hochpotenten, fibrinolytischen Protein, unterstützt die These von Gagel et al. (1970), dass die Hyperkoagulopathie vermutlich mit einer gesteigerten fibrinolytischen Aktivität einhergeht.

Im Einklang mit den Untersuchungen von Gagel et al. (1970), Muramoto et al. (2006) und Hirokawa et al. (1990) ist eine Verbrauchskoagulopathie höchstwahrscheinlich die Ursache für die ausgeprägte Blutungsneigung in HPAIV-infizierten Hühnern. Die verminderte Expression der Gene Thrombomodulin, Thromboplastininhibitor und die verstärkte Expression von Annexin 2 sowie TL1a spielen vermutlich eine wesentliche Rolle in der Alteration der Blutgerinnung im Huhn.

#### Die Rolle der Blutplättchen in der Pathogenese der HPAIV-Infektion

Protease-aktivierte Rezeptoren auf der Oberfläche von Thrombozyten vermitteln eine prokoagulatorische Wirkung durch Aktivierung dieser Zellen. Hierzu zählen die Rezeptoren F2RL1 und F2RL2. Im vorliegenden Experiment wurden beide Rezeptoren vermindert exprimiert. Eine Aktivierung der Blutplättchen im Sinne einer prokoagulatorischen Stimulation durch die Rezeptoren F2RL1 und F2RL2 wurde anscheinend nicht vermittelt. Dies könnte für die Gerinnungskaskade von untergeordneter Bedeutung sein, da die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin hiervon unbeeinflusst bleibt und damit einer gesteigerten Gerinnungsneigung nicht entgegensteht (Coughlin, 2005).

Möglicherweise ist die verminderte Plättchenaktivierung nicht nur auf der Ebene der Blutgerinnungskaskade von Bedeutung. Sterz und Weiss konnten bereits 1974 zeigen, dass Inflenzaviren von aviären Thrombozyten phagozytiert werden. Elektronenmikroskopisch konnte im Gegensatz zum zellkernfreien Säugerthrombozyt eine Replikation in den Vogelzellen nachgewiesen werden. Eine besondere Eigenschaft der Vogelthrombozyten ist ihre Fähigkeit zur Phagozytose und durch lysosomale Aktivität Virionen in großer Zahl zu zerstören (Sterz und Weiss, 1974). Eine virusinduzierte Hemmung der Plättchenaktivierung könnte zu einer verminderten Phagozytoseleistung und lysosomalen Aktivität der Thrombozyten führen und damit der Zerstörung der Viren entgegenwirken.

#### Der Nachweis AIV-spezifischer RNA

Auf dem „GeneChip<sup>®</sup> Chicken Genome Array“ sind zahlreiche Oligonukleotide aufgebracht, die spezifisch für hühnerassoziierte Viren und Bakterien sind. Bei den Inflenzaviren handelt es sich um das Inflenzavirus A/Hong Kong/1073/99 (H9N2).

Die aufgebrauchten Oligonukleotide sind annotiert zu den Proteinen NP, NS1, NS2, M1, M2, HA, NA, PB1, PB2 und PA.

Im Experiment konnten die Gene NP, NS1, NS2, M1, M2, PB1 und PA bereits 4 h p. i. nachgewiesen werden. Zu keinem Zeitpunkt erfolgte der Nachweis des HA, NA und PB2 Gens. Dies ist durch die Verwendung von Oligonukleotiden zu erklären deren Homologie nicht ausreichend für eine Bindung und damit für ein Signal auf dem Microarray war. Beispielsweise zeigte PB2 im direkten Sequenzvergleich zwischen R65/06 (H5N1) und A/Hong Kong/1073/99(H9N2) eine Homologie von lediglich 86 %. Man kann davon ausgehen, dass die Oligonukleotide des Chips für HA (H9) und NA (N2) keine ausreichende Homologie zur Bindung der H5 bzw. N1 Gene von R65/06 (H5N1) aufweisen.

#### Die Qualitätskontrolle der Microarray GenChips®

Der Infektion der DF-1-Zellen mit R65/06 folgte die RNA-Isolation nach 2 h, 4 h, 6 h und 7,5 h mit Hilfe des „RNeasy Mini Kits“. Die Qualitätskontrolle der gewonnenen RNA mittels Agilent 2100 Bioanalyzer auf einem „RNA Pico Lab Chip®“ wies eine hohe Qualität der RNA aus. Die „RNA integrity number“ (RIN) zwischen 9,7 und 10 erfüllte die Voraussetzungen zur Verwendung in einem Microarray-Experiment (Thompson et al., 2007). Die Abweichungen in der RNA-Konzentration der Proben zwischen 6,46 und 54,63 ng/µl deuteten auf eine variable Effizienz in der RNA-Isolation hin und bedingten den geringen Gesamt-RNA Einsatz für die Erststrangsynthese mit 600 ng RNA. Das mit Hilfe der GCOS 1.4 Software ermittelte Rauschen zwischen 1,27 und 1,84 (Raw Q) ist ebenso akzeptabel wie die ermittelten prozentualen Anteile der „present calls“, welche array-spezifisch, gewebsspezifisch und expressionsprofilsspezifisch sind.

Die „present calls“ nicht infizierter Proben lagen zwischen 47,83 % und 48,67 %. Die „present calls“ der infizierten Proben sanken von 47,57 % (2 h p. i.) auf 39,07 % (7,5 h p. i.) ab. Der verminderte Anteil „present calls“ war auf eine Verschiebung zugunsten der „absent calls“ zu begründen und spiegelte die insgesamt verminderte Genexpression im Verlauf der Infektion wider.

Die Infektion permissiver Zellen mit Influenzaviren führt zu zahlreichen Alterationen im Expressionsprogramm. Zum einen wird der Transport zellulärer mRNA vom

Zellkern in das Zytoplasma inhibiert (Katze und Krug, 1984). Hierbei spielt das virale Protein NS1 (Hemmung der Polyadenylation der Vorläufer-mRNA) eine entscheidende Rolle (Nemeroff et al., 1998; Shimizu et al., 1999). Darüber hinaus kommt es zur Degradation zellulärer mRNA im Zytoplasma der Wirtszelle (Inglis, 1982; Beloso et al., 1992) und zu einer Hemmung der Translation zellulärer mRNA zugunsten der viralen mRNA (Garfinkel und Katze, 1992; Garfinkel und Katze, 1993; Kash et al., 2006). Beloso et al. (1992) konnten zeigen, dass es bereits 2 h nach der Infektion von COS-1-Zellen (Nierenzellen, Grüne Meerkatze) zu einer Reduktion der zellulären RNA um ca. 50 % kommt. Bei der Replikation der viralen RNA ist weiterhin relevant, dass sich der virale RNA-Polymerase-Komplex der 5'Enden von Transkripten der zellulären Polymerase-II bedient („cap snatching activity“) und damit ebenfalls zur Degradation zellulärer RNA beiträgt (Kash et al., 2006). Ob die Degradation zellulärer mRNA eine Folge der bevorzugten Translation viraler mRNA ist oder ob das Virus eine selektive mRNA-Degradation induziert, ist bis heute noch nicht geklärt (Zurcher et al., 2000).

Unter Berücksichtigung der RIN und der ermittelten Rauschsignale lag kein Hinweis auf eine mindere Probenqualität vor, die die Vergleichbarkeit der Microarray-GenChip<sup>®</sup>s in Frage stellen könnte.

Die ermittelten Skalierungsfaktoren wiesen darauf hin, dass der Vergleich der Proben zu den Zeitpunkten 6 h und 7,5 h mit Vorsicht vorzunehmen war. Skalierungsfaktoren (bzw. durchschnittliche Fluoreszenzintensitätsunterschiede) mit einem Faktor größer 3 deuten auf signifikante Unterschiede zwischen den Microarrays hin. Die Erhöhung der Skalierungsfaktoren in infizierten Proben war erneut ein Hinweis auf eine insgesamt verminderte Genexpression zu den späten Infektionszeitpunkten. Die Signalintensitäten waren über den gesamten Chip vermindert. Der Chip wurde dadurch „dunkel“. Der Vergleich von Microarray-Chips verlangt jedoch eine gleiche Durchschnittszielintensität und damit die künstliche Aufhellung der Chips durch einen größeren Skalierungsfaktor.

Die Streudiagramme zeigten, dass die lineare Normalisierung für die Probenzeitpunkte 2 h und 4 h optimal geeignet war. Um eine Vergleichbarkeit zu ermöglichen, mussten auch die Daten der späteren Probenzeitpunkte auf die gleiche Weise normalisiert werden. Da die Streudiagramme darauf hinwiesen, dass die Regulation der Gene nicht

zu gleichen Anteilen vermehrt und vermindert vorlag (Bananenform), ist die lineare Normalisierung für diese Datensätze nicht optimal.

Die Validierung der Microarray-Datenanalyse erfolgte mittels real-time RT-PCR anhand des vermindert exprimierten Gens IFN $\alpha$ R1 und des erhöht exprimierten Gens TL1a. Die Expressionsunterschiede („fold change“) wurden mit den „fold changes“ aus den Microarray-Daten verglichen. Die Ergebnisse der real-time RT-PCR bestätigen die Ergebnisse der Analyse der Genexpression mittels Microarray.

## 6 Zusammenfassung

1. Wesentlich für die Pathogenese der HPAIV R65/06 (H5N1) Infektion war der virale Neurotropismus. Der tödliche Verlauf nach experimentellen Infektionen von Mäusen, Sperlingsvögeln, Schwänen und drei Entenspezies korrelierte mit einem Antigennachweis im Nervengewebe. Die Ausprägung eines Endotheltropismus bedingte nicht einen beschleunigten Krankheitsverlauf.
2. Die vergleichende Untersuchung HPAIV-infizierter Stock-, Peking- und Moschusenten zeigte, dass die Letalität innerhalb einer Spezies vom verwendeten Virusisolat („clade 1“ und „clade 2.2“) und innerhalb eines verwendeten Virusisolates von der infizierten Spezies abhängt. Bei Mäusen zeigten drei HPAIV-Isolate des „clade 2.2“ trotz naher Verwandtschaft Virulenzunterschiede, wobei nur die Wildvogelisolat zu einer hohen Letalität führten.
3. Bei Hühnern konnte HPAIV-Antigen 12 h p. i. im Respirationstrakt, in mononukleären Zellen und in Endothelzellen nachgewiesen werden. Bereits nach 24 h lag ein disseminierter Endotheltropismus von HPAIV H5N1 vor.
4. Für den letalen Krankheitsverlauf bei Hühnern dürfte die frühzeitige Infektion des Herzmuskels von Bedeutung sein. Die Infektion, Degeneration und Nekrose von Hepatozyten und Endothelzellen wurde als Ursache der hämorrhagischen Diathese diskutiert.
5. Lymphozytendepletion in und ausgeprägte Nekrosen von lymphatischen Organen sowie geringgradige Entzündungsreaktionen in den Geweben waren Anzeichen einer Immunsuppression nach HPAIV-Infektion von Hühnern.
6. Nach Infektion von DF-1-Zellen kam es zur Inhibition verschiedenartiger biologischer Prozesse.
7. Die verminderte Expression der SOCS wurde als ein Hinweis auf die fehlende Induktion einer Zytokinantwort nach der Infektion mit HPAIV interpretiert.
8. Bereits 4 h nach der Infektion war eine Herunterregulation des TLR-Signalweges festzustellen. Die verminderte Expression betraf: TIRAP, MyD88, IKK- $\beta$ , NF- $\kappa$  B, JUN, TLR1 Typ 2 (chTLR1/2), PIK3CB, TRIF, TRAF 6, IKK- $\alpha$ , TRAF 3, TAB 2,

MAP2K4, CASP8, MAPK1 und TOLLIP. Dies führte dazu, dass keine Zytokininduktion und keine antivirale IFN-Antwort erfolgten. Innerhalb des TLR-Signalweges fanden sich drei Gene, die gesteigert exprimiert wurden: P38, TAK1 sowie TLR5. Offensichtlich spielten die hemmenden Anteile im Signalweg die dominierende Rolle.

9. Die stets erhöhte TL1a-mRNA-Expression war vermutlich für die ausgedehnten Lymphozytennekrosen in den lymphatischen Organen verantwortlich.
10. Nach der HPAIV Infektion von DF-1-Zellen wurden zahlreiche für Endothelzellen charakteristische Gene reguliert. Die verminderte Expression der Gene für Thrombomodulin, Thromboplastininhibitor und die verstärkte Expression von Annexin 2 sowie TL1a spielten vermutlich eine wesentliche Rolle bei der Alteration der Blutgerinnung im Huhn.
11. Mittels real-time RT-PCR wurden die Ergebnisse der Microarray-Studien bestätigt.

## 7 Summary

1. Main pathogenetic factor of the infection with HPAIV R65/06 (H5N1) was the viral neurotropism. The fatal outcome after experimental infection of mice, passerine birds, swans, and three duck species correlated with antigen detection in neuronal tissues. Endotheliotropism did not cause an accelerated course of the disease.
2. A comparative investigation of HPAIV-infected mallards, pekin and muscovy ducks clarified, that mortality regarding each duck species depended on the virus isolate used (clade 1 and clade 2.2). With regard to a particular virus isolate, the mortality depended on the duck species infected. After HPAIV-infection of mice, three virus isolates exhibited considerable differences in virulence despite being genetically closely related. A high mortality was restricted to the virus isolated from wild birds.
3. In HPAIV-infected chicken, antigen detection was possible in the respiratory tract, mononuclear inflammatory cells and in endothelial cells 12 h p. i. A disseminated endotheliotropism was already found 24 h p. i.
4. Early myocardial infection was relevant for the fatal course of disease in chicken. HPAIV-infection, degeneration and necrosis of hepatocytes and endothelial cells was discussed as cause of coagulopathy.
5. Lymphocyte depletion in and marked necrosis of lymphoid tissues as well as marginal inflammatory reactions were detected in chicken after HPAIV-infection indicating an underlying immunosuppression.
6. After HPAIV-infection of DF-1-cells the inhibition of various biological processes was detected.
7. A decreased expression of SOCS was explained as evidence for the lack of cytokine induction after HPAIV-infection of DF-1-cells.
8. A down-regulation of TLR-signaling was found 4 h p. i.. The decreased expression affected: TIRAP, MyD88, IKK- $\beta$ , NF- $\kappa$ B, JUN, TLR1 Typ 2 (chTLR1/2), PIK3CB, TRIF, TRAF 6, IKK- $\alpha$ , TRAF 3, TAB 2, MAP2K4, CASP8, MAPK1 and TOLLIP. Subsequently, the induction of cytokines and antiviral IFN-response failed.

Regarding TLR-signaling, three genes were found up-regulated: P38, TAK1, and TLR5. Apparently, repressive factors play a major role in TLR-signaling.

9. The constant up-regulation of TL1a was potentially responsible for the widespread lymphocyte necrosis in lymphoid tissues.
10. After HPAIV-infection of DF-1-cells a range of endothelial cell markers were differentially regulated. A down-regulation of thrombomodulin, thromboplastin inhibitor and up-regulation of annexin 2 and TL1a was discussed as essential for the alteration of blood coagulation in chicken.
11. Real-time RT-PCR confirmed the results of the microarray studies.

## 8 Literaturverzeichnis

**Akira S, Takeda K, Kaisho T (2001).** Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* 2:675-680.

**Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006).** Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801.

**Amin A, Shalaby MA, Imam IZ (1980).** Studies on influenza virus isolated from migrating birds in Egypt. *Comp Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 3:241-246.

**Auer H, Newsom DL, Kornacker K (2009).** Expression Profiling Using Affymetrix GeneChip Microarrays. *Methods Mol. Biol.* 509:35-46.

**Bammler T, Beyer RP, Bhattacharya S, Boorman GA, Boyles A, Bradford BU, Bumgarner RE, Bushel PR, Chaturvedi K und Andere (2005).** Standardizing global gene expression analysis between laboratories and across platforms. *Nat. Methods* 2:351-356.

**Barone MV, Pepperkok R, Peverali FA, Philipson L (1994).** Id proteins control growth induction in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91:4985-4988.

**Barber MR, Aldridge JR Jr., Webster RG, Magor KE (2010).** Association of RIG-I with innate immunity of ducks to influenza. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:5913-5918.

**Bassenge E (1996).** Endothelial function in different organs. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 39:209-228.

**Baum A und Garcia-Sastre A (2009).** Induction of type I interferon by RNA viruses: cellular receptors and their substrates. *Amino. Acids.* 38:1283-1299.

**Beare AS und Webster RG (1991).** Replication of avian influenza viruses in humans. *Arch. Virol* 119:37-42.

**Becker WB (1966).** The isolation and classification of Tern virus: influenza A-Tern South Africa--1961. *J. Hyg. (Lond)* 64:309-320.

**Beissbarth T und Speed TP (2004).** Gostat: find statistically overrepresented Gene Ontologies within a group of genes. *Bioinformatics.* 20:1464-1465.

**Beloso A, Martinez C, Valcarcel J, Santaren JF, Ortin J (1992).** Degradation of cellular mRNA during influenza virus infection: its possible role in protein synthesis shutoff. *J. Gen. Virol.* 73 ( Pt 3):575-581.

**Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR, Fiers W, Cotran RS, Gimbrone MA, Jr. (1986).** Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83:4533-4537.

**Boon AC, Sandbulte MR, Seiler P, Webby RJ, Songserm T, Guan Y, Webster RG (2007).** Role of terrestrial wild birds in ecology of influenza A virus (H5N1). *Emerg. Infect. Dis.* 13:1720-1724.

**Bourmakina SV und Garcia-Sastre A (2003).** Reverse genetics studies on the filamentous morphology of influenza A virus. *J. Gen. Virol* 84:517-527.

**Boyd A, Philbin VJ, Smith AL (2007).** Conserved and distinct aspects of the avian Toll-like receptor (TLR) system: implications for transmission and control of bird-borne zoonoses. *Biochem. Soc. Trans.* 35:1504-1507.

**Bradley JR (2008).** TNF-mediated inflammatory disease. *J. Pathol.* 214:149-160.

**Brown JD, Stallknecht DE, Beck JR, Suarez DL, Swayne DE (2006).** Susceptibility of North American ducks and gulls to H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses. *Emerg. Infect. Dis.* 12:1663-1670.

**Brown JD, Stallknecht DE, Swayne DE (2008).** Experimental infection of swans and geese with highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) of Asian lineage. *Emerg. Infect. Dis.* 14:136-142.

**Canales RD, Luo Y, Willey JC, Austermiller B, Barbacioru CC, Boysen C, Hunkapiller K, Jensen RV, Knight CR und Andere (2006).** Evaluation of DNA microarray results with quantitative gene expression platforms. *Nat. Biotechnol.* 24:1115-1122.

**Capua I und Mutinelli F (2001).** A colour atlas and text on Avian Influenza. Papi Editore, Bologna.

**Cauthen AN, Swayne DE, Sekellick MJ, Marcus PI, Suarez DL (2007).** Amelioration of influenza virus pathogenesis in chickens attributed to the enhanced interferon-inducing capacity of a virus with a truncated NS1 gene. *J. Virol* 81:1838-1847.

**Chen H, Li Y, Li Z, Shi J, Shinya K, Deng G, Qi Q, Tian G, Fan S und Andere (2006a).** Properties and dissemination of H5N1 viruses isolated during an influenza outbreak in migratory waterfowl in western China. *J. Virol* 80:5976-5983.

**Chen H, Smith GJ, Li KS, Wang J, Fan XH, Rayner JM, Vijaykrishna D, Zhang JX, Zhang LJ und Andere (2006b).** Establishment of multiple sublineages of H5N1 influenza virus in Asia: implications for pandemic control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103:2845-2850.

**Chen H, Smith GJ, Zhang SY, Qin K, Wang J, Li KS, Webster RG, Peiris JS, Guan Y (2005).** Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl. *Nature* 436:191-192.

**Cheung CY, Poon LL, Lau AS, Luk W, Lau YL, Shortridge KF, Gordon S, Guan Y, Peiris JS (2002).** Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease? *Lancet* 360:1831-1837.

**Coughlin SR (2005).** Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J. Thromb. Haemost.* 3:1800-1814.

**Crawley JT und Lane DA (2008).** The haemostatic role of tissue factor pathway inhibitor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28:233-242.

**Davison F, Kaspers B, Schat A (2008).** Avian Immunology. Academic Press, Elsevier, London.

**Digby MR und Lowenthal JW (1995).** Cloning and expression of the chicken interferon-gamma gene. *J. Interferon Cytokine Res.* 15:939-945.

**Doerr JA, Wyatt RD, Hamilton PB (1976).** Impairment of coagulation function during aflatoxinosis in young chickens. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 35:437-446.

**Doerr JA, Huff WE, Hamilton PB, Lillehoj ED (1981).** Severe coagulopathy in young chickens produced by ochratoxin A. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 59:157-163.

**Duan L, Campitelli L, Fan XH, Leung YH, Vijaykrishna D, Zhang JX, Donatelli I, Delogu M, Li KS und Andere (2007).** Characterization of low-pathogenic H5 subtype influenza viruses from Eurasia: implications for the origin of highly pathogenic H5N1 viruses. *J. Virol* 81:7529-7539.

**Dufva M (2009).** Introduction to microarray technology. *Methods Mol. Biol.* 529:1-22.

**Dybing JK, Schultz-Cherry S, Swayne DE, Suarez DL, Perdue ML (2000).** Distinct pathogenesis of hong kong-origin H5N1 viruses in mice compared to that of other highly pathogenic H5 avian influenza viruses. *J. Virol.* 74:1443-1450.

**Elliot CCH (1989).** The pest status of the quelea. In: Bruggers RL und Elliott CCH. *Quelea quelea Africa's Bird Pest.* Oxford University Press, Oxford. Seiten: 17-34.

**Ellis TM, Bousfield RB, Bissett LA, Dyrting KC, Luk GS, Tsim ST, Sturm-Ramirez K, Webster RG, Guan Y und Andere (2004).** Investigation of outbreaks of highly pathogenic H5N1 avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002. *Avian Pathol.* 33:492-505.

**Esmon CT (1989).** The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J. Biol. Chem.* 264:4743-4746.

**Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, Coyle AJ, Liao SM, Maniatis T (2003).** IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat. Immunol.* 4:491-496.

**Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D (1991).** Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* 251:767-773.

**Frost CL, Naudé RJ, Oelofson W, Jacobson B (1999).** Comparative blood coagulation studies in the ostrich. *Immunopharmacology* 45:75-81.

**Gagel C, Linder M, Muller-Berghaus G, Lasch HG (1970).** [Wasting coagulopathy in classic fowl plague. A study of the pathogenesis of hemorrhage in virus infections]. *Zentralbl. Veterinarmed. B* 17:410-417.

**Garcia-Sastre A (2006).** Antiviral response in pandemic influenza viruses. *Emerg. Infect. Dis.* 12:44-47.

**Garfinkel MS und Katze MG (1992).** Translational control by influenza virus. Selective and cap-dependent translation of viral mRNAs in infected cells. *J. Biol. Chem.* 267:9383-9390.

**Garfinkel MS und Katze MG (1993).** Translational control by influenza virus. Selective translation is mediated by sequences within the viral mRNA 5'-untranslated region. *J. Biol. Chem.* 268:22223-22226.

**Garlanda C und Dejana E (1997).** Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 17: 1193-1202

**Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y und Andere (2004).** Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 5:R80.

**Gronesova P, Ficova M, Mizakova A, Kabat P, Trnka A, Betakova T (2008).** Prevalence of avian influenza viruses, *Borrelia garinii*, *Mycobacterium avium*, and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in waterfowl and terrestrial birds in Slovakia, 2006. *Avian Pathol.* 37:537-543.

**Guan Y, Peiris M, Kong KF, Dyrting KC, Ellis TM, Sit T, Zhang LJ, Shortridge KF (2002).** H5N1 influenza viruses isolated from geese in Southeastern China: evidence for genetic reassortment and interspecies transmission to ducks. *Virology* 292:16-23.

**Hinshaw VS, Webster RG, Easterday BC, Bean WJ, Jr. (1981).** Replication of avian influenza A viruses in mammals. *Infect. Immun.* 34:354-361.

**Hirokawa K und Aoki N (1990).** Up-regulation of thrombomodulin in human umbilical vein endothelial cells in vitro. *J. Biochem.* 108:839-845.

**Hoffman B und Liebermann DA (2008).** Apoptotic signaling by c-MYC. *Oncogene* 27:6462-6472.

**Hornig T, Barton GM, Medzhitov R (2001).** TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat. Immunol.* 2:835-841.

**Hulse DJ, Webster RG, Russell RJ, Perez DR (2004).** Molecular determinants within the surface proteins involved in the pathogenicity of H5N1 influenza viruses in chickens. *J. Virol* 78:9954-9964.

**Hulse-Post DJ, Franks J, Boyd K, Salomon R, Hoffmann E, Yen HL, Webby RJ, Walker D, Nguyen TD und Andere (2007).** Molecular changes in the polymerase genes (PA and PB1) associated with high pathogenicity of H5N1 influenza virus in mallard ducks. *J. Virol* 81:8515-8524.

**Ilangumaran S, Ramanathan S, Rottapel R (2004).** Regulation of the immune system by SOCS family adaptor proteins. *Semin. Immunol.* 16:351-365.

**Inglis SC (1982).** Inhibition of host protein synthesis and degradation of cellular mRNAs during infection by influenza and herpes simplex virus. *Mol. Cell Biol.* 2:1644-1648.

**Jakowlew SB, Mathias A, Lillehoj HS (1997).** Transforming growth factor-beta isoforms in the developing chicken intestine and spleen: increase in transforming growth factor-beta 4 with coccidia infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 55:321-339.

**Jang H, Boltz D, Sturm-Ramirez K, Shepherd KR, Jiao Y, Webster R, Smejne RJ (2009).** Highly pathogenic H5N1 influenza virus can enter the central nervous system and induce neuroinflammation and neurodegeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106:14063-14068.

**Jang J, Hong SH, Choi D, Choi KS, Kang S, Kim IH (2010).** Overexpression of Newcastle disease virus (NDV) V protein enhances NDV production kinetics in chicken embryo fibroblasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85:1509-1520.

**Jones YL und Swayne DE (2004).** Comparative pathobiology of low and high pathogenicity H7N3 Chilean avian influenza viruses in chickens. *Avian Dis.* 48:119-128.

**Kaiser P, Poh TY, Rothwell L, Avery S, Balu S, Pathania US, Hughes S, Goodchild M, Morrell S und Andere (2005).** A genomic analysis of chicken cytokines and chemokines. *J. Interferon Cytokine Res.* 25:467-484.

**Kalhor NH, Veits J, Rautenschlein S, Zimmer G (2009).** A recombinant vesicular stomatitis virus replicon vaccine protects chickens from highly pathogenic avian influenza virus (H7N1). *Vaccine* 27:1174-1183.

**Kalthoff D, Breithaupt A, Helm B, Teifke JP, Beer M (2009).** Migratory status is not related to the susceptibility to HPAIV H5N1 in an insectivorous passerine species. *PLoS. One.* 4:e6170.

**Kalthoff D, Breithaupt A, Teifke JP, Globig A, Harder T, Mettenleiter TC, Beer M (2008).** Highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) in experimentally infected adult mute swans. *Emerg. Infect. Dis.* 14:1267-1270.

**Kash JC, Goodman AG, Korth MJ, Katze MG (2006).** Hijacking of the host-cell response and translational control during influenza virus infection. *Virus Res* 119:111-120.

**Katze MG und Krug RM (1984).** Metabolism and expression of RNA polymerase II transcripts in influenza virus-infected cells. *Mol. Cell Biol.* 4:2198-2206.

**Kawabata M und Miyazono K (1999).** Signal transduction of the TGF-beta superfamily by Smad proteins. *J. Biochem.* 125:9-16.

**Keawcharoen J, van RD, van AG, Bestebroer T, Beyer WE, van LR, Osterhaus AD, Fouchier RA, Kuiken T (2008).** Wild ducks as long-distance vectors of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). *Emerg. Infect. Dis.* 14:600-607.

**Keeler CL, Bliss TW, Lavric M, Maughan MN (2007).** A functional genomics approach to the study of avian innate immunity. *Cytogenet. Genome Res* 117:139-145.

**Kibenge FS, Munir K, Kibenge MJ, Joseph T, Moneke E (2004).** Infectious salmon anemia virus: causative agent, pathogenesis and immunity. *Anim Health Res Rev.* 5:65-78.

**Kim JK, Negovetich NJ, Forrest HL, Webster RG (2009).** Ducks: the "Trojan horses" of H5N1 influenza. *Influenza. Other Respi. Viruses.* 3:121-128.

**Kitamura H, Matsuzaki Y, Kimura K, Nakano H, Imaizumi T, Satho K, Hanada K (2007).** Cytokine modulation of retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) expression in human epidermal keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* 45:127-134.

**Klopfleisch R, Werner O, Mundt E, Harder T, Teifke JP (2006).** Neurotropism of highly avian influenza virus A/chicken/Indonesia/2003 (H5N1) in experimentally infected pigeons (*Columbia livia* f. domestica). *Vet. Pathol.* 43:463-70.

**Klopfleisch R, Wolf PU, Uhl W, Gerst S, Harder T, Starick E, Vahlenkamp TW, Mettenleiter TC, Teifke JP (2007).** Distribution of lesions and antigen of highly pathogenic avian influenza virus A/Swan/Germany/R65/06 (H5N1) in domestic cats after presumptive infection by wild birds. *Vet. Pathol.* 44:261-268.

**Krebs DL und Hilton DJ (2001).** SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells* 19:378-387.

**Kuiken T, Fouchier R, Rimmelzwaan G, Osterhaus A, Roeder P (2006).** Feline friend or potential foe? *Nature* 440:741-742.

**Kuiken T, Rimmelzwaan G, van RD, van AG, Baars M, Fouchier R, Osterhaus A (2004).** Avian H5N1 influenza in cats. *Science* 306:241.

**Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Miller BR (2001).** Phylogeny of Thogoto virus. *Virus Genes* 23:211-214.

**Kwon YK, Joh SJ, Kim MC, Lee YJ, Choi JG, Lee EK, Wee SH, Sung HW, Kwon JH und Andere (2005a).** Highly pathogenic avian influenza in magpies (*Pica pica sericea*) in South Korea. *J. Wildl. Dis.* 41:618-623.

**Kwon YK, Joh SJ, Kim MC, Sung HW, Lee YJ, Choi JG, Lee EK, Kim JH (2005b).** Highly pathogenic avian influenza (H5N1) in the commercial domestic ducks of South Korea. *Avian Pathol.* 34:367-370.

**Le TH und Coffman TM (2003).** RGS2: a "turn-off" in hypertension. *J. Clin. Invest* 111:441-443.

**Lee CW, Jung K, Jadhao SJ, Suarez DL (2008).** Evaluation of chicken-origin (DF-1) and quail-origin (QT-6) fibroblast cell lines for replication of avian influenza viruses. *J. Virol Methods* 153:22-28.

**Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA (1996).** The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973-983.

**Letterio JJ und Roberts AB (1998).** Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu. Rev. Immunol.* 16:137-161.

**Levy DE und Garcia-Sastre A (2001).** The virus battles: IFN induction of the antiviral state and mechanisms of viral evasion. *Cytokine Growth Factor Rev.* 12:143-156.

**Li S, Strelow A, Fontana EJ, Wesche H (2002).** IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99:5567-5572.

**Li Z, Jiang Y, Jiao P, Wang A, Zhao F, Tian G, Wang X, Yu K, Bu Z und Andere (2006).** The NS1 gene contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses. *J. Virol* 80:11115-11123.

**Liu J, Xiao H, Lei F, Zhu Q, Qin K, Zhang XW, Zhang XL, Zhao D, Wang G und Andere (2005).** Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds. *Science* 309:1206.

**Livak KJ und Schmittgen TD (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.

**Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS, Mittmann M, Wang C, Kobayashi M und Andere (1996).** Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat. Biotechnol.* 14:1675-1680.

**Londt BZ, Nunez A, Banks J, Nili H, Johnson LK, Alexander DJ (2008).** Pathogenesis of highly pathogenic avian influenza A/turkey/Turkey/1/2005 H5N1 in Pekin ducks (*Anas platyrhynchos*) infected experimentally. *Avian Pathol.* 37:619-627.

**Matrosovich M, Stech J, Klenk HD (2009).** Influenza receptors, polymerase and host range. *Rev. Sci. Tech.* 28:203-217.

**Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD (2004).** Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *J. Virol* 78:12665-12667.

**Medzhitov R und Janeway CA Jr. (1997).** Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr.Opin.Immunol.* 9:4-9.

**Meylan E, Burns K, Hofmann K, Blancheteau V, Martinon F, Kelliher M, Tschopp J (2004).** RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat. Immunol.* 5:503-507.

**Mo IP, Brugh M, Fletcher OJ, Rowland GN, Swayne DE (1997).** Comparative pathology of chickens experimentally inoculated with avian influenza viruses of low and high pathogenicity. *Avian Dis.* 41:125-136.

**Munro JM, Pober JS, Cotran RS (1989).** Tumor necrosis factor and interferon-gamma induce distinct patterns of endothelial activation and associated leukocyte accumulation in skin of *Papio anubis*. *Am. J. Pathol.* 135:121-133.

**Muramoto Y, Ozaki H, Takada A, Park CH, Sunden Y, Umemura T, Kawaoka Y, Matsuda H, Kida H (2006).** Highly pathogenic H5N1 influenza virus causes coagulopathy in chickens. *Microbiol. Immunol.* 50:73-81.

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

**O'Neill RE, Jaskunas R, Blobel G, Palese P, Moroianu J (1995).** Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import. *J. Biol. Chem.* 270:22701-22704.

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

**Okazaki K, Takada A, Ito T, Imai M, Takakuwa H, Hatta M, Ozaki H, Tanizaki T, Nagano T und Andere (2000).** Precursor genes of future pandemic influenza viruses are perpetuated in ducks nesting in Siberia. *Arch. Virol* 145:885-893.

**Palese P und Shaw ML (2007).** Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. In: Knipe DM und Howley PM. *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. Seiten: 1647-1690.

**Pantin-Jackwood MJ, Suarez DL, Spackman E, Swayne DE (2007).** Age at infection affects the pathogenicity of Asian highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses in ducks. *Virus Res* 130:151-161.

**Pantin-Jackwood MJ und Swayne DE (2007).** Pathobiology of Asian highly pathogenic avian influenza H5N1 virus infections in ducks. *Avian Dis.* 51:250-259.

**Park SS, Lillehoj HS, Hong YH, Lee SH (2007).** Functional characterization of tumor necrosis factor superfamily 15 (TNFSF15) induced by lipopolysaccharides and *Eimeria* infection. *Dev. Comp Immunol.* 31:934-944.

**Patterson S, Gross J, Oxford JS (1988).** The intracellular distribution of influenza virus matrix protein and nucleoprotein in infected cells and their relationship to haemagglutinin in the plasma membrane. *J. Gen. Virol.* 69:1859-1872.

**Peiris JS, de Jong MD, Guan Y (2007).** Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health. *Clin. Microbiol. Rev.* 20:243-267.

**Perkins LE und Swayne DE (2001).** Pathobiology of A/chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1) avian influenza virus in seven gallinaceous species. *Vet. Pathol.* 38:149-164.

**Perkins LE und Swayne DE (2002).** Pathogenicity of a Hong Kong-origin H5N1 highly pathogenic avian influenza virus for emus, geese, ducks, and pigeons. *Avian Dis.* 46:53-63.

**Perkins LE und Swayne DE (2003).** Varied pathogenicity of a Hong Kong-origin H5N1 avian influenza virus in four passerine species and budgerigars. *Vet. Pathol.* 40:14-24.

**Pinto LH und Lamb RA (2007).** Controlling influenza virus replication by inhibiting its proton channel. *Mol. Biosyst.* 3:18-23.

**Pober JS, Bevilacqua MP, Mendrick DL, Lapierre LA, Fiers W, Gimbrone MA, Jr. (1986).** Two distinct monokines, interleukin 1 and tumor necrosis factor, each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells. *J. Immunol.* 136:1680-1687.

**Pollack CV, Kam CW, Mak YK (1998).** Update: isolation of avian influenza A(H5N1) viruses from human beings--Hong Kong, 1997-1998. *Ann. Emerg. Med.* 31:647-649.

**Rayet B, Fan Y, Gelinas C (2003).** Mutations in the v-Rel transactivation domain indicate altered phosphorylation and identify a subset of NF-kappaB-regulated cell death inhibitors important for v-Rel transforming activity. *Mol. Cell Biol.* 23:1520-1533.

**Reemers SS, Groot Koerkamp MJ, Holstege FC, van EW, Vervelde L (2009).** Cellular host transcriptional responses to influenza A virus in chicken tracheal organ cultures differ from responses in in vivo infected trachea. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 132:91-100.

**Reinacher M und Weiss E (1975).** Electron microscopical study of initial and final stages of fowl plague virus-replication in chick embryo cells. *Arch. Virol.* 49:187-197.

**Ruddle NH (1999).** Lymphoid neo-organogenesis: lymphotoxin's role in inflammation and development. *Immunol. Res.* 19:119-125.

**Saini M, Das DK, Dhara A, Gupta PK (2007).** Recent developments in patents targeting Toll-like receptor genes. *Recent Pat DNA Gene Seq.* 1:227-239.

**Saito T, Watanabe C, Takemae N, Chaisingh A, Uchida Y, Buranathai C, Suzuki H, Okamoto M, Imada T und Andere (2009).** Pathogenicity of highly pathogenic avian influenza viruses of H5N1 subtype isolated in Thailand for different poultry species. *Vet. Microbiol.* 133:65-74.

**Sandusky G, Berg DT, Richardson MA, Myers L, Grinnell BW (2002).** Modulation of thrombomodulin-dependent activation of human protein C through differential expression of endothelial Smads. *J. Biol. Chem.* 277:49815-49819.

**Sarmiento L, Afonso CL, Estevez C, Wasilenko J, Pantin-Jackwood M (2008a).** Differential host gene expression in cells infected with highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 125:291-302.

**Sarmiento L, Pantin-Jackwood M, Kapczynski DR, Swayne DE, Afonso CL (2008b).** Immediate early responses of avian tracheal epithelial cells to infection with highly pathogenic avian influenza virus. *Dev. Biol. (Basel)* 132:175-183.

**Schroer D, Veits J, Grund C, Dauber M, Keil G, Granzow H, Mettenleiter TC, Romer-Oberdorfer A (2009).** Vaccination with Newcastle disease virus vectored vaccine protects chickens against highly pathogenic H7 avian influenza virus. *Avian Dis.* 53:190-197.

**Sekellick MJ, Ferrandino AF, Hopkins DA, Marcus PI (1994).** Chicken interferon gene: cloning, expression, and analysis. *J. Interferon Res.* 14:71-79.

**Shi L, Reid LH, Jones WD, Shippy R, Warrington JA, Baker SC, Collins PJ, de LF, Kawasaki ES und Andere (2006).** The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nat. Biotechnol.* 24:1151-1161.

**Shimizu K, Iguchi A, Gomyou R, Ono Y (1999).** Influenza virus inhibits cleavage of the HSP70 pre-mRNAs at the polyadenylation site. *Virology* 254:213-219.

**Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawaoka Y (2006).** Avian influenza virus receptors in the human airway. *Nature* 440:435-436.

**Shuai K und Liu B (2005).** Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 5:593-605.

**Songserm T, Amonsin A, Jam-on R, Sae-Heng N, Meemak N, Pariyothorn N, Payungporn S, Theamboonlers A, Poovorawan Y (2006).** Avian influenza H5N1 in naturally infected domestic cat. *Emerg. Infect. Dis.* 12:681-683.

**Spackman E, Senne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, Lohman K, Daum LT, Suarez DL (2002).** Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J. Clin. Microbiol.* 40:3256-3260.

**Steinhauer DA (1999).** Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology* 258:1-20.

**Sterz I und Weiss E (1974).** Electron microscopical and virological studies of chicken thrombocytes in vitro infected with fowl plague virus (FPV). *Med. Microbiol. Immunol.* 159:151-160.

**Stieneke-Grober A, Vey M, Angliker H, Shaw E, Thomas G, Roberts C, Klenk HD, Garten W (1992).** Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO J.* 11:2407-2414.

**Stopforth A (1970).** A study of coagulation mechanism in domestic chickens. *J. Comp. Path.* 80: 525-533.

**Sturm-Ramirez KM, Ellis T, Bousfield B, Bissett L, Dyrting K, Rehg JE, Poon L, Guan Y, Peiris M und Andere (2004).** Reemerging H5N1 influenza viruses in Hong Kong in 2002 are highly pathogenic to ducks. *J. Virol.* 78:4892-4901.

**Suzuki K, Okada H, Itoh T, Tada T, Mase M, Nakamura K, Kubo M, Tsukamoto K (2009).** Association of increased pathogenicity of Asian H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses in chickens with highly efficient viral replication accompanied by early destruction of innate immune responses. *J. Virol.* 83:7475-7486.

**Swayne DE (2007).** Understanding the complex pathobiology of high pathogenicity avian influenza viruses in birds. *Avian Dis.* 51:242-249.

**Swayne DE und Pantin-Jackwood M (2008).** Pathobiology of Avian Influenza Virus infection in Birds and Mammals. In: Swayne DE. *Avian Influenza.* Blackwell Publishing, Ames. Seiten: 87-122.

**Swayne DE und Suarez DL (2000).** Highly pathogenic avian influenza. *Rev. Sci. Tech.* 19:463-482.

**Takimoto T, Sato K, Akiba Y, Takahashi K (2008).** Role of chicken TL1A on inflammatory responses and partial characterization of its receptor. *J. Immunol.* 180:8327-8332.

**Tanaka H, Park CH, Ninomiya A, Ozaki H, Takada A, Umemura T, Kida H (2003).** Neurotropism of the 1997 Hong Kong H5N1 influenza virus in mice. *Vet. Microbiol.* 95:1-13.

**Tanimura N, Tsukamoto K, Okamatsu M, Mase M, Imada T, Nakamura K, Kubo M, Yamaguchi S, Irishio W und Andere (2006).** Pathology of fatal highly pathogenic H5N1 avian influenza virus infection in large-billed crows (*Corvus macrorhynchos*) during the 2004 outbreak in Japan. *Vet. Pathol.* 43:500-509.

**Teifke JP, Klopfleisch R, Globig A, Starick E, Hoffmann B, Wolf PU, Beer M, Mettenleiter TC, Harder TC (2007).** Pathology of natural infections by H5N1 highly pathogenic avian influenza virus in mute (*Cygnus olor*) and whooper (*Cygnus cygnus*) swans. *Vet. Pathol.* 44:137-143.

**Terregino C, Milani A, Capua I, Marino AM, Cavaliere N (2006).** Highly pathogenic avian influenza H5N1 subtype in mute swans in Italy. *Vet. Rec.* 158:491.

**Thompson AJ und Locarnini SA (2007).** Toll-like receptors, RIG-I-like RNA helicases and the antiviral innate immune response. *Immunol. Cell Biol.* 85:435-445.

**Thompson KL, Pine PS, Rosenzweig BA, Turpaz Y, Retief J (2007).** Characterization of the effect of sample quality on high density oligonucleotide microarray data using progressively degraded rat liver RNA. *BMC. Biotechnol.* 7:57.

**Vahlenkamp TW, Harder TC, Giese M, Lin F, Teifke JP, Klopfleisch R, Hoffmann R, Tarpey I, Beer M und Andere (2008).** Protection of cats against lethal influenza H5N1 challenge infection. *J. Gen. Virol* 89:968-974.

**Vascellari M, Granato A, Trevisan L, Basilicata L, Toffan A, Milani A, Mutinelli F (2007).** Pathologic findings of highly pathogenic avian influenza virus A/duck/Vietnam/12/05 (H5N1) in experimentally infected pekin ducks, based on immunohistochemistry and in situ hybridization. *Vet. Pathol* 44:635-42.

**Wan H und Perez DR (2006).** Quail carry sialic acid receptors compatible with binding of avian and human influenza viruses. *Virology* 346:278-286.

**Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ (2001).** TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412:346-351.

**Wasilenko JL, Lee CW, Sarmiento L, Spackman E, Kapczynski DR, Suarez DL, Pantin-Jackwood MJ (2008).** NP, PB1, and PB2 viral genes contribute to altered replication of H5N1 avian influenza viruses in chickens. *J. Virol* 82:4544-4553.

**Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y (1992).** Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* 56:152-179.

**WHO : nomenclature, Stand 2009:**

[http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/guidelines/nomenclature/en/](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/nomenclature/en/).

**Xing Z, Cardona CJ, Li J, Dao N, Tran T, Andrada J (2008).** Modulation of the immune responses in chickens by low-pathogenicity avian influenza virus H9N2. *J. Gen. Virol* 89:1288-1299.

**Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, Takeuchi O, Takeda K, Akira S (2003).** TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat. Immunol.* 4:1144-1150.

**Yamamoto Y, Nakamura K, Kitagawa K, Ikenaga N, Yamada M, Mase M, Narita M (2007).** Pathogenesis in call ducks inoculated intranasally with H5N1 highly pathogenic avian influenza virus and transmission by oral inoculation of infective feathers from an infected call duck. *Avian Dis.* 51:744-749.

**Zamarin D, Ortigoza MB, Palese P (2006).** Influenza A virus PB1-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice. *J. Virol.* 80:7976-7983.

**Zhang W, Li H, Cheng G, Hu S, Li Z, Bi D (2008).** Avian influenza virus infection induces differential expression of genes in chicken kidney. *Res Vet. Sci.* 84:374-381.

**Zurcher T, Marion RM, Ortin J (2000).** Protein synthesis shut-off induced by influenza virus infection is independent of PKR activity. *J. Virol* 74:8781-8784.

## 9 Anhang

### 9.1 Abkürzungsverzeichnis

AAMP	„angio-associated migratory cell protein“
Abb.	Abbildung
ABC	„Avidin-Biotin-Complex“
AEC	„3-Amino-9-Ethyl-Carbazol-staining“
AIV	aviäre Influenzaviren
al.	alii
Aqua dest.	Aqua destillata
ATV	Alsevers Trypsin Versen
BALT	„bronchial associated lymphoid tissue“
BSA	bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CCLV	„Collection of Cell Lines in Veterinary Medicine“
CD	„Cluster of differentiation“
CDH5, VE-cadherin	„vascular endothelial (VE) cadherin“
CD51	Vitronectin Rezeptor
CD73, NT5E	5' Nukleotidase
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
cRNA	komplementäre RNA
ct	„threshold cycle“
DEPC	Diäthylpyrokarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EID <sub>50</sub>	Ei-infektiöse Dosis 50
eIF2 $\alpha$	„eukaryotic translation initiation factor 2-alpha“

**Fortsetzung: Abkürzungsverzeichnis**

etc.	et cetera
Flt-1	„fms-related tyrosine kinase 1
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
GALT	„gut associated lymphoid tissue“
GM-CSF	„granulocyte colony-stimulating factor“
GM <sub>x</sub>	Gruppe Mönchsgrasmücken, infiziert mit 10 <sup>x</sup> EID <sub>50</sub>
GO	Gene Ontology
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HPAIV	hochpathogene aviäre Influenzaviren
ID	„inhibitor of DNA binding“
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin gamma
IKBKB, IKK-β	„inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells kinase β“
IKK-α	„inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase α“
IKK-i	„inducible IκB kinase“
IL	Interleukin
IL-1R	IL-1-Rezeptordomäne
inkl.	inklusive
IRAK	IL1-R-assozierte Kinase
IRF 3	interferonregulierender Faktor 3
IκB	„nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor“
JNK	„JUN n-terminal kinase“
JUN, AP-1	„Jun oncogene“
kDa	Kilodalton
KEGG	„Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes“
KID <sub>50</sub>	kulturinfektiöse Dosis

**Fortsetzung: Abkürzungsverzeichnis**

LPAIV	„low pathogenic avian influenza virus“
LPS	Lipopolysaccharid
M	Matrixprotein
MAP3K7, TAK 1	mitogenaktivierte Protein-Kinase-Kinase-Kinase 7
MAP3K7IP	mitogenaktivierte Protein-Kinase-Kinase-Kinase 7 interagierendes Protein
MAPK14, p38	mitogenaktivierte Protein-Kinase 14
MAPKK	mitogenaktivierte Protein-Kinase-Kinase
MDA 5	„melanoma-differentiation-associated gene 5“
MDCK-2	„Madin-Darby canine kidney“- Zellen Typ 2
MDT	Magen-Darm-Trakt
MEM	„minimal essential Medium“
Mo	Monate
MOI	„multiplicity of infection“
mRNA	„messenger-RNA“
MWCO	„Molecular Weight Cut Off“
MYC	myelocytomatosis viral oncogene homolog
MyD88	„myeloid differentiation primary response gene 88“
n. k.	nicht klassifiziert
NA	Neuraminidase
NEAS	nichtessentielle Aminosäuren
NF- $\kappa$ B	„nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1“
NOD	„nucleotide-binding-protein“
NP	Nukleoprotein
NS	Nichtstruktur-Protein
p. i.	post infektionem
PI3K	Phosphoinositid-3-kinase
p38, MAPK14	mitogenaktivierte Protein-Kinase 14
PA	saures Polymerase-Protein
PAMP	„pathogen-associated molecular patterns“

**Fortsetzung: Abkürzungsverzeichnis**

PB	basisches Polymerase-Protein
PBE	plaquebildende Einheiten
PBS	„Phosphate-buffered saline“
PCR	Polymerasekettenreaktion
PECAM	„platelet endothelial cell adhesion molecule“
pH	potentia hydrogenium
PKR	Doppelstrang RNA-abhängige Protein-Kinase
PNS	peripheres Nervensystem
POD	Peroxidase
PRR	„pattern recognition receptor“
REL	reticuloendotheliosis viral oncogene homolog
RGS2	Regulator of G-protein signaling 2
resp.	respiratorisch
RIG-I	„retinoic acid-inducible gene I“
RIN	„RNA integrity number“
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	„reverse transcription-PCR“
SOCS	„suppressor of cytokine signaling“
TAB, MAP3K7IP	„TGF-beta activated kinase 1-binding protein“
Tab.	Tabelle
TAK 1, MAP3K7	TGF- $\beta$ -aktivierte Kinase 1
TBK 1	„TRAF family-member-associated NF $\kappa$ B activator binding kinase 1“
TBS	„Tris-buffered saline“
TC	Zellkulturflasche
TE	TRIS-EDTA
TF	„tissue factor“, Thromboplastin
TFPI	„tissue factor pathway inhibitor“, Thromboplastininhibitor
TGF- $\beta$	Transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$
THBD	Thrombomodulin

**Fortsetzung: Abkürzungsverzeichnis**

TICAM-1, TRIF	„toll-like receptor adaptor molecule 1“
TIR	Toll/IL-1-Rezeptordomäne
TIRAP	TIR-assoziertes Protein
TLR	Toll-like-Rezeptor
TL1A	TNF ligand-related molecule 1A
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNFRSF	Tumor-Nekrose-Faktor-Superfamilie
TNFSF15	Tumor-Nekrose-Faktor-Superfamilie 15
TOLLIP	„toll interacting protein“
TRAF 6, MAP3K7	TNF-Rezeptor-assoziierter Faktor 6
TRAM	„TRIF related adapter molecule“
TRIF, TICAM –1	Toll/IL-1 Rezeptor Domäne
u. a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
UTR	„untranslated regions“, untranslatierter Bereich
Wo	Wochen
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZPE	zytopathogener Effekt

## 9.2 Abbildungen

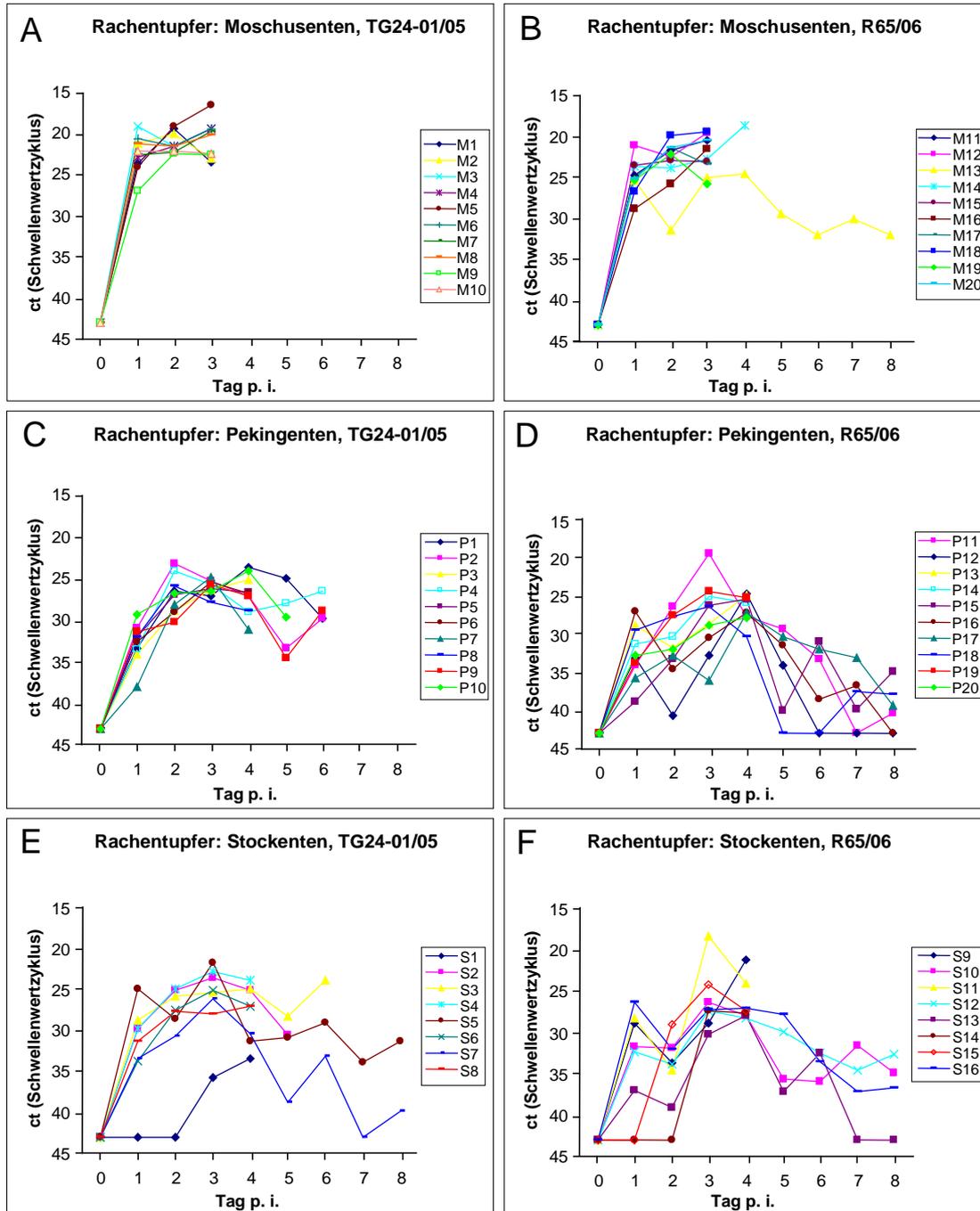


Abb. 31: Nachweis AIV-RNA in Rachentupferproben bei HPAIV-infizierten Entenspezies. Dargestellt sind die Schwellenwertzyklen individueller Rachentupferproben der TG24-01/05 (A, C, E) oder R65/06-infizierten (B, D, F) Moschusenten, Pekingenten und Stockenten.

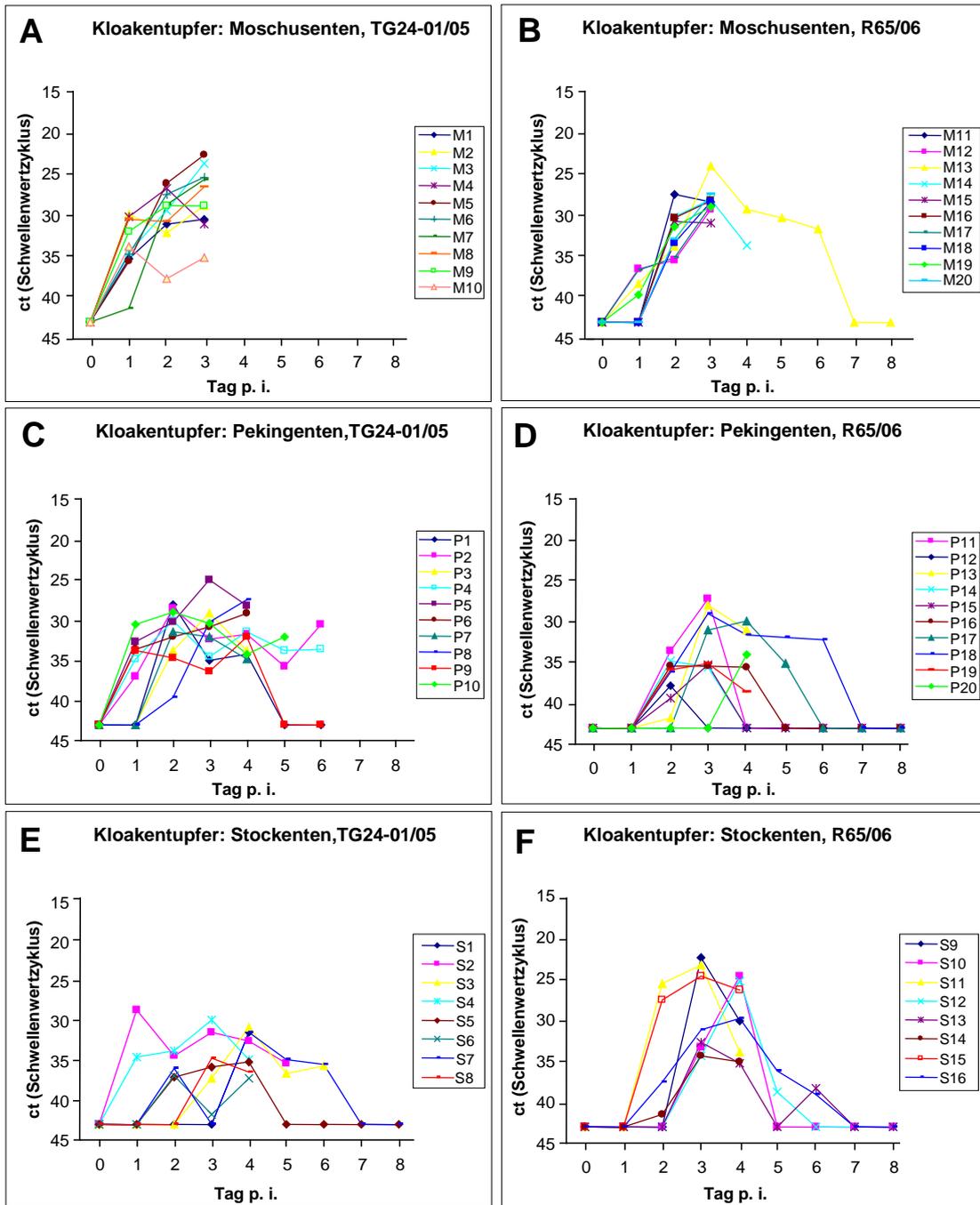


Abb. 32: **Nachweis AIV-RNA in Kloakentupferproben bei HPAIV-infizierten Entenspezies.** Dargestellt sind die Schwellenwertzyklen individueller Kloakentupferproben der TG24-01/05 (A, C, E) oder R65/06-infizierten (B, D, F) Moschusenten, Pekingenten und Stockenten.

## 10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. J. P. Teifke danke ich für die Bereitstellung des Themas, die Möglichkeit die Versuche in seinem Labor im Friedrich-Loeffler-Institut durchführen zu können und die Betreuung der Arbeit. Seine Engagement und die fachliche Unterstützung haben maßgeblich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen.

Frau G. Busch und Frau S. Schuparis danke ich für die fleißige und sorgfältige Anfertigung unzähliger Gewebeschnitte. Ihnen und Frau Chem.-Ing. (FH). G. Czerwinski danke ich herzlich für die angenehme Atmosphäre und immerwährende Bereitschaft mir bei meinen Fragen zu helfen.

Herrn Dr. C. Koczan, Herrn Dr. A. Karger und Herrn M. Hecker danke ich für die Unterstützung und stetige Diskussionsbereitschaft im Zusammenhang mit der Microarrayanalyse.

Herrn Prof. Dr. E. Burkhardt, Frau Dr. J. Veits, Herrn Dr. D. Koczan, Herrn Dr. G. Keil und Mirko Fleischer danke ich sehr für die kritische Durchsicht und Korrektur meines Manuskriptes.

Frau Dr. D. Kalthoff und Frau Mareen Grawe danke ich für die fachliche und freundschaftliche Unterstützung bei der Einführung in die Methoden der Tierversuchsdurchführung. Ihnen und Herrn PD Dr. Beer danke ich für die Unterstützung bei den Publikationen.

Herrn Dr. Riebe und Herrn Dipl.-Biol. M. Lenk danke ich für ihre Hilfe und Beratung im Zusammenhang mit der Zellkultur.

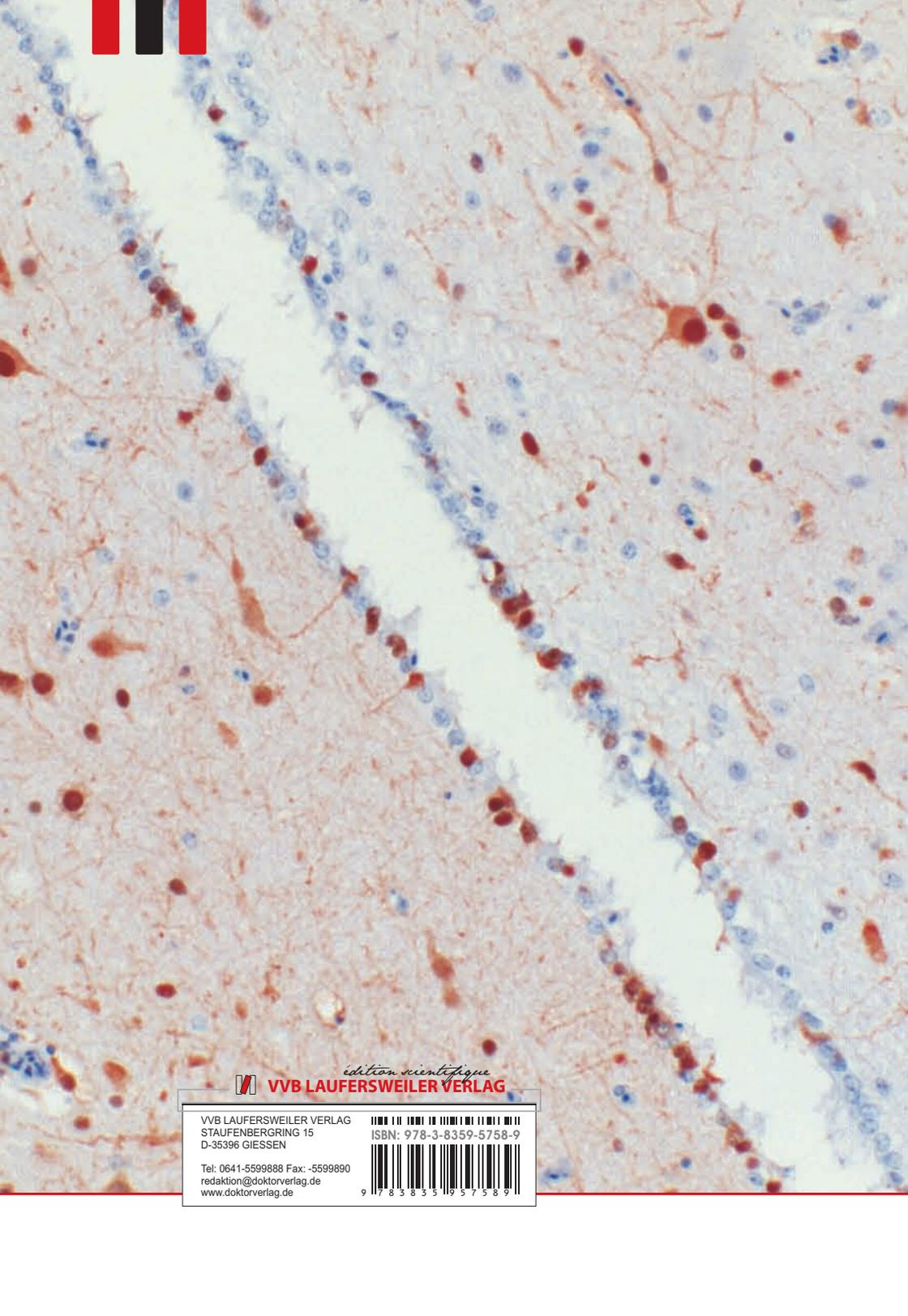
Ich danke Frau Dr. J. Veits, Frau Dr. D. Kalthoff, Frau Dr. S. Härtle und Herrn PD Dr. Dr. T. Vahlenkamp für die Bereitstellung zahlreicher Versuchstiere.

Besonderer Dank gilt Beate, Petra, Peter und Ute für Ihre Unterstützung während meines gesamten Werdeganges.

Meinen Freunden Sandra, Jana und Michael danke ich für eine schöne Zeit fernab der Heimat.

Claudia, Marie und Catharina möchte ich für eine wunderschöne Zeit in Gießen danken. Wir haben viel zusammen durchgestanden und noch viel mehr Schönes zusammen erlebt.

Mirko danke ich für die Geduld und Unterstützung in dieser nicht immer unkomplizierten Zeit. Dankbarkeit ist ein zu schwaches Wort.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6758-9



9 783835 967589