

**Die Proteinkinase R abhängige Virulenz des Influenza A Virus wird durch zwei  
Aminosäurestellen (R35 und R46) im NS1-Protein beeinflusst**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Julia Bespalowa

aus Omsk (Russland)

Gießen 2022

Aus dem Zentrum für Innere Medizin  
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH  
Standort Gießen  
Direktor: Prof. Dr. Werner Seeger

Gutachter: Frau Prof. Dr. med. S. Herold, PhD

Gutachter: Prof. Dr. Michael Niepmann

Tag der Disputation: 11.07.2023

## Widmung

Ich möchte diese Arbeit meinem Sohn Elias widmen.

Als ich anfang Humanmedizin zu studieren, bist Du eingeschult worden, es war für beide von uns eine wunderbar aufregende Zeit mit viel Verantwortung. Oft musste ich von den Praktika oder den Vorlesungen zur Grundschule rennen, um Dich pünktlich abzuholen. Zuhause saßen wir manchmal gemeinsam im Wohnzimmer und haben gelernt. Du warst mit mir aufgeregt vor den Prüfungen und hast Dich mit mir gefreut, wenn sie bestanden waren. Als ich mit den Experimenten für die Doktorarbeit begann, musstest Du oft auf mich verzichten, und ich weiß, dass es nicht immer einfach war.

Elias, ich danke Dir für die Geduld, wenn ich mal wieder länger im Labor beschäftigt war.

Vielen Dank für die Kraft und Motivation, die Du mir geschenkt hast!

Du bist großartig und Du kannst alles schaffen!

In Liebe,

Deine Mama

**Inhaltsverzeichnis**

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>- 1 -</b>
1.1 Mikroanatomie der Lunge.....	- 1 -
1.2 Das Influenza Virus.....	- 3 -
1.3 Influenza-Pneumonie und ARDS.....	- 8 -
1.4 Pulmonale Immunantwort nach Influenza Virus Infektion.....	- 10 -
1.5 Das Influenza A Nichtstrukturprotein 1 (NS1).....	- 13 -
1.6 Proteinkinase R (PKR).....	- 15 -
1.7 Interaktion zwischen NS1 und Proteinkinase R (PKR).....	- 17 -
2. Zielsetzung.....	- 19 -
3. Material und Methoden.....	- 20 -
3.1 Verwendung von humanem Material.....	- 20 -
3.2 Versuchstiere.....	- 20 -
3.3 Virusstämme.....	- 20 -
3.4 Zellkulturmedien und Puffer.....	- 21 -
3.5 Gewinnung von primären Zellen.....	- 22 -
3.5.1 Isolation und Kultur von primären murinen Typ II AECs.....	- 22 -
3.5.2 Isolation von primären murinen Makrophagen.....	- 23 -
3.5.3 Isolation von primären humanen Typ II AECs.....	- 24 -
3.6 Herstellung eines Virusstocks.....	- 25 -
3.7 Titration des Virusstocks.....	- 25 -
3.8 In vitro Experimente.....	- 26 -
3.9 In vivo Experimente.....	- 26 -

3.9.1 Narkose.....	- 26 -
3.9.2 Orotracheale Infektion.....	- 27 -
3.9.3 Intravenöse Instillation von FITC-Albumin und arterielle und venöse Blutentnahme zur Bestimmung des pulmonalen Barrierschadens .....	- 28 -
3.9.4 Bronchoalveoläre Lavage (BAL) .....	- 28 -
3.9.5 Entnahme und Aufbereitung der Lunge .....	- 29 -
3.10 Bestimmung weiterer Parameter bei Tierexperimenten und Aufarbeitung der gewonnenen Materialien.....	- 30 -
3.10.1 Bestimmung der alveolären Schrankenstörung (alveoläre Leakage).....	- 30 -
3.10.2 Bestimmung der pulmonalen Virustiter .....	- 31 -
3.10.3 Erstellung von Immunfluoreszenzbildern aus Kryo-Lungenschnitten.....	- 31 -
3.10.4 Erstellung von histologischen Bildern aus Paraffin-Lungenschnitten .....	- 32 -
3.11 Analyse der Genexpression .....	- 33 -
3.11.1 RNA Isolation .....	- 33 -
3.11.2 cDNA Synthese .....	- 33 -
3.11.3 Real time PCR.....	- 34 -
3.12 Analyse der Proteinexpression .....	- 35 -
3.12.1 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) .....	- 35 -
3.12.2 Bestimmung des Totalproteins (Bradford Assay).....	- 35 -
3.12.3 SDS-PAGE und Western Blot.....	- 35 -
3.13 Statistik.....	- 37 -
4. Ergebnisse .....	- 38 -
4.1 Die Mutationen NS1(R35A) und NS1(R46A) führen zu erhöhter Morbidität und Mortalität in PKR-defizienten Mäusen.....	- 38 -
4.2 Viruslast und PKR abhängige Unterschiede der IFN- $\beta$ Spiegel nach Infektion .....	- 42 -
4.3 Rolle der NS1-Mutanten auf die Rekrutierung von Leukozyten .....	- 46 -

4.4 Histopathologie der Lunge im Verlauf der IV-Infektion und klinische Parameter zeigen vermehrten Lungenschaden in PKR <sup>-/-</sup> -Mäusen nach Infektion mit PR8 NS1(R35A) und PR8 NS1(R46A) im Vergleich zu WT-Mäusen.....	50 -
5. Diskussion.....	54 -
5.1 PKR abhängige Mutanten PR/8 NS1(R35A) und PR/8 NS1(R46A).....	55 -
5.2 Nicht PKR abhängige Mutanten PR/8 NS1(R38A) und PR/8 NS1(K41A).....	57 -
5.3 Potentielle Therapieansätze für IV-Pneumonie.....	58 -
6. Zusammenfassung.....	60 -
7. Summary .....	62 -
Literaturverzeichnis.....	63 -
<i>Danksagung</i> .....	76 -
Erklärung zur Dissertation .....	77 -

**Abbildungsverzeichnis**

ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ZELLPOPULATIONEN EINES ALVEOLUS ..... - 2 -

ABBILDUNG 2: DAS INFLUENZA A VIRUS ..... - 6 -

ABBILDUNG 3: RADIOLOGISCHER BEFUND BEI H1N1-INDUZIERTEM ARDS ..... - 10 -

ABBILDUNG 4: SCHEMATISCHE STRUKTUR DES INFLUENZA A VIRUS NS1 PROTEINS.... - 13 -

ABBILDUNG 5: NS1 UND SEINE ANGRIFFSPUNKTE IN DER ZELLE..... - 14 -

ABBILDUNG 6: DIE ROLLE VON PKR BEI DER INTERFERON PRODUKTION ..... - 16 -

ABBILDUNG 7: ÜBERLEBEN, KÖRPERGEWICHT UND MORBIDITÄTSSCORE *IN VIVO*..... - 40 -

ABBILDUNG 8: BESTIMMUNG DER VIRUSLAST ..... - 43 -

ABBILDUNG 9: INTERFERON-B SPIEGEL IN BAL ÜBERSTÄNDEN ..... - 45 -

ABBILDUNG 10: ZELLINFILTRATION NACH INFEKTION ..... - 47 -

ABBILDUNG 11: DIFFERENTIALZyTOLOGIE VON BAL AM 5. TAG NACH INFEKTION..... - 50 -

ABBILDUNG 12: PARAFFIN LUNGENSCHNITTE AN VERSCHIEDEN ZEITPUNKTEN NACH INFEKTION..... - 51 -

ABBILDUNG 13: LUNGENSCHADEN ANHAND VON HISTOLOGISCHEN AUFNAHMEN..... - 52 -

ABBILDUNG 14: BESTIMMUNG DER ALVEOLÄREN SCHRANKENSTÖRUNG..... - 53 -

ABBILDUNG 15: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER PKR-ABHÄNGIGEN AMINOSÄURENSTELLEN IM NS1-PROTEIN UND DEREN AUSWIRKUNGEN NACH DER INFEKTION..... - 61 -

**Abkürzungsverzeichnis**

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
AEC	Alveolarepithelzelle
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
ALI	Acute Lung Injury
AMΦ	Alveolarmakrophage
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
AU	Arbitrary Units
BAL(F)	Bronchoalveoläre Lavage (Flüssigkeit)
BASC	bronchioalveolar stem cell
BSA	Bovines Serumalbumin
CCL	CC Chemokin Ligand
CCR	CC Chemokin Rezeptor
CD	Cluster of differentiation
cDCs	konventionelle Dendritische Zellen
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
d	Tag
DAMPs	Damage Associated Molecular Pattern molecules
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid Triphosphat
dpi	Tage nach Infektion (days post infection)
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ExMac	Exsudatmakrophagen
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FRET	Förster resonance energy transfer

GM-CSF	Granulocyte makrophage colony-stimulating factor
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
hAEC	humane Alveolarepithelzellen
HBSS	Hanks balanced salt solution
HPAIV	hochpathogenes aviäres Influenzavirus
HRP	Meerrettichperoxidase
IFN	Interferon
IFNAR	Typ I Interferonrezeptor
IgG	Immunglobulin G
IKK	Inhibitor von $\kappa$ B Kinase
IL	Interleukin
ip	intraperitoneal
IRF3	Interferon regulierender Faktor 3
it	intratracheal
IV	Influenzavirus
iv	intravenös
LH	Lungenhomogenat
LPS	Lipopolysaccharid
LYM	Lymphozyten
M1/2	Matrixprotein 1/2
mAB	monoklonaler Antikörper
Mac	Makrophagen
MACS	Magnetic assisted cell sorting
mAEC	murine Alveolarepithelzellen
mAM $\Phi$	murine Alveolarmakrophagen
MAVS	Mitochondrial antiviral-signaling protein
MDA5	Melanoma differentiation antigen 5
MDCK	Madin Darby Canine Kidney Zellen
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minuten
Mio	Millionen
ml	Milliliter
mLN	mediastinaler Lymphknoten

MOI	multiplicity of infection
mRNA	Messenger RNA
NA	Neuraminidase
na	nicht analysiert
NAI	Neuraminidase Inhibitor
NF- $\kappa$ B	nukleäre Faktor- $\kappa$ B
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NP	Nukleoprotein
ns	nicht signifikant
NS1/2	Non-structural Protein 1/2
PA	Polymerase A
pAB	polyklonaler Antikörper
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern molecules
PB1/2	Polymerase B1/2
PB1-F2	Polymerase B1-F2
PB-Mo	periphere Blutmonozyten
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pDC	plasmazytoide dendritische Zellen
PE	Phycoerythrin
PE-Cy5.5	Phycoerythrin-Cyanin 5.5
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cyanin 7
PerCP	Peridinin-chlorophyll-protein complex
pfu	Plaque formende Einheit
pi	nach Infektion (post infection)
PMN	polymorphkernige Neutrophile Granulozyten
PR/8	A/PR/8/34
PRR	Pattern Recognition Receptor
qPCR	quantitative PCR
rAM	residenter Alveolarmakrophage
RBD	RNA bindende Domäne
RIG-I	Retinoic acid inducible gene I
RKI	Robert-Koch-Institut

RLH	RIG-like helicase
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Endoribonuklease
rpm	Runden pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Kulturmedium
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SP-A/B/C/D	Surfactant Protein A/B/C/D
SSC	side scatter
shRNA	small hairpin RNA
STAT 1/2	Signal Transducer und Aktivator der Transkription 1/2
STIKO	Ständige Impfkommission
TLR	Toll like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand
UV	ultraviolett
WHO	Weltgesundheitsorganisation
wt	Wildtyp

## 1. Einleitung

### 1.1 Mikroanatomie der Lunge

Die Lunge, als luftleitendes und gasaustauschendes Organ, besteht vor allem aus den Verzweigungen der Bronchialbaums, den Bronchialarterien und Venen sowie den Alveolen. Von der Trachea ausgehend teilen sich zunächst die konduktiven Abschnitte bestehend aus den Segmentbronchien, Bronchien, Bronchiolen und den terminalen Bronchiolen, welche nur noch einen Durchmesser von etwa 0,4 mm aufweisen. Daran schließen sich die respiratorischen Abschnitte an, diese bestehen aus den Bronchioli respiratorii, den Ductus alveolares und den Sacculi alveolares. Insgesamt sind 23 dichotome Teilungsmuster vertreten von denen 15 an der Luftleitung und 8 am Gasaustausch beteiligt sind. Die Trachea und die Bronchien sind mit Zilien-besetzten Flimmerepithel und sekretorischen Becherzellen ausgekleidet, die für eine mukoziliäre Reinigung von Fremdkörpern und Erregern verantwortlich sind. Die Bronchioli besitzen ein einreihiges zylindrisches Flimmerepithel mit weniger Becherzellen als in den Bronchien. Distaler sind die terminalen Bronchiolen von kubischem Epithel ausgekleidet, es kommen zilienfreie Club-Zellen vor, Becherzellen fehlen (1). Die Alveole als distale Einheit der Lunge bildet gemeinsam mit dem Endothel der Blutkapillaren und einer gemeinsamen Basalmembran die Blut-Luft-Schranke. Das Alveolarepithel besteht aus flachen Alveolarepithelzellen vom Typ I (AECI) und den kubischen Alveolarepithelzellen vom Typ II (AECII). Durch die flache Form der AEC Typ I, welche 95% der Alveolen auskleiden, kann der Gasaustausch stattfinden. AEC II besitzen Mikrovilli und sind für die Produktion und Sekretion von Surfactant (surface-active agent) zuständig. Surfactant ist ein amphiphiles Lipid-Protein-Gemisch, es wird in den Lamellenkörpern der AEC II gespeichert und kontinuierlich in den Alveolarraum sekretiert (2). Es besteht zu 90% aus Phospholipiden (vorwiegend Lecithin) und zu 10% aus Surfactant-assoziierten Proteinen (3). Surfactant dient der Herabsetzung der Oberflächenspannung der Wasser/Luft-Grenze in den Alveolen, es ermöglicht eine gleichmäßige Entfaltung der Alveolen während der Inspiration und verhindert, dass sie während der Expiration kollabieren (3). Darüber hinaus geht aus den AEC II der Ersatz von AEC I hervor, z.B. nach Entzündungsprozessen mit Barrierschaden (1) (4).

Mit einer Gesamtfläche von etwa 200 m<sup>2</sup> ist die Lunge als Organ prädisponiert für Infektionen, denn sie bietet eine enorme Kontaktfläche zur Umwelt und der darin befindlichen Noxen. Deshalb ist ein umfangreiches und funktionierendes Abwehrsystem von größter Bedeutung.

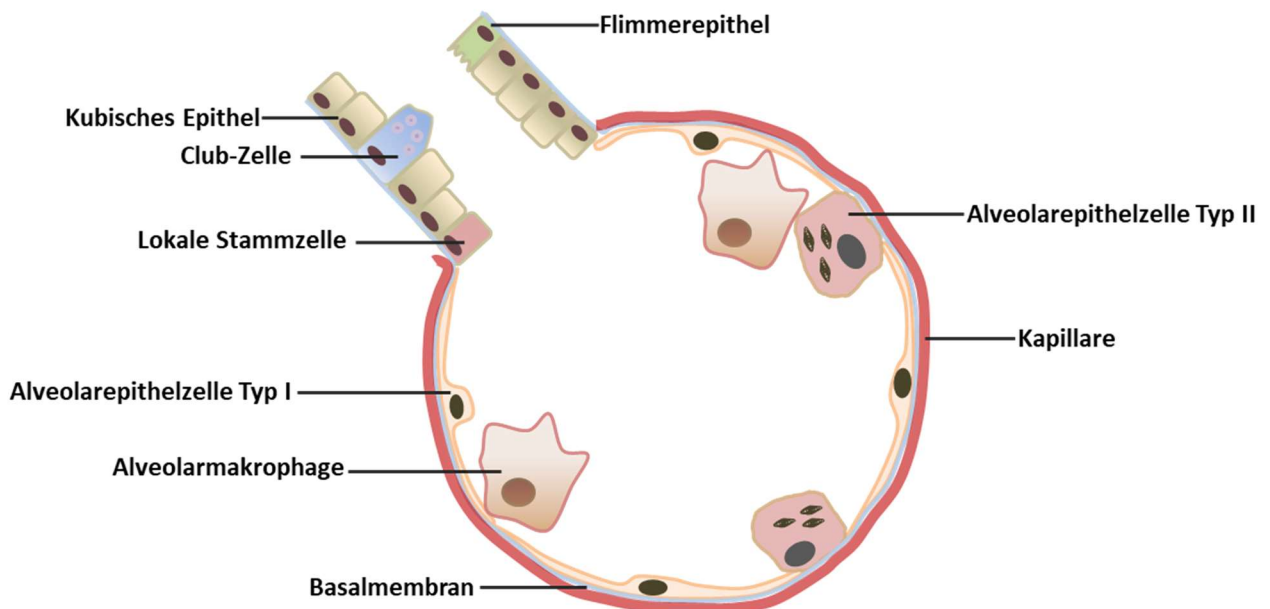


ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ZELLPOPULATIONEN EINES ALVEOLUS

Die Bronchiolen sind von kubischen Epithelzellen und sekretorischen Club-Zellen ausgekleidet. In den distal liegenden Alveolen befinden sich Alveolarepithelzellen (AEC) Typ I und II. AEC I bilden zusammen mit Endothelzellen und einer gemeinsamen Basalmembran die Blut-Luft-Schranke und ermöglichen den Gasaustausch. AEC II besitzen sowohl metabolische als auch regenerative Funktionen. Residenten Alveolarmakrophagen (rAM) sind als Vertreter des angeborenen Immunsystems in den Alveolen vorhanden.

Modifiziert nach (1) und (5).

Die Immunabwehr von Erregern/Pathogenen funktioniert einerseits durch die mechanische mukoziliäre Reinigung durch das Flimmerepithel und andererseits durch das angeborene und erworbene Immunsystem. Viele Immunzellen sind an der Bekämpfung der Erreger beteiligt, residente Alveolarmakrophagen (rAM) in den Alveolen, rekrutierte Monozyten und Granulozyten aus der Blutbahn, dendritische Zellen im Lungenparenchym sowie T- und B-Lymphozyten aus lymphatischen Organen (6) (7) (8) (9). Epithelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten sind maßgeblich an der Initiierung von Immunkaskaden beteiligt; als Beispiel sind AEC II zu nennen, sie

kommunizieren mit rAM und rekrutierten Zellen und verbessern damit die Opsonierung von Krankheitserregern (2) (10) (11). Eine suffiziente Immunabwehr ist von außerordentlicher Wichtigkeit, weil durch die Nähe zum Blutkreislauf eine systemische Infektion in Form einer Sepsis und als Komplikation ein Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) sich entwickeln kann (12).

### 1.2 Das Influenza Virus

#### **Klassifizierung**

Das Influenza Virus gehört zu der Familie der Orthomyxoviridae, es ist behüllt und besitzt negativ orientierte Einzelstrang-RNA, welche in 8 Segmenten organisiert ist. Influenza kommt in den Gattungen A, B und C vor, wobei A und B vordergründig für die Virusgrippe beim Menschen verantwortlich sind. Weiterhin werden Influenza Viren in Subtypen unterteilt, die sich auf die Oberflächenmoleküle Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) beziehen (13). Die Subtypen werden numerisch fortgeführt nach Zeitpunkt der Entdeckung. Es gibt für Influenza A Viren mittlerweile 18 HA (H1-H18) und 11 NA (N1-N11) Subtypen (14). Hochgradig humanpathogene Subtypen sind vor allem H1N1, H3N2, H5N1 und H7N9, von denen H1N1 und H3N2 während saisonaler Epidemien zirkulieren (15). Gemäß WHO-Richtlinien gibt es für Influenza Viren eine eindeutige Nomenklatur, bestehend aus dem Genus, der Herkunft des Isolats, der Isolationsnummer, dem Jahr in dem isoliert wurde und dem Subtyp, z.B. A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1).

#### **Struktur und Genomaufbau**

Influenza Viren besitzen eine Hülle und können sowohl kugelige als auch polymorphe Formen aufweisen. Das virale Genom besteht aus 8 Segmenten und kodiert insgesamt für 16 Proteine: Hämagglutinin (HA), Neuraminidase (NA), Nukleoprotein (NP), Matrixproteine 1 (M1), 2 (M2), 3 (M3) sowie Matrix mRNA3, nicht-Strukturproteine 1 (NS1), 2 (NS2) und 3 (NS3), Polymerase A (PA), Polymerase A-X (PA-X), Polymeraseprotein B1 (PB1), Polymeraseprotein B1-F2 (PB1-F2), Polypeptid PB1-N40 und Polymeraseprotein B2 (PB2). Die segmentierte RNA liegt mit dem NP-Protein und dem aus PA, PB1 und PB2 bestehenden Polymerasekomplex assoziiert vor. Jedes Segment besitzt an beiden Enden Nicht-kodierende-Regionen (NCRs), die als

Erkennungsflächen für die virale Polymerase fungieren. Diese NCRs sind zum Teil komplementär zueinander und können dadurch eine sogenannte pan handle Form einnehmen, welche die Promoter-Polymerase-Interaktion stabilisiert (16) (17) (18).

### **Vermehrungszyklus**

Das Influenza A Virus ist für die Replikation auf die Proteinbiosynthese der Wirtszelle angewiesen. Mit dem Trimer (HA) bindet das Virus an die Glykokalyx der Wirtszelle (Adsorption). Influenza Viren aviären oder menschlichen Ursprungs besitzen unterschiedliche Zelltropismen. Das aviäre Influenza A Virus HA hat eine hohe Affinität zu alpha-2,3-verknüpften Sialinsäuren die besonders auf den Darmschleimhautzellen von Vögeln vorkommt. Influenza A Viren humanen Ursprungs binden vorrangig an alpha-2,6-verknüpften Sialinsäuren, welche im Epithel des oberen humanen Respirationstrakts vorhanden ist (19). Nach dem Binden an die Zelloberfläche der Zielzelle wird das Virus durch rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen. Durch niedrigen pH im Endosom kommt es zu Konformationsänderungen am HA, wodurch die Fusion mit der endosomalen Vesikelmembran begünstigt wird (20). Gleichzeitig pumpen M2 Ionenkanäle H<sup>+</sup>-Protonen in das Virion. Durch die Ansäuerung lösen sich die viralen Ribonukleoproteine (vRNP) von den M1 Proteinen und gelangen durch Fusionsporen ins Zytoplasma (Uncoating) (21). Der Transport in den Zellkern erfolgt durch das Kernlokalisierungssignal (nuclear localization signal, NLS) des Nucleoproteins (NP). Die Replikation findet im Zellkern statt, durchgeführt wird sie durch die RNA-abhängige RNA-Polymerase. Die Transkription von viraler RNA (vRNA) in mRNA wird durch das Binden von zellulärer 5'-Kappen Struktur an das 3'-Ende der vRNA initiiert. Die 5'-Kappe ist Bestandteil zelleigener mRNA und wird durch die virale Polymerase A gespalten, dieser Vorgang wird als "cap-snatching" bezeichnet. Die PB1-Untereinheit des Polymerasekomplexes besitzt Polymeraseaktivität und ist damit verantwortlich für die Kettenverlängerung (18) (21). Ein weiterer Effekt des "cap-snatching" ist das so genannte Virus-host-shutoff, bei dem die zelleigene Transkription und Translation erheblich inhibiert oder komplett eingestellt wird und darüber hinaus eine Umprogrammierung auf die Produktion viraler Proteine stattfindet (22) (23). Durch alternatives Spleißen der Transkripte von Segment 7 und 8 entstehen neben den mRNAs, die für M1 bzw. NS1 kodieren, verkürzte mRNAs, von welchen M2, M4, mRNA3 bzw. NS3 und Nuclear export protein (NEP) translatiert werden. Die

Transkription endet mit der Polyadenylierung, bei der ein Poly-A-Schwanz an das uridinreiche 5'-Ende der viralen mRNA angehängt wird (18).

Im Anschluss an die Transkription wird die virale mRNA aus dem Zellkern ausgeschleust und die Translation im Zytoplasma eingeleitet. Freie Ribosomen translatieren mRNA für die Nichtstrukturproteine NS1, NS2, NS3 und NEP, die Strukturproteine HA, NA und M2 werden an den Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums (ER) translatiert. Die Oberflächenproteine werden vom ER über den Golgi-Apparat an die Zellmembran transportiert. Während des Transports im Golgi-Apparat lagern sie sich zu trimeren (HA) und tetrameren (NA) Komplexen zusammen und unterlaufen posttranslationalen Modifizierungen (z. B. Glykosylierung) (24). Nichtstrukturproteine gelangen nach der Translation wieder in den Zellkern da sie die NLS besitzen. In der frühen Phase der Infektion wird (-)vRNA vor allem in (+)mRNA mit 5'-Kappe und 3'-Poly-A-Schwanz transkribiert. Sobald jedoch der NP und NEP Spiegel im Zellkern steigt, wird die Transkription auf (+)cRNA umgestellt, die besitzt keine 5'-Kappe und keinen 3'-Poly-A-Schwanz, stattdessen eine freie 3'-Triphosphat-Stelle, welche als Matrize für neue (-)vRNA fungiert (24). Die neu synthetisierte vRNA komplexiert mit NP und bindet die Untereinheiten des Polymerase-Komplexes PB1, PB2 und PA, somit entstehen vRNP, welche anschließend an M1 und NEP binden und aus dem Nukleus ausgeschleust werden. Die acht unterschiedlichen vRNP-Segmente werden anschließend von der neuen Virion-Knospe umschlossen, die sich daraufhin aus der Zellmembran abschnüren kann (Budding). Die Lösung des fertigen Virus von der Zellmembran der Wirtszelle erfolgt durch die Neuraminidase (NA), in dem sie die endständigen Sialinsäurereste der Zellmembran und der viralen Membran enzymatisch spaltet. Darüber hinaus verhindert sie das Verklumpen der Viren miteinander (21) (25). Freigesetzte Viren können daraufhin Nachbarzellen infizieren.

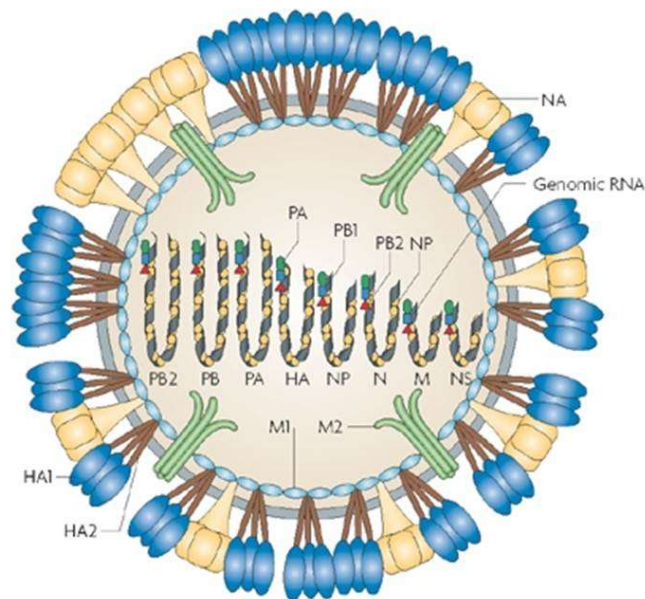


ABBILDUNG 2: DAS INFLUENZA A VIRUS

Das behüllte Influenza A Virus besitzt negativ orientierte Einzelstrang-RNA, welche in 8 Segmenten organisiert ist. Das Genom kodiert für sechzehn verschiedene Proteine: Hämagglutinin (HA), Neuraminidase (NA), Nukleoprotein (NP), Matrix Protein 1 (M1) und 2 (M2), Non Structural Protein 1 (NS1) und 2 (NS2), Polymerase A (PA), Protein PA-X (PA-X), Polymeraseprotein B1 (PB1), Polymeraseprotein B1-F2 (PB1-F2), Polypeptid PB1-N40 und Polymeraseprotein B2 (PB2). Die Gensegmente liegen mit NP, PA, PB1 und PB2 assoziiert vor und werden zusammen als Ribonukleoprotein (RNP) bezeichnet. Die Proteine HA und NA, sowie der Ionentransporter M2 sind in die Lipidhülle eingelagert. Das Protein M1 ist an der Innenseite der Lipidmembran angelagert.

Abbildung aus Karlsson Hedestam et al., The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus

### Pathogenes Potential

Influenza A Viren zeichnen sich durch große Unterschiede in ihren antigenen Eigenschaften aus, die auf einer besonders hohen Mutationsfrequenz und auf Genom-Neugruppierungen zurückzuführen ist. Eine hohe Rate an Replikationsfehlern ist durch die Ungenauigkeit der viralen Polymerase zu erklären, welche eine 10.000-fach höhere Fehlerrate im Vergleich zur humanen Polymerase aufweist. Dadurch können molekulare Veränderungen auf den Oberflächenmolekülen HA und NA entstehen (Antigen-Drift) und somit die Affinität zu Wirtszellen steigern oder sogar den Zelltropismus erweitern (17) (26) (27). Darüber hinaus können aviäre, porcine und humane Influenza Viren in einem sogenannten "mixing vessel", z.B. einem Schwein oder einem anderen Säugetier, Gensegmente untereinander austauschen (Antigen-Shift) und damit neue Reassortanten bilden (28). Die Bildung von Reassortanten wird durch die segmentale Struktur des viralen Genoms maßgeblich unterstützt. Jährliche

Epidemien durch saisonale Influenza A Viren in den Wintermonaten werden durch Veränderungen der HA und NA Moleküle verursacht, die durch Punktmutationen während der Replikation entstehen. Pandemien entstehen durch die Reassortierung von Gensegmenten aus Influenza A Viren unterschiedlicher Spezies z.B. H3N2, dabei entstehen neue Virusvarianten (30). Allein im 20. Jahrhundert wurden vier große Pandemien dokumentiert. Im Jahr 1918/1919 forderte die Spanische Grippe (H1N1) etwa 50 Mio. Todesopfer, 1957/1958 die asiatische Grippe (H2N2), welche nachweislich aviären Ursprungs war, 1968/1969 die Hong Kong Grippe (H3N2) und 1977 die russische Grippe, wobei hier der Subtyp auf die Spanische Grippe zurückzuführen ist (31). Die zuletzt verzeichnete Influenza Pandemie fand 2009/2010 statt. Der pandemische Influenza A Subtyp pH1N1 hatte sich in der Weltbevölkerung ausgebreitet, allein in den USA erkrankten 50 Mio. Personen (Berechnungen des "Center for Disease Control and Prevention") von denen 200.000 stationär behandelt werden mussten, wobei 10.000 Menschen daran verstarben. Ungewöhnlicherweise war das Alter der Erkrankten zu 86% unter 65 Jahren. Das spiegelte sich auch in Deutschland wider, letale Verläufe waren auch bei Kleinkindern sowie bei jungen Erwachsenen unter 29 Jahren zu beobachten (32) (33).

Durch genetische Vielfalt ist nicht nur die Anpassung an den Wirt möglich, sondern auch die Bildung von Resistenzen gegenüber Arzneimitteln. Alle momentan zirkulierenden pandemischen IAV sind gegen Amantadin und Rimantadin (M2 Ionenkanalblocker) resistent ([www.who.int](http://www.who.int)). Derzeit werden Neuraminidase-Inhibitoren (NAI) wie Oseltamivir (Tamiflu®) in der Therapie der Influenza Infektion eingesetzt, diese sind jedoch nur in der frühen Phase der Infektion erfolgreich (29) (34). Darüber hinaus werden mittlerweile ebenfalls Resistenzen gegenüber NAI beschrieben (35). Seit Januar 2021 ist Baloxavir (Xofluza®) in der EU als Therapie zugelassen. Baloxavir greift ebenfalls in der Frühphase der Infektion ein, in dem es die Cap-abhängige Endonuklease PA hemmt und somit die Transkription von vRNA in mRNA verhindert (36).

### 1.3 Influenza-Pneumonie und ARDS

Influenza A Virus Infektionen, auch "Grippe" genannt, betreffen den oberen und den unteren Respirationstrakt. Die Ansteckung erfolgt durch Tröpfchen- oder Schmierinfektionen. Zielzellen des IAV sind, im oberen Respirationstrakt, die Schleimhautepithelzellen im Bereich der Nasopharynx, und im unteren Respirationstrakt, die bronchialen und alveolären Epithelzellen. Nach einer Inkubationszeit von 1 bis 4 Tagen treten klinische Symptome auf. Charakteristisch ist das plötzliche Auftreten von hohem Fieber, Schüttelfrost, Halsschmerzen, Kopf- und Gliederschmerzen mit subjektiv starkem Krankheitsgefühl. Die Krankheitsdauer beträgt 5-7 Tage wobei eine vollständige Genesung unter Umständen mehrere Wochen dauern kann. In manchen Fällen, besonders bei Kindern, älteren Menschen und immungeschwächten Patienten kann es zu pulmonalen Komplikationen in Form einer Influenza-Pneumonie kommen die beim komplizierten Verlauf zum akuten Lungenversagen (Acute Respiratory Distress Syndrom, kurz ARDS) führen kann. Besonders bei pandemischen Influenza A Viren können komplizierte Krankheitsverläufe mit stationären Aufenthalten in der Klinik bzw. mit der Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Behandlung entstehen (29) (37).

Die Influenza-Pneumonie ist für ihre schnelle Progression bekannt, klinische Symptome sind Fieber, Dyspnoe und subjektives Krankheitsgefühl. In der Röntgenaufnahme des Thorax zeigt sich ein bilaterales Infiltrat (Schmetterlingsinfiltrat) (Abb. 3). Als Komplikation kann ein akut progressives Lungenversagen (ARDS) entstehen. Die Mortalitätsrate des ARDS liegt bei 40 bis 58 Prozent. In der 2012 veröffentlichten Berlin-Definition für ARDS wurde die Kriterien wie folgt festgelegt: Akut einsetzender Krankheitsbeginn, bilaterale nicht kardiogen bedingte Lungeninfiltrate und eine beeinträchtigte Oxygenierung. Das ARDS kann anhand der Berechnung des Horovitz-Quotienten aus arteriellem Sauerstoffpartialdruck und inspiratorischer Sauerstofffraktion ( $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ) weiter unterteilt werden.

Horovitz-Quotient ( $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ):

201-300 mmHg bei  $\text{PEEP} \geq 5$  cmH<sub>2</sub>O (mildes ARDS)

101-200 mmHg bei  $\text{PEEP} \geq 5$  cmH<sub>2</sub>O (moderates ARDS)

$\leq 100$  mmHg bei  $\text{PEEP} \geq 5$  cmH<sub>2</sub>O (schweres ARDS)

Es sind mehrere Mechanismen beschrieben, die zum Krankheitsbild führen: Durch fortschreitende Entzündung des Lungengewebes wird die Permeabilität der Kapillaren erhöht und es entsteht ein interstitielles Lungenödem. Residente Alveolarmakrophagen setzen Entzündungsmediatoren frei, dadurch aktivierte neutrophile Granulozyten sezernieren Proteasen und Sauerstoffradikale. Das Resultat ist ein alveoläres Lungenödem (alveolar flooding) mit einem proteinreichen Exsudat, welches das Surfactant neutralisiert und damit die Bildung von Mikroatelektasen begünstigt. Des Weiteren können histologisch hyaline Membranen (fibrinhaltige Einlagerungen) in den Alveolen nachgewiesen werden, diese erschweren den Gasaustausch zusätzlich. Als Folge bildet sich ein intrapulmonaler Rechts-Links-Shunt aus, wodurch trotz normaler Perfusion des Lungenkapillarsystems das Blut aufgrund der gestörten Belüftung der Alveolen nicht ausreichend oxygeniert werden kann (39). Als diagnostische Parameter gelten beispielsweise die verminderte arterielle Sauerstoffsättigung des Blutes, die erhöhte alveoläre Proteindurchlässigkeit mit Verlust der Blut-Lungen-Schranke und die vermehrte Apoptoserate des Alveolarepithels (38) (39). Die Inzidenz liegt zwischen 30 und 74 je 100.000 Einwohner mit einer Mortalität zwischen 40-60%. ARDS Patienten werden durch Volumenrestriktion oder durch Sauerstoffgabe und Beatmungstherapie behandelt. Jedoch birgt diese Behandlung auch Risiken, da sowohl die Hyperoxie ( $FiO_2 > 0,6$ ) als auch die Überdruckbeatmung einen zusätzlichen Lungenschaden, der als „Ventilator-Induced Lung Injury“ (VILI) bezeichnet wird, verursachen kann (40) (41).

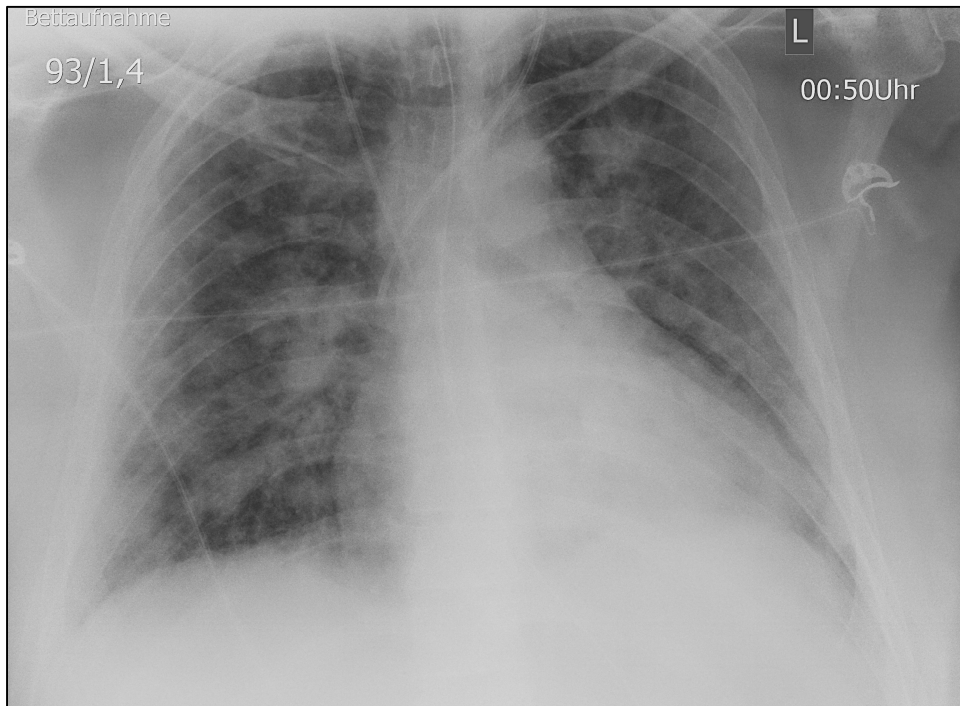


ABBILDUNG 3: RADIOLOGISCHER BEFUND BEI H1N1-INDUZIERTEM ARDS

Klassisches Röntgenbild eines ARDS eines dreiundvierzigjährigen Patienten mit schwerer H1N1-Pneumonie mit bilateralen Infiltraten und Lungenödem. (UKGM Standort Giessen, Medizinische Klinik II, Intensivstation, März 2018)

Viele Versuche die ARDS zu therapieren, u.a. Glucocorticoid-Gabe, inhalatives NO, aktiviertes Protein C sowie Applikation von intraalveolärem Surfactant, zeigten bisweilen keinen signifikanten Erfolg (40).

#### 1.4 Pulmonale Immunantwort nach Influenza Virus Infektion

Als auskleidende Schicht bildet das Epithel der Lunge bis in die Alveolen eine Schutzbarriere zum Blutkreislauf. In den Alveolen befinden sich ortständige Alveolarmakrophagen (rAM), die eine wirkungsvolle Barriere für potenzielle Noxen als erste Verteidigungseinheit des angeborenen Immunsystems darstellen. Epithelzellen ebenso wie rAM sind in der Lage, pathogenspezifische molekulare Muster zu erkennen, die als Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMP) bezeichnet werden (42). Darüber hinaus gibt es Moleküle, die bei inflammatorischen Prozessen entstehen und

ebenfalls eine Gefahr für den Organismus darstellen können, so genannte Damage Associated Molecular Patterns (DAMP), die ebenfalls von Epithelzellen und von rAM erkannt werden. Zur Erkennung dieser Proteine besitzen die Zellen sowohl membranständige als auch intrazelluläre hochkonservierte Rezeptoren, die Pattern Recognition Receptors (PRR). Zu den PRR gehören 11 membranständige oder endosomale „Toll-like“-Rezeptoren (TLR), die zytosolischen „Nucleotide Oligomerization Domain“ (NOD)-like Rezeptoren (NLR), die „RNA Helicases Retinoic Acid Inducible Gene-I“ (RIG-I)-like Rezeptoren (RLR), die Proteinkinase R (PKR) und zytosolische DNA Sensoren. Influenzaviren werden durch PKR und RIG-I/MDA-5 oder auch durch die endosomalen TLRs 3 und 7 erkannt. Durch die Bindung an PRR werden Signalkaskaden in Gang gesetzt und proinflammatorische Transkriptionsfaktoren aktiviert (43) (44). Nach der Infektion von Alveolarepithelzellen und rAM durch das Influenza A Virus kommt es zur Sekretion von diversen Chemokinen und Cytokinen, wie IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL10, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8 und CCL2, die in der Lage sind Immunzellen anzulocken und zu aktivieren. Diese Reaktion geschieht unmittelbar nach dem Erkennen des Influenza A Virus ungefähr nach 3-24 Stunden nach Infektion in einer hierarchischen Ordnung (70) (71). 24 bis 48 Stunden nach Infektion unterstützen rekrutierte Immunzellen die Produktion von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen und übernehmen diese zum Teil im weiteren Verlauf (72). Die Rekrutierung von Immunzellen spielt eine herausragende Rolle bei der Minimierung der Viruslast und ist dadurch einer der ersten akuten Prozesse nach Infektion. Durch Typ I Interferone wird die Migration von neutrophilen Granulozyten stimuliert, die wiederum durch autokrine und parakrine Stimulation die Immunkaskade fördern (73). Die proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren wie der nukleäre Faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) und die „Interferon Regulatory Factors“ 3 und 7 (IRF3/7) spielen dabei eine zentrale Rolle. Sie sorgen für die Synthese von frühen inflammatorischen Mediatoren wie z.B. Typ I Interferonen (Typ I IFN), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), deren Sekretion für parakrine und autokrine Stimulation und damit zur suffizienten Immunantwort führt (45) (46). Des Weiteren werden Chemokine ausgeschüttet, um andere Immunzellen an den infizierten Ort zu rekrutieren, Interleukin-8 (IL-8) ist für die Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten und CC-Chemokin Ligand 2 (CCL2, MCP-1, CCL5) für die Monozyten aus dem Blut zuständig. Durch die Rekrutierung von Immunzellen wird eine Eindämmung der Erregerlast gewährleistet (6) (45) (47). Pulmonale dendritische Zellen sind im Verlauf für die antigenspezifische

Immunantwort zuständig, indem sie mit den phagozytierten Erregern in die mediastinalen Lymphknoten einwandern und deren Oberflächenmoleküle naiven CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten präsentieren (48) (49) (50). Diese durch Zytokine und Chemokine getriggerte Immunreaktion ist unerlässlich für eine adäquate Erregerabwehr, kann allerdings, bei hochpathogenen Erregern wie dem Influenza A Virus H5N1, zu einer überschießenden Immunreaktion mit begleitender Zerstörung des Alveolarkompartments als Folge einer übermäßigen Zytokin Produktion in Verbindung gebracht werden. Dieses Phänomen wird als Zytokinsturm bezeichnet (51).

## 1.5 Das Influenza A Nichtstrukturprotein 1 (NS1)

Das Influenza A Virus Genom besteht aus acht RNA-Segmenten, das achte und kleinste Segment kodiert u.a. für das Nichtstrukturprotein 1 (NS1). NS1 besteht aus 220 Aminosäuren (aa) und ist, wie der Name bereits sagt, nicht für die Struktur des Virions notwendig, sondern erfüllt zahlreiche Funktionen in der Supprimierung der Immunantwort der Wirtszelle. Es umfasst eine N-terminale RNA-bindende Domäne (RBD) (1-72aa) und eine C-terminale Effektordomäne (74-220aa), die über eine Linker-Domäne (LD) (73-84aa) miteinander verbunden sind.

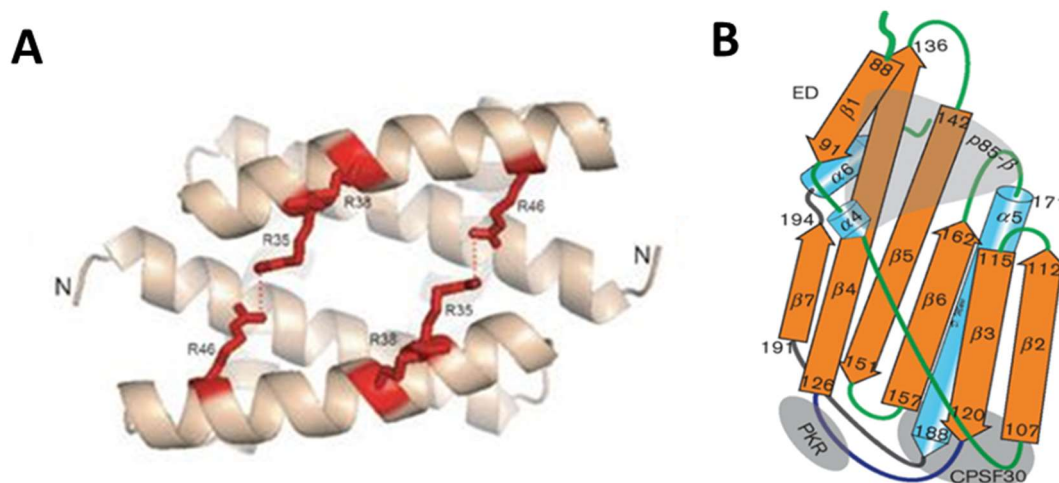


ABBILDUNG 4: SCHEMATISCHE STRUKTUR DES INFLUENZA A VIRUS NS1 PROTEINS

(A) Struktur der NS1 RNA-Bindungsdomäne (RBD) als Homodimer. In Rot sind die Wasserstoffbrückenbindungen dargestellt (52). (B) Schematische Darstellung der NS1 Effektordomäne in ihrer Tertiärstruktur. Grau unterlegt sind die Bindungsstellen mit p85 $\beta$ , PKR und CPSF30 (53).

Die RBD formt drei  $\alpha$ -Helices im NS1, in der Quartärstruktur ergeben sich zwei RBD als Homodimer, die antiparallel verlaufen wobei die Aminosäuren R38 mit 'R46 und R35 mit 'R35 durch Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind. Das Homodimer der RBD bildet damit eine konservierte Tasche für dsRNA. Die C-terminale ED formt drei  $\alpha$ -Helices und sieben  $\beta$ -Faltblätter, die gemeinsam wiederum eine  $\beta$ -Schleife um die fünfte  $\alpha$ -Helix formen, welche als  $\alpha$ -Helix  $\beta$ -Sichel Falte ("hotdog Falte") erkennbar ist. Die Effektordomäne (ED) ist für direkte Proteinbindung verantwortlich, sie besitzt

Bindungsstellen für PKR, Cleavage and polyadenylation specificity factor 30 (CPSF30) und p85 $\beta$  (52) (53) (54).

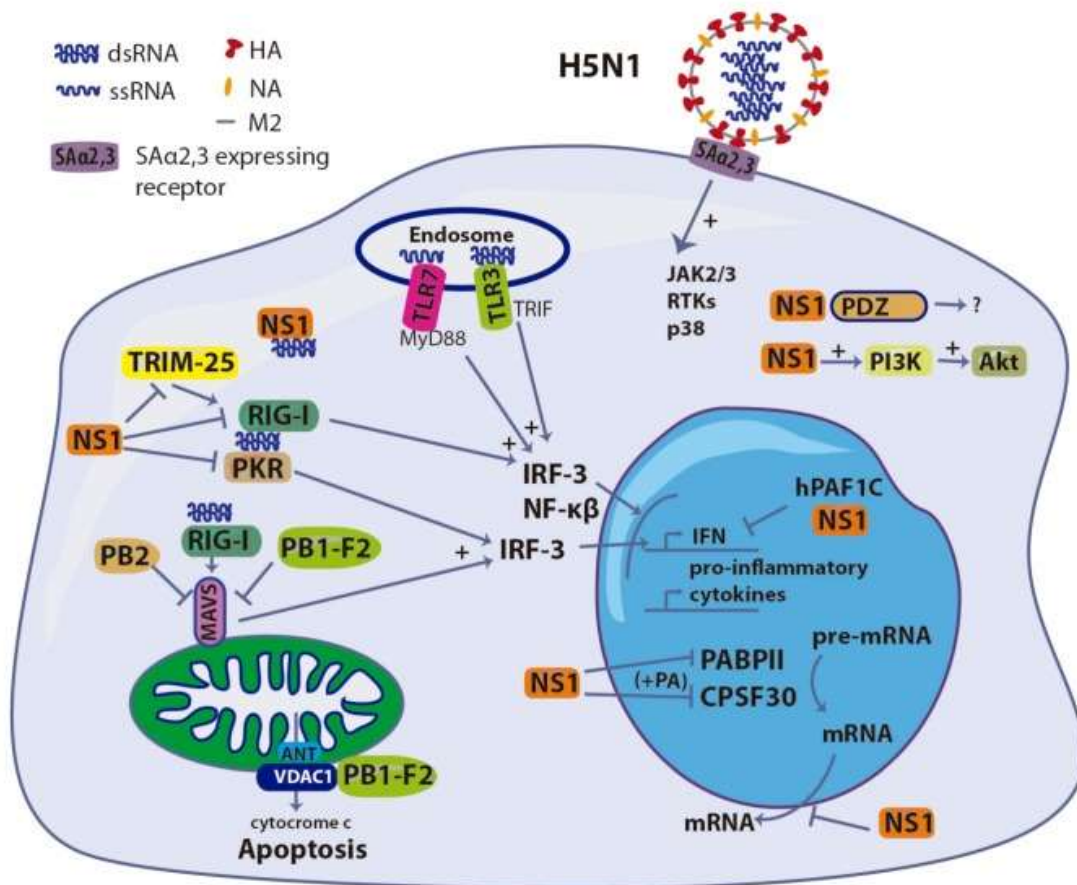


ABBILDUNG 5: NS1 UND SEINE ANGRIFFPUNKTE IN DER ZELLE

Verschiedene Angriffspunkte von NS1. Mit der RNA-bindenden Domäne (RBD) sequestriert NS1 virale dsRNA und maskiert sie damit vor der RNA-abhängigen Proteinkinase R (PKR). Ebenfalls mit der RBD interagiert NS1 direkt mit den ISG PKR, retinoic acid inducible gene I (RIG-I) und Tripartite motif-containing protein 25 (TRIM-25) und dämpft damit die weitere Enzymkaskade. Die Effektor Domäne des NS1 ist durch Bindung des poly(A) binding protein II (PABPII) und des 30 kDa subunit of the cleavage and polyadenylation-specificity factor (CPSF30) in der Lage ganz spezifisch die 3' Prozessierung der zellulären pre-mRNA zu inhibieren. NS1 inhibiert den nukleären Export von zellulärer mRNA. Abbildung aus (55).

### 1.6 Proteinkinase R (PKR)

Für die sofortige Reaktion auf eine Influenza A Virus Infektion ist das angeborene Immunsystem zuständig, dabei gilt die Ausschüttung von Typ I Interferonen als erste und schnellste Reaktion der infizierten Zelle. Die dsRNA abhängige Proteinkinase R (PKR) gehört zu der Gruppe der durch Interferon stimulierten Gene (ISG) und ist ein erster Protagonist in der Enzymkaskade, die letztendlich zur Produktion und Ausschüttung von Interferon  $\alpha$  und  $\beta$  stimuliert, sowie als positive Rückkopplung von Interferon  $\alpha$  und  $\beta$  selbst hochreguliert wird (56). PKR ist eine Serin/Threonin Kinase, die zwei funktional unterschiedliche Domänen aufweist. Sie besteht zum einen aus der N-terminalen dsRNA bindenden Domäne (RBD) und zum anderen aus der C-terminalen katalytischen Einheit. PKR befindet sich sowohl im Zytoplasma (assoziiert mit Ribosomen) als auch im Zellkern in seiner inaktiven Form (57). Sobald virale dsRNA an die RBD bindet findet eine Konformationsänderung statt, darauf folgt die Autophosphorylierung des Enzyms, anschließend dimerisieren zwei phosphorylierte PKR und bilden als Dimer die aktive Form (58). Daraufhin gibt es einige Signalwege, die initiiert werden. Zum einen phosphoryliert PKR den eukaryotischen Initiationsfaktor  $2\alpha$  (eIF2- $\alpha$ ), dieser wiederum initiiert einen Translationsarrest von viralen und zelleigenen Proteinen, um die Virusvermehrung zu unterdrücken (59). Zum anderen aktiviert PKR den nukleären Faktor  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ), dieser ist einer der zentralen proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren und wird nach Aktivierung in den Zellkern transportiert, wo er an die Promotorregion von IFN- $\beta$  bindet. PKR ist ein multifunktionales Enzym, es ist in Prozessen der Apoptose sowie der Autophagie involviert. Neuste Studien haben gezeigt, dass PKR auch in der Stabilität der IFN-mRNA eine große Rolle spielt und somit ein außerordentlich wichtiger Spieler der angeborenen Immunantwort ist (60) (61) (62).

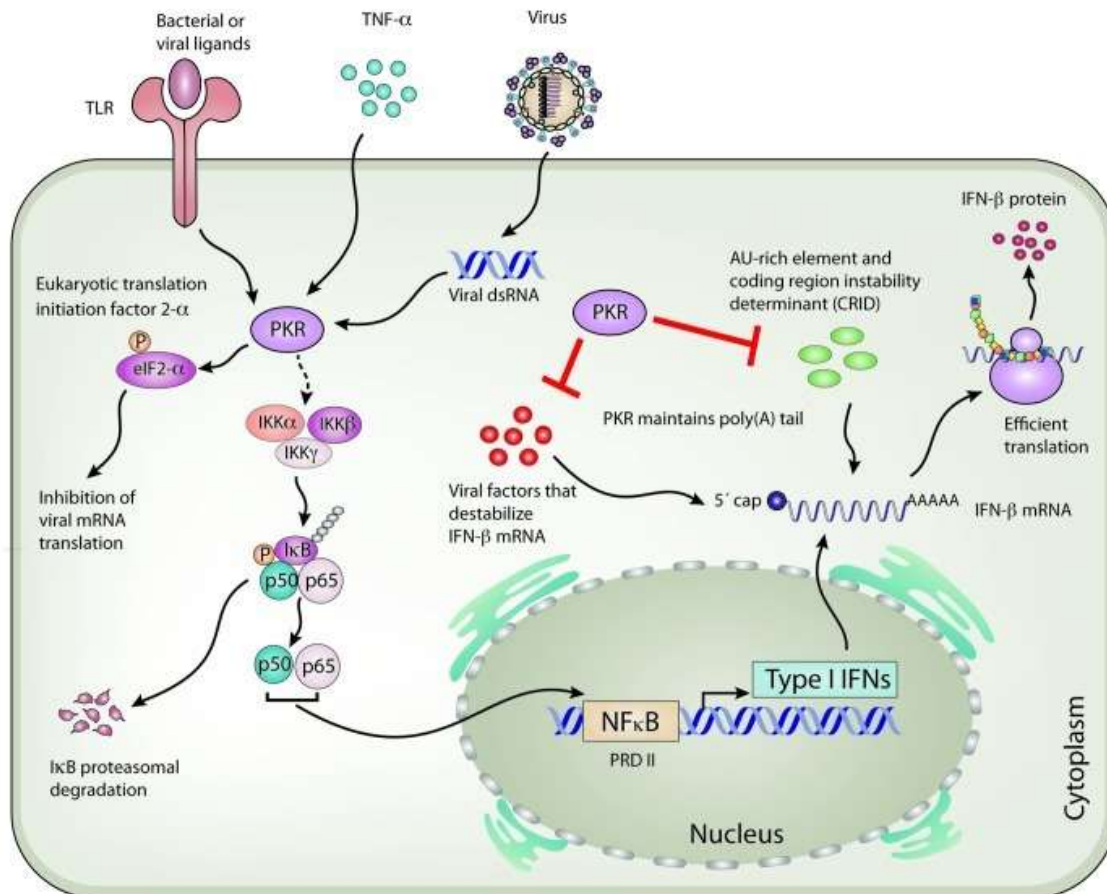


ABBILDUNG 6: DIE ROLLE VON PKR BEI DER INTERFERON PRODUKTION

Die Proteinkinase R wird durch unterschiedliche Stimuli aktiviert (z.B. virale dsRNA, TLR oder Zytokine). Nach Aktivierung phosphoryliert PKR den eukaryotischen Initiationsfaktor 2 $\alpha$  (eIF2- $\alpha$ ), was zur Inhibition der Proteinsynthese führt. Darüber hinaus aktiviert PKR den IKK $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ -Komplex, welcher die Ubiquitierung und proteosomale Degradierung von dem Inhibitor des nukleären Faktors  $\kappa$ B (I $\kappa$ B) initiiert, resultierend in der Freisetzung von aktiven NF $\kappa$ B-Dimeren, welche in den Zellkern transloziert und dort an IFN-Promoterregionen binden und deren m-RNA transkribieren.

Abbildung aus Munir et al., Virulence, The multiple Faces of proteinkinase R in antiviral defence.

### 1.7 Interaktion zwischen NS1 und Proteinkinase R (PKR)

Die RNA abhängige Proteinkinase R (PKR) hat umfassende antivirale Eigenschaften und ist auf Grund dessen ein Angriffsziel vieler viraler Proteine, um die Virusvermehrung zu propagieren (63). Das Influenza A Nichtstrukturprotein 1 ist eines der Proteine, die PKR in ihrer Aktivität inhibieren können bzw. ihr Substrat, die virale dsRNA, sequestrieren können (64). Die Interaktion zwischen NS1 und PKR verläuft zum einen indirekt über Sequestrierung von viraler dsRNA durch das NS1 und zum anderen über eine direkte Bindung von PKR durch NS1. Beides führt zur Reduktion der Immunreaktion und damit zur Steigerung der viralen Vermehrung (65) (66) (67). Als wichtiger Virulenzfaktor hat das Influenza A NS1 diverse Aufgaben in der Unterdrückung der Zellabwehr nach Infektion (68). In Hinsicht auf die Interaktion mit PKR wurden bereits vier Aminosäurepositionen in der RNA-Bindungsdomäne des NS1 beschrieben. Um die genaue Funktion der jeweiligen Aminosäurestellen zu adressieren, wurden Mutanten des A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) Virus hergestellt bei denen durch eine Punktmutation die jeweilige Aminosäure an der Stelle durch Alanin ersetzt wurde. Alanin eignet sich durch seine ungeladene und hydrophobe Eigenschaft hervorragend bei Mutationen, um die Funktion der eigentlichen Aminosäure aufzuheben. Die vier Mutanten Viren PR8 NS1(R35A), PR8 NS1(R38A), PR8 NS1(K41A) und PR8 NS1(R46A) wurden von der Arbeitsgruppe Wolff im Robert-Koch-Institut hergestellt und deren Eigenschaften in vitro an A549 und HEK-293T Zellen studiert. In Schierhorn *et al* (67) konnte gezeigt werden, dass die Mutanten PR8 NS1(R35A) und PR8 NS1(R46A) nicht in der Lage waren die Phosphorylierung von PKR zu inhibieren. Trotz einer starken PKR Aktivierung, blieb eine signifikante Erhöhung des IFN- $\beta$  Levels nach Infektion mit diesen Mutanten aus (67). Die Mutanten PR8 NS1(R38A) und PR8 NS1(K41A) waren imstande in vitro die PKR Aktivierung zu verhindern und zeigten darüber hinaus eine IFN- $\beta$  Induktion nach Infektion, welche durch andere ISG wie z.B. RIG-I getriggert wurde und dadurch eine PKR unabhängige IFN- $\beta$  Stimulation stattfand (68) (69). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die PR8-Mutanten NS1(R35A), NS1(R38A) und NS1(R46A) nicht mehr in der Lage waren virale dsRNA zu binden, wobei NS1(R38A) auch in der Replikation beeinträchtigt war.

	PR/8 WT	PR/8 NS1(R35A)	PR/8 NS1(R38A)	PR/8 NS1(K41A)	PR/8 NS1(R46A)
<b>PKR Bindung</b>	+	-	+	+	-
<b>dsRNA Bindung</b>	++	-	-	+	-
<b>PKR Aktivierung</b>	-	+	-	-	+
<b>Replikation (NT)</b>	++	-	+	++	-
<b>Replikation (PKR KD)</b>	++	+	+	++	++
<b>IFN<math>\beta</math> Expression</b>	-	-	++	++	-

TABELLE 1: ÜBERSICHT DER EIGENSCHAFTEN VON PR/8 WT UND MUTANTEN *IN VITRO*

Aufgezeigte Viren wurden *in vitro* an A549 Zellen getestet. NT = nicht genetisch veränderte A549 Zellen, PKR KD = PKR knockdown A549 Zellen, ++/+ = starker/schwacher, - = kein, Einfluss. Modifiziert nach Schierhorn *et al* (67).

## 2. Zielsetzung

Bei vorliegender Arbeit wurde der Effekt von Punktmutationen im NS1-Gen des Influenza A Virus auf die Kaskade der Immunantwort *in vivo* evaluiert.

In diversen Arbeiten wird die Funktion des NS1-Proteins als Inhibitor der Proteinkinase R beschrieben. *In vitro* wurden bereits Erkenntnisse darüber erlangt, welche Punktmutationen und damit Aminosäurestellen im NS1-Protein entscheidend für die Inhibierung der PKR sind, ebenso wurden PKR unabhängige Aminosäurestellen untersucht und deren Einflüsse auf Zytokinausschüttung und Viruslast beobachtet (67). In dieser Arbeit wurden Erkenntnisse über die Wirkung im komplexen lebenden Organismus gewonnen.

Es wurden PR/8 WT und die Mutanten PR/8 NS1(R35A), PR/8 NS1(R38A), PR/8 NS1(K41A) und PR/8 NS1(R46A) untersucht. Es wurden WT-Mäuse und PKR-Knockout Mäuse verwendet. Ausgewertet wurden sowohl Überleben und Morbidität als auch klinische Parameter zu Lungenschaden, wie Viruslast und Immunzellmigration. Die ausgewählten Parameter gaben Aufschluss über Virulenz und Pathogenität der jeweiligen Viren.

Es wurde untersucht, ob und welche NS1-Mutationen sich spezifisch auf die PKR-abhängige Kaskade *in vivo* auswirken. Die hieraus gewonnenen Erkenntnisse sollen dazu beitragen, den Nutzen von strukturspezifischen NS1-Antagonisten für neue Therapieoptionen zu evaluieren.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Verwendung von humanem Material

Humanes Lobektomie-Material wurde im Rahmen der Biobank des Lungenzentrums der Universitäten Gießen und Marburg (UGMLC) nach schriftlicher Einverständniserklärung der Patienten gesammelt. Ein positives Ethikvotum der Ethikkommission lag vor (Az. 10/06).

#### 3.2 Versuchstiere

In den Experimenten wurden männliche und weibliche Tiere verschiedener Mauslinien im Alter von neun bis vierzehn Wochen verwendet. Verwendet wurden Wildtyp C57Bl6/J-Mäuse (WT) bezogen von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) und PKR-defiziente Mäuse (PKR<sup>-/-</sup>). Diese wurden freundlicherweise von J. Pavlovic (Institut für medizinische Virologie, Universität Zürich, Schweiz) bereitgestellt. Die Tiere wurden unter speziellen Pathogen-freien (SPF) Konditionen gehalten. Alle Experimente wurden von der lokalen Tierschutzbehörde genehmigt (Antrag 67-2013).

#### 3.3 Virusstämme

Bei den verwendeten Viren handelt es sich um in embryonalen Hühnereiern gezüchtete mausadaptierte Influenza A Viren: Wildtyp A/Puerto Rico/8/34 (H1N1; PR8) und vier rekombinante NS1-Mutanten (R35A, R38A, K41A und R46A). Alle Virusstämme wurden freundlicherweise von PD Dr. rer. nat. Thorsten Wolff (Robert-Koch-Institut Berlin) bereitgestellt.

3.4 Zellkulturmedien und Puffer

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
A549-Medium	HamsF12 (Gibco), 10% FCS (FCS Gold, Gibco), 100U Penicillin/0,1mg/ml Streptomycin/2mM L-Glutamin (Sigma)
Avicel-Medium	zweifach MEM (Gibco), 100U Penicillin/0,1mg/ml Streptomycin (Sigma), 0,1% NaHCO <sub>3</sub> (Sigma), 0,2% BSA (Sigma), 2µg/ml Trypsin-TPCK (Worthington), 1,25% Avicel (RC581, FMC Biopolymers)
BAL-Medium	RPMI 1640 (Gibco), 10% FCS (FCS Gold, Gibco), L-Glutamin 1:1 (Gibco)
DMEM/HEPES	DMEM high Glucose (Gibco), 25mM HEPES (Biochrom)
Erylyse-Puffer	Ammoniumchlorid 82,6g/l (Merck), Kaliumhydrogencarbonat 10,0g/l (Merck), Titriplase III EDTA 0,42g/l (Merck), gelöst in 1000ml A. dest. (Braun), pH 7,4
FACS-Puffer	PBS <sup>Mg-/Ca-</sup> , 0,9% Sodium azide (Sigma Aldrich), 7,4% EDTA (Biochrom), 0,5% FCS (FCS Gold, Gibco) pH 7,2
hAEC-Infektionsmedium	HamsF12 (Gibco), 0,2% BSA (Sigma), 100U Penicillin/0,1mg/ml Streptomycin (Sigma), 2,5µg/ml Amphotericin B (Sigma), 2µg/ml Trypsin-TPCK (Worthington)
hAEC-Medium	HamsF12 (Gibco), 10%FCS (FCS Gold, Gibco), 100U Penicillin/0,1mg/ml Streptomycin, 2,5µg/ml Amphotericin B (Sigma)
MACS-Puffer	PBS <sup>Mg-/Ca-</sup> , 7,4% EDTA (Biochrom), 0,5% FCS (FCS Gold, Gibco) pH 7,2
mAEC-Infektionsmedium	DMEM High Glucose (Gibco), 25mM HEPES (Biochrom), 0,2% BSA (Sigma), 100U Penicillin/0,1mg/ml Streptomycin (Sigma), 2µg/ml Trypsin-TPCK (Worthington)
mAEC-Medium	DMEM high Glucose (Gibco), 25mM HEPES (Biochrom), 10%FCS (FCS Gold, Gibco), 100U Penicillin/0,1mg/ml Streptomycin (Sigma)
MDCK II Infektionsmedium	DMEM High Glucose (Gibco), 0,2% BSA (Sigma), 100U Penicillin/0,1mg/ml Streptomycin (Sigma), 2µg/ml Trypsin-TPCK (Worthington)
MDCK II-Medium	DMEM high Glucose (Gibco), 10% FCS (FCS Gold, Gibco), 100U Penicillin/0,1mg/ml Streptomycin (Sigma)

MLE-12-Medium	RPMI 1640 (Gibco), 10% FCS (FCS Gold, Gibco), 100U Penicillin/0,1mg/ml Streptomycin/2mM L-Glutamin (Sigma), 0,002mg/ml Insulin/ 0,0011mg/ml Transferrin/ 0,00000134mg/ml Selenium (Gibco)
NP40-Zell-Lyse-Puffer	(Invitrogen) 50 mM Tris, pH 7.4, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> , 1% Nonidet™ P40 (NP40), 0.02% NaN <sub>3</sub>
PBS/EDTA	PBS <sup>Mg<sup>-</sup>/Ca<sup>-</sup></sup> (Gibco), 2mM EDTA (Biochrom)
PII-Puffer	0,4g/l KCl (Merck), 1,11g/l Glucose (Sigma), 0,46g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck), 1% HEPES (Biochrom), 0,28mM CaCl <sub>2</sub> (Merck), 1,3mM MgSO <sub>4</sub> (Sigma)
Virusmedium	PBS <sup>Mg<sup>+</sup>/Ca<sup>+</sup></sup> (Gibco), 0,2%BSA (Sigma), 100U Penicillin/0,1mg/ml Streptomycin (Sigma)

### 3.5 Gewinnung von primären Zellen

#### 3.5.1 Isolation und Kultur von primären murinen Typ II AECs

Zur Gewinnung von murinen Typ II AECs wurden Mäuse zunächst mit Isofluran (Baxter) sediert und durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurde die Trachea mit Schere und Pinzette freigelegt um eine stumpfe Kanüle einzulegen und mit einem Faden (4/0, Ethicon) zu fixieren. Danach wurde der Brustkorb eröffnet, um eine Lungenperfusion mit 20ml HBSS (Gibco) durchzuführen. Die Perfusion dient der Entfernung des Blutes aus den Lungengefäßen. Über die Kanüle wurden 1,5ml Dispase (50 Caseinolytic Units/ml, BD) gefolgt von 0,5ml 1% Agarose (Merck) in die Lunge appliziert und die Kanüle anschließend entfernt. Danach wurde die Lunge aus dem Brustkorb vorsichtig herausgeschnitten und in ein Eppendorf-Gefäß (Eppendorf Tubes® 5.0 mL, Eppendorf) mit 1,5 mL Dispase (50 Caseinolytic Units/ml, BD) hineingegeben, dort inkubierte die Lunge vierzig Minuten bei Raumtemperatur (RT). Nach der Inkubation wurde die Lunge in ein gentleMACS™ Tube (MACS Miltenyi Biotec) mit 5mL DMEM (Gibco)+DNAse (Serva) überführt und im gentleMACS™ Dissociator (MACS Miltenyi Biotec) acht Sekunden püriert. Das entstandene Lungenhomogenat wurde dann für acht bis zehn Minuten auf einem Schüttler (Heidolph) bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Suspension durch 100µm- (Falcon), 40µm- (Falcon) und 20µm- (Millipore) Filter filtriert und am Ende zentrifugiert (8min, 4°C, 800rpm). Das entstandene Zellpellet wurde in 5ml

DMEM+Hepes resuspendiert und mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer wurde die Zellzahl ermittelt. Die Zellzahl wurde auf zehn Millionen Zellen/ml eingestellt und die Zellsuspension wurde für dreißig Minuten mit biotinylierten CD45-, CD16/32- und CD31-Ak (BD Pharmingen) bei 37°C inkubiert, um Leukozyten und Endothelzellen zu markieren. Die Antikörper-Mengen ( $\mu$ l) wurden dabei wie folgt berechnet:

Biotinylated $\alpha$ -mouse CD45:	(Zellzahl/ 1 Mio) x 0,9
Biotinylated $\alpha$ -mouse CD16/32:	(Zellzahl/ 1 Mio) x 0,675
Biotinylated $\alpha$ -mouse CD31:	(Zellzahl/ 1 Mio) x 0,4

Mit Hilfe magnetischer Beads (Dynabeads, Biotin Binder, Invitrogen), welche für dreißig Minuten bei Raumtemperatur auf einem Rollenmischer (Cat M. Zipper GmbH) inkubiert wurden, wurden die markierten Zellen nach einem Waschschrift mit DMEM+Hepes, im Sinne einer negativen Selektion, in einem magnetischen Separator (Magnetic particle concentrator, Dynal) entfernt und die AECs des Überstandes nach erneuter Zentrifugation in mAEC-Medium aufgenommen. Die Vitalität der verwendeten Zellen nach Isolation lag über neunzig Prozent, bestimmt mit Hilfe einer Trypan blau Färbung (0,4%, Gibco) zum Ausschluss toter Zellen. Die isolierten AECs wurden erneut in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und mit einer Dichte von 2,5-5,0 x 10<sup>5</sup>/well in 24well-Zellkultur-Platten (BD) ausgesät. Für real-time-PCR-Analysen und zur Zytokinquantifizierung wurden sie bis zu fünf Tage in mAEC-Medium bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

### 3.5.2 Isolation von primären murinen Makrophagen

Zur Gewinnung von primären murinen Makrophagen wurden WT-Mäuse sowie PKR-knockout Mäuse mit Isofluran (Baxter) betäubt und anschließend durch Genickbruch getötet. Die Tiere wurden auf einem Operationsgeschirr mit Leukosilk fixiert und mit 70% Ethanol eingesprüht. Vorsichtig wurde das Fell im Halsbereich abpräpariert, die Speichellappen wurden mit der Pinzette nach lateral verschoben und damit die Trachea freigelegt. Eine stumpfe Kanüle (Sterican 21Gx7/8, B. Braun) wurde in die Trachea eingeführt und mit einem Faden (4/0, Ethicon) fixiert. Danach wurde eine

Bronchoalveoläre Lavage (BAL) durchgeführt, in dem nacheinander 8 Mal 500µL kaltes PBS+EDTA in die Lunge instilliert und anschließend wieder aspiriert wurde. Die gewonnene Flüssigkeit wurde in einem 5mL Eppendorf-Gefäß (Eppendorf) aufgefangen und bei 1200 rpm und 4°C für 8 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1mL AM-Medium resuspendiert, davon wurden 10µL entnommen, um in der Neubauer-Zählkammer die Gesamt-Zellzahl zu bestimmen. Zuletzt wurden die Makrophagen in der einer Dichte von ca. 64.000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät und für in vitro Experimente verwendet.

### 3.5.3 Isolation von primären humanen Typ II AECs

Für die Gewinnung der Zellen wurde tumorfernes Lobektomiegewebe von Tumorpatienten nach deren schriftlicher Einwilligung verwendet (UGMLC Biobank). Das Lungengewebe wurde mit hAEC-Medium gewaschen und anschließend mit einer Schere zerkleinert und in 50-100ml PII-Puffer/2,5% Dispase (Dispase II, Roche) hundertachtzig Minuten im Inkubator (Thermo Fischer) bei 37°C rotierend inkubiert. Um die Zellen zu vereinzeln, wurden die Lungenstücke im MACS MIX Tube und im MACS MIX Gerät (MACS Miltenyi Biotec) acht Sekunden lang püriert und dann über 100µm- (BD), 40µm- (BD) und zuletzt 20µm- (Millipore) Filter gegeben. Das Filtrat wurde zentrifugiert (1500rpm, 20°C, 25min), das Zellpellet in 30ml PII/0,25% DNase (Serva) resuspendiert und jeweils 15mL der Zellsuspension vorsichtig auf 20mL Ficoll (Ficoll Paque, Plus, GE Healthcare) gegeben. Es erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (2500rpm, 15min, 20°C, ohne Bremse), sodass die Interphase sich sichtbar darstellte und mit einer sterilen Pipette abgesaugt werden konnte. Diese wurde mit PII/0,25% DNase (Serva) auf 50mL aufgefüllt und erneut zentrifugiert (1500rpm, 20°C, 15min). Das entstandene Pellet wurde in 2mL hAEC-Medium resuspendiert, die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und auf zehn Millionen Zellen/80µl mit MACS-Puffer eingestellt. Für die Depletion von Leukozyten, wurden 20µl CD45 MACS-Beads (human CD45 Micro Beads, Miltenyi Biotec)/ zehn Millionen Zellen hinzu pipettiert und fünfzehn Minuten bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die markierten Zellen in Rahmen einer negativen Selektion durch einen magnetischen Separator (MACS Miltenyi Biotec) herausgetrennt. Die hAEC werden als Durchfluss aufgefangen, mit hAEC-Medium gewaschen und mit einer

Zellzahl von 250.000/well in 24well-Platten (BD) ausgesät. Die Reinheit der Zellen wurde durchflusszytometrisch mit einem  $\alpha$ -human-EpCAM/CD326-Ak (Biolegend) als Epithelzellmarker und einem  $\alpha$ -human-CD45-Ak (BD) als Leukozytenmarker bestimmt. Für die Versuche wurden nur Zellen mit einer Reinheit größer neunzig Prozent verwendet. Achtundvierzig Stunden nach Isolation erfolgte der erste Medienwechsel, am vierten bis fünften Tag nach Isolation konnte mit dem Experiment begonnen werden.

### 3.6 Herstellung eines Virusstocks

Die Generierung der verwendeten Virusstocks fand im Robert-Koch-Institut in Berlin in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Thorsten Wolff statt (67).

### 3.7 Titration des Virusstocks

Einen Tag vor Infektion wurden MDCK-II Zellen mit einem Verhältnis von 1:3 mit 2ml MDCK-II Medium in 6-well Platten ausgesät. Zur Infektion wurde eine 10-fach Verdünnungsreihe der Virussuspension in Virusmedium angesetzt und je 1ml pro well nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS<sup>Mg<sup>+</sup>/Ca<sup>+</sup></sup> (Gibco) eingesetzt. Nach 1h bei Raumtemperatur wurden 2ml Avicel Medium hinzugegeben. Nach zwei Tagen wurden die Zellen nach Abnehmen des Mediums mit 1ml 4% Paraformaldehyd (Sigma) 30min bei 4°C fixiert und nach dreimaligem Waschen mit PBS<sup>Mg<sup>+</sup>/Ca<sup>+</sup></sup> (Gibco) eine immunhistologische Färbung durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit 1ml 0,3% Triton X 100 (Roth) permeabilisiert (15min, Raumtemperatur) und mit 0,5ml eines 1:1000 verdünnten  $\alpha$ -Influenza NP Antikörpers (Meridian Life science) in PBS<sup>Mg<sup>+</sup>/Ca<sup>+</sup></sup> (Gibco)/0,1% Tween 80 (Sigma)/10% Pferdeserum (PAA) eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 2ml PBS<sup>Mg<sup>+</sup>/Ca<sup>+</sup></sup> (Gibco)/0,05% Tween 80 (Sigma) wurden 0,5ml des 1:2000 verdünnten HRP-(Meerrettich Peroxidase-) markierten Sekundäntikörpers (goat- $\alpha$ -mouse IgG-HRP, Santa Cruz) dazugegeben und 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS<sup>Mg<sup>+</sup>/Ca<sup>+</sup></sup> (Gibco) wurde True Blue (KPL) als Substrat hinzugegeben. Nach etwa 20- 30min konnten blau gefärbte Plaques ausgezählt und der Titer wie folgt

berechnet werden: pfu (Plaque forming units)/ml = Mittelwert der gezählten Plaques x Verdünnung

### 3.8 *In vitro* Experimente

AECs wurden vier bis fünf Tage nach Isolation kultiviert, vor der Infektion zwei Mal mit PBS<sup>Mg<sup>+</sup>/Ca<sup>+</sup></sup> (Gibco) gewaschen und schließlich wurden die Virusverdünnungen auf die Zellen gegeben. In Virusmedium wurden die Virusverdünnungen auf eine MOI (Multiplizität der Infektion) von 0,1 eingestellt und nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS<sup>Mg<sup>+</sup>/Ca<sup>+</sup></sup> (Gibco) wurde die Virusverdünnung hinzugegeben. Zur Infektion wurden die Zellen eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Virusmedium abgesaugt und das entsprechende Infektionsmedium hinzugegeben. Entsprechend der Fragestellung wurde nun zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Zellkulturüberstand abgenommen und die Zellen nach dem Waschen mit PBS<sup>Mg<sup>+</sup>/Ca<sup>+</sup></sup> (Gibco) mit dem jeweiligen Lysepuffer lysiert (Western Blot; real time PCR).

### 3.9 *In vivo* Experimente

#### 3.9.1 Narkose

Zur Narkoseeinleitung erfolgte eine Prämedikation mit 0,02mg/kg Körpergewicht Atropin intraperitoneal. Danach erfolgte eine inhalative Narkose mit 2,5% Isofluran durch ein MiniHUB Narkosegerät der Firma Temsega. Zunächst wurde die Maus in eine im MiniHUB integrierte Induktionskammer gesetzt. Diese ist mit 37°C temperiert, um ein Auskühlen während der Narkose zu vermeiden. Nach wenigen Sekunden war die Sedierung erfolgt und die Maus konnte auf den Intubationstisch (Braintree Scientific) verlagert werden, wo die Narkose durch eine Nasenmaske (Temsega) aufrechterhalten wurde. Zur tiefen Narkose vor Entbluten zur Tötung erfolgte die intraperitoneale Gabe von 200µl einer Mischung aus 16mg/kg Körpergewicht Xylazinhydrochlorid (Rompun® 2%, Bayer GmbH, 20mg/ml) und 100mg/kg Körpergewicht Ketaminhydrochlorid (Ketavet®, Pharmacia & Upjohn, 100mg/ml) in 0,9% NaCl-Lösung (B. Braun) verdünnt.

### 3.9.2 Orotracheale Infektion

Die narkotisierten Mäuse wurden zum Schutz der Augen vor Austrocknung mit Bepanthen®-Augensalbe versorgt und anschließend in Rückenlage auf einem Intubationstisch fixiert. Zur orotrachealen Injektion wurde die Maus unter Sicht mit einer Vasofix G27 Venenverweilkatheter intubiert. Nun wurde die entsprechende Substanz in einem Volumen von 70µl mittels einer 1ml-Insulinspritze (B. Braun) Spritze unter visueller Kontrolle der Atmung in die Lunge instilliert. Zur Infektion wurde den Tieren das PR8-Virus sowie die Mutanten in 70µl PBS<sup>Mg-/Ca-</sup> gelöst appliziert. Nach erfolgter Aspiration der jeweiligen Lösung wurden die Tiere extubiert und zum Aufwachen in den Käfig zurückgesetzt. Das Aufwachen erfolgte unter Beobachtung und dauerte etwa 30 Sekunden. Die Tiere wurden täglich mindestens einmal visitiert und anhand eines Scorings beurteilt und bei entsprechend schlechtem Gesundheitszustand getötet. Bei einer Score-Summe von 10-15 Punkten wurde den Tieren spezielles hochkalorisches Feuchtfutter und 5% Glukosetrinklösung angeboten. Die Scoring-Parameter umfassten den Verlust des Körpergewichtes, die Aktivität und Körperhaltung, das Haarkleid, Zeichen einer Dehydratation und die Atmung. Bei stumpfem, verklebtem oder gestäubtem Fell und vermindertem Hautturgor, gekrümmter Körperhaltung und Bewegungsarmut oder erschwerter Atmung und blauen Schleimhäuten wurde der Versuch beendet, ebenso bei einem Gewichtsverlust von mehr als zwanzig Prozent in zwei bis drei Tagen. Jeder Maus wurde dabei ein Score-sheet zugeordnet, auf dem die jeweiligen Belastungspunkte eingetragen und die getroffenen Maßnahmen vermerkt wurden. Das erste Kriterium ist das Körpergewicht, als nächstes wurde der Allgemeinzustand evaluiert, dabei wurde das äußere Erscheinungsbild beurteilt. In Augenschein werden das Fell, die Augen und die Körperöffnungen genommen. Null bis 20 Punkte können bei diesem Kriterium vergeben werden, fünf Punkte bekommt die Maus, wenn das Fell matt und die Augen trüb aussehen. Als nächstes Kriterium wurde das Spontanverhalten beobachtet, Mäuse sind von Natur aus sehr neugierig und flink, somit eignet sich die Beurteilung sehr gut, um die Krankheitsintensität zu evaluieren. Es können ebenfalls zwischen null und zwanzig Punkte vergeben werden. Bei den Versuchsspezifischen Kriterien wurden Exsikkose und Atmung kontrolliert in dem eine deutlich sichtbare schnelle Atmung mit zehn und eine über vier Sekunden stehende Hautfalte mit 5 Punkten gewertet wurden, wobei die maximale Punktzahl 20 betrug. Wurde bei einem Versuchstier, entweder bei einem

Kriterium oder summiert aus mehreren Kriterien zwanzig Punkte erreicht, so wurde dieses Tier umgehend euthanasiert unter der Annahme, dass es innerhalb kurzer Zeit an der Infektion versterben würde.

### 3.9.3 Intravenöse Instillation von FITC-Albumin und arterielle und venöse Blutentnahme zur Bestimmung des pulmonalen Barrierschadens

Zur Bestimmung des alveolären Barrierschadens (alveoläre Leakage) wurde den Mäusen sechzig Minuten vor der venösen Blutentnahme 100µl 1mg/ml FITC-markiertes Albumin (66kDa, Sigma, Deisenhofen, Germany, in 0,9% NaCl verdünnt) in die Schwanzvene appliziert. Drei, fünf und sieben Tage nach der Infektion wurden venöse Blutproben entnommen. Dafür wurden die Tiere in eine tiefe Narkose versetzt und in Rückenlage fixiert. Die Tiere verstarben in tiefer Narkose durch Blutentzug. Für die venöse Blutentnahme wurde der abdominale Teil der Vena cava inferior freigelegt und aus ihr wurden ca. 600µl Blut mit einer 23G-Kanüle abgenommen und in ein 1,5ml Eppendorf®-Gefäß gegeben. Unter Lichtschutz wurde für mindestens drei Stunden die Gerinnung des Blutes in dem Eppendorf®-Gefäßen abgewartet. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (2500rpm, RT, 15 Min) und der Serum-Überstand wurde abgenommen und auf -80°C für anschließende Analysen weggefroren.

### 3.9.4 Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

An den Tagen 3, 5 und 7 nach Infektion wurden bronchoalveoläre Lavagen durchgeführt. Die Mäuse wurden durch Blutentzug in tiefer Narkose (siehe 3.9.1) getötet und in Rückenlage fixiert. Die Trachea wurde freigelegt und eröffnet. Eine Kanüle (Sterican 21Gx<sup>7</sup>/<sub>8</sub>, B. Braun) wurde in die Trachea eingesetzt und mit einem Vicrylfaden (4.0, Ethicon) fixiert. Die BAL wurde in zwei Fraktionen entnommen; die 1. Fraktion besteht aus nacheinander 300µl, 400µl und 500µl instilliertem und wieder aspiriertem kaltem PBS+EDTA, für die 2. Fraktion werden 8 Mal 500µL kaltes PBS+EDTA in die Lunge instilliert und anschließend wieder aspiriert. Die gewonnene Lavage wurde je Fraktion in ein 15-ml Falcon (BD) überführt und zentrifugiert (1200rpm, 4°C, 10 Min). Der Überstand der ersten Fraktion wurde auf -80°C weggefroren, der Überstand der zweiten Fraktion verworfen und die vereinten Zell-

Pellets beider Fraktionen in BAL-Medium auf Eis überführt. In einer Neubauer-Zählkammer wurde die Gesamt Zellzahl jeder BAL im LEICA DM1000 Mikroskop (Leica) ermittelt. Zur differenzierten Zellzählung wurden Zytozentrifugenpräparate (Cytospin 4, Thermo Scientific) hergestellt und mit der Pappenheim-Färbung (May-Grünwald (Merck) und Giemsa Azur-Eosin-Methylenblaulösung 1:20 in A. dest (Merck)) gefärbt. Nach der Pappenheim-Färbung wurden die Zellen im Mikroskop mit 100-fachen Vergrößerung morphologisch eingeteilt, es wurden insgesamt einhundert Leukozyten erfasst und die Gesamtleukozytenzahl in Prozent angegeben. Die Prozentwerte der jeweiligen Leukozyten-Population wurden anschließend, bezogen auf die Gesamtzellzahl der BAL, in absolute Werte umgerechnet.

### 3.9.5 Entnahme und Aufbereitung der Lunge

Nach erfolgter BAL wurde das Zwerchfell eingeschnitten und an den Rippen entlang abgetrennt, der Thorax wurde beidseitig auf Höhe der vorderen Axillarlinie eröffnet und anschließend bogenförmig mitsamt des Sternums abpräpariert. Zur Entnahme der Lunge wurde eine 20G-Kanüle (BD) in die Trachea eingebracht und fixiert bzw. verblieb in der Trachea nach der BAL. Die untere Hohlvene und der linke Vorhof wurden eingeschnitten und eine Perfusionskanüle (Ecoflo Perfusionsbesteck, Dispomed) in den rechten Ventrikel eingebracht. Mit Hilfe einer 20ml-Spritze (Braun) wurde die Lunge zur Blutentleerung retrograd mit PBS<sup>Mg<sup>-</sup>/Ca<sup>-</sup></sup> perfundiert. Über die Trachealkanüle wurde mit Hilfe einer 1ml-Spritze (B. Braun) 1,5ml erwärmte Dispase (BD Biosciences) in die Lunge infundiert. Anschließend wurde die Kanüle vorsichtig entfernt und die Trachea durch Zuziehen eines Knotens verschlossen. Die Lunge wurde nun mitsamt Herz, Thymus und Trachea aus dem Thorax herauspräpariert und für vierzig Minuten bei Raumtemperatur in erwärmter Dispase (BD Biosciences) inkubiert. Danach wurden Herz, Thymus, Trachea und beide Hauptbronchien abpräpariert und die Lunge in 5mL 0,01% DNase (Serva, Heidelberg, Germany) in mAEC-Medium gegeben. Daraufhin wurden die Lungen zur AEC Isolation (siehe 3.5.1) weiterverwendet.

Wurden Kryoschnitt-Präparaten aus den Mäuselungen erstellt, so wurden die Tiere in Narkose gelegt und verstarben durch retrograde Perfusion der Lungen aufgrund von Blutentzug (siehe 3.9.1). Über eine Trachealkanüle wurde 1ml Tissue-Tek® (O.C.T.<sup>TM</sup> Compound, Sakura) 1:1 mit PBS<sup>Mg<sup>-</sup>/Ca<sup>-</sup></sup> in die Lunge instilliert. Anschließend wurde die

Kanüle entfernt und die Trachea mit einem Knoten verschlossen. Nach Herauspräparation wurde die Lunge mit dem an sie angrenzenden Gewebe in eine zu  $\frac{1}{3}$  mit Tissue-Tek® gefüllte Plastik-Form (Disposable Plastik Tissue Embedding Molds, Polysciences Inc., Warrington, UK) gegeben. Die Plastikform wurde nun bis zum Rand mit Tissue-Tek® aufgefüllt und dann langsam in flüssigen Stickstoff getaucht. Nachdem das komplette Gewebe durchgefroren war, wurde die Form wieder aus dem Stickstoff herausgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung auf  $-80^{\circ}\text{C}$  weggefroren. Für die Anfertigung von Paraffinschnitten aus Mäuselungen wurden die Tiere in tiefe Narkose gelegt und verstarben aufgrund von Blutentzug durch die untere Hohlvene. In die unperfundierte Lunge wurde über die Trachealkanüle  $100\ \mu\text{l}$  4% Paraformaldehyd (Sigma) instilliert. Anschließend wurde die Kanüle entfernt und die Trachea mit einem Knoten verschlossen. Nach Herauspräparation wurde die Lunge mit dem sie angrenzenden Organen in ein mit 3 ml 4% Paraformaldehyd (Sigma) gefülltes 15-ml Falcon (BD) gegeben und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Anschließend erfolgte die Fixierung im Gewebeeinfiltrationsautomat LEICA ASP200S (Leica) und die Einbettung in Paraffin am LEICA EG1150 H (Leica). Die Paraffinblöcke wurden zur weiteren Verarbeitung bei Raumtemperatur gelagert.

### 3.10 Bestimmung weiterer Parameter bei Tierexperimenten und Aufarbeitung der gewonnenen Materialien

#### 3.10.1 Bestimmung der alveolären Schrankenstörung (alveoläre Leakage)

Zur Bestimmung der alveolären Schrankenstörung wurde die Menge von intravenös appliziertem, FITC-markiertem Albumin in der BALF in ein Verhältnis zu der im Serum vorhandenen Menge gesetzt. Die Serumproben (1:100 verdünnt) und die erste Fraktion der BALF (unverdünnt) wurden hierzu in Duplikaten auf eine schwarze 96well-Platte (Costar) aufgetragen und mit einem FLX800 und der KC Junior Software (Biotec Instruments) wurde die Fluoreszenzintensität (Filter Ex485/200 Emission 530/25) von FITC gemessen. Die Werte für die Leakage wurden entsprechend des Verhältnisses der Fluoreszenzintensität von BALF/Serum berechnet und in beliebigen Einheiten (Arbitrary Units, AU) angegeben.

### 3.10.2 Bestimmung der pulmonalen Virustiter

Analog zur Virustitration erfolgte die Bestimmung der Virustiter anhand des Plaque Assays. Wie in 3.7 beschrieben wurden MDCK II-Zellen mit einer zehnfach-Verdünnungsreihe infiziert. Die Verdünnungsreihen wurden aus der ersten Fraktion der BAL mit Virusmedium erstellt. Inkubation, Fixierung und Färbung wurden wie in 3.7 beschrieben durchgeführt und die pulmonale Viruslast unter Angabe der PFU/ml ermittelt.

### 3.10.3 Erstellung von Immunfluoreszenzbildern aus Kryo-Lungenschnitten

Mit Hilfe eines Cryotoms (Leica CM 1850 UV, Leica) wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  Schnittpräparate der Lungen mit einer Schnittdicke von  $3\text{-}7\mu\text{m}$  angefertigt. Die Lungenschnitte wurden anschließend auf Objektträger (Langenbrinck) gebracht und für die immunhistochemische Färbung getrocknet. Zur Fixierung wurden  $200\mu\text{l}$  4% Paraformaldehyd (Sigma) in  $\text{PBS}^{\text{Mg}^-/\text{Ca}^-}$  darauf gegeben und für zwanzig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit 10ml Waschpuffer (0,1% BSA (Sigma) + 0,2% Triton X (Triton X 100, Roth) in  $\text{PBS}^{\text{Mg}^-/\text{Ca}^-}$ ) gewaschen. Mit  $100\mu\text{l}$  einer warmen Blockierungs-Lösung mit 20% Pferdeserum (PAA) wurde für dreißig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte erneut ein Waschschriff mit 10ml Waschpuffer. Dann wurden die Primärantikörper in Waschpuffer gelöst in einem Volumen von  $100\mu\text{l}$  aufgetragen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde erneut dreimal gewaschen. Anschließend folgte die Inkubation mit Sekundärantikörpern, ebenfalls in einem Volumen von  $100\mu\text{l}$  in Waschpuffer gelöst. Die Inkubation erfolgte lichtgeschützt für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen wurde das Präparat mit einem Versiegelungsmedium (Vectashield Hard Set with Dapi, Vector) eingedeckt (ca. ein Tropfen) und es wurde ein Deckglas (Deckgläser, Langenbrinck) darauf fixiert. Die Präparate wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop EVOS FL Auto (Thermo Fischer Scientific) analysiert.

Primäre Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
$\alpha$ -mouse-EpCam APC-Cy7 (g8.8)	1:40	Biologend
polyklonales rabbit $\alpha$ -human Pro-Surfactant Protein C (proSP-C)	1:500	Millipore, Temecula, USA
$\alpha$ -Influenza Nucleoprotein (NP) FITC	1:50	Abcam
Dapi		Vector

Sekundäre Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
goat $\alpha$ -rat Alexa555	1:500	Invitrogen
goat $\alpha$ -rabbit Alexa555	1:500	Invitrogen

3.10.4 Erstellung von histologischen Bildern aus Paraffin-Lungenschnitten

Zunächst wurden 4 $\mu$ m dicke Paraffin-Lungenschnitte am Gewebeschnneider LEICA RM2255 (LEICA) angefertigt und auf Objektträger (Langenbrinck) gebracht. Daraufhin wurde anhand eines Protokolls der Firma Merck eine Hämatoxylin & Eosin (H&E) Färbung durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte zuerst für 3 Minuten in Hämatoxylinlösung modifiziert nach Gill III (Merck) gefärbt, danach für 2 Sekunden 0,1% HCl Lösung (Merck) getaucht und anschließend unter fließendem Wasser für 3-5 Minuten gespült, daraufhin erfolgte die Färbung mit 0,1% Erythrosin B-Lösung für 3 Minuten, nach erneutem Spülen in Leitungswasser für dreißig Sekunden erfolgte die Dehydratisierung in aufsteigender Ethanol-Reihe (70%, 96% und 100% Ethanol) für je 30 Sekunden. Zuletzt wurden die Schnitte für 3 Minuten in Xylol inkubiert und mit Neo-Mount® eingedeckt und mit einem Deckglas (Deckgläser, Langenbrinck) fixiert. Die Präparate wurden mit dem Mikroskop EVOS FL Auto (Thermo Fischer Scientific) analysiert.

### 3.11 Analyse der Genexpression

#### 3.11.1 RNA Isolation

Zellen wurden mit PBS<sup>Mg<sup>+</sup>/Ca<sup>+</sup></sup> gewaschen und anschließend mit 350µl RLT-Puffer (Qiagen) lysiert. Danach erfolgte die RNA-Isolation unter Benutzung des RNeasy Mini Kits (Qiagen) entsprechend des Herstellerprotokolls. Qualität und Menge der RNA wurden mit einem NanoDrop One (Thermo Scientific) gemessen. Für die cDNA-Synthese wurde ausschließlich RNA mit einem A<sub>260/280</sub> Verhältnis > 1,9 und < 2,1 verwendet.

#### 3.11.2 cDNA Synthese

Für die Synthese von cDNA wurden 250ng RNA in 13,5µl H<sub>2</sub>O (Water Mol biol grade, 5 Prime GmbH) eingesetzt. Als Enzym wurde die MMLV-Reverse Transkriptase (Invitrogen) verwendet. Die RNA wurde zunächst fünf Minuten auf 70°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Nach Abkühlen der Probe wurden 11,5µl des PCR Mix hinzu pipettiert.

PCR Mix:

5x1st strand buffer (Invitrogen)	5µl
Dithiothreitol (DTT) (Invitrogen)	2,5µl
RNase Inhibitor (RNase Out, Invitrogen)	1µl
dNTPs (Invitrogen)	1µl
random hexamers (Invitrogen)	1,5µl
MMLV-Reverse Transkriptase (Invitrogen)	1µl

In einem Thermocycler (Peqlab) wurden dann die Proben eine Stunde bei 37°C inkubiert und die Enzyme durch Erhitzen auf 97°C für fünf Minuten inaktiviert. Im Anschluss wurde die cDNA im Verhältnis 1:3 mit H<sub>2</sub>O (Water Mol biol grade, 5 Prime GmbH) verdünnt und konnte dann für quantitative real time PCR (qPCR) eingesetzt werden.

### 3.11.3 Real time PCR

Für die quantitative real time PCR (qPCR) wurde der Platinum SYBR Green Super Mix-UDG (Invitrogen) verwendet. Mit dem Step one plus (Applied biosystems) wurden die Reaktionen in einem Volumen von 25µl in 96well-Platten (Applied biosystems) durchgeführt.

#### qPCR Mix

SYBR Green Mix (Invitrogen)	13µl
MgCl <sub>2</sub> (Invitrogen)	1µl
Forward Primer	0,5µl
Reverse Primer	0,5µl
H <sub>2</sub> O (5 Prime GmbH)	5µl
cDNA	5µl

#### PCR Bedingungen:

50°C 2min, 95°C 5min; 45x 95°C 5s, 60°C 5s, 72°C 10s; 72°C 10 min

Das Primerdesign erfolgte mit dem Programm Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Unter Benutzung des BlastN Algorithmus wurden sie auf Spezifität überprüft. Die Spezifität wurde zusätzlich durch Schmelzkurvenanalyse und Auftragen des PCR Produktes auf ein zweiprozentiges Agarosegel validiert. Die verwendeten Primer sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

<b>Gen</b>	<b>Forward Primer</b>	<b>Reverse Primer</b>
murines Aktin	5'-ACCCTAAGGCCAACCGTGGC-3'	5'-CAGAGGCATACAGGGACAGCA-3'
humanes Aktin	5'-CTGGGAGTGGGTGGAGGC-3'	5'-TCAACTGGTCtCAAGTCAGTG-3'
murines IFN-β	5'-ACGTCTCCTGGATGAACTCCA-3'	5'-CAGTTGAGGACATCTCCCACG-3'
humanes IFN-β	5'-CAGCAATTTTCAGTGTGAGAAGC-3'	5'-TCATCCTGTCCTTGAGGCAGT-3'
murines IL-1β	5'-GAAATGCCACCTTTTGACAGTG-3'	5'-TGGATGCTCTCATCAGGACAG-3'

Aktin wurde hierbei als Referenzgen verwendet und die Ergebnisse wurden entweder als delta ( $\Delta$ ) ct angegeben: **Delta ct =  $\Delta$ ct = ct (Referenzgen) - ct (Gen)** oder als jeweiliger Faktor der Hoch- oder Herunterregulierung im Vergleich zu kontrollbehandelten Proben (**Fold Induction**):  **$\Delta\Delta$ ct =  $\Delta$ ct (behandelt) –  $\Delta$ ct (mock)**

**Fold Induction =  $2^{\Delta\Delta$ ct}**

### 3.12 Analyse der Proteinexpression

#### 3.12.1 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Die Konzentrationen von IFN- $\beta$  aus Zellkulturüberständen oder BAL-Überständen wurden mit kommerziellen ELISA Kits (Mouse IFN- $\beta$ : pbl assay science) bestimmt und entsprechend dem Hersteller-Protokoll durchgeführt (Detektionslimit 16 pg/ml). Dazu wurden die Proben und Standards in eine mit einem Antikörper gegen das Protein beschichtete 96well-Platte pipettiert, nach Herstellerangaben inkubiert und nach Herstellerangabe mit einer Eppendorf Multipette gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe eines primären sowie eines sekundären Antikörpers und des Substrates und es wurde schließlich die optische Dichte mit dem iMark™ Microplate Reader (BIO-RAD) bei der im Protokoll angegebenen Wellenlänge gemessen. Durch die Berechnung einer Standardkurve mit Microsoft EXCEL konnte die Konzentration von IFN- $\beta$  in der Probe bestimmt werden.

#### 3.12.2 Bestimmung des Totalproteins (Bradford Assay)

Die Konzentration des Totalproteins aus der BALF wurden nach Herstellerprotokoll unter Benutzung des Dc Protein Assay Kits (BIO-RAD) bei einer Wellenlänge von 750nm mit dem iMark™ Microplate Reader (BIO-RAD) in einer 96well-Platte (BD) bestimmt.

#### 3.12.3 SDS-PAGE und Western Blot

Zur Detektion bestimmter Proteine anhand spezifischer Antikörper werden zunächst die Zellen mit 40 $\mu$ l NP-40 Puffer mit Protease Inhibitor Cocktail (10ml NP-40 plus eine

Tablette “cOmplete Tablets, Mini EASYpack“, Roche) lysiert bei 13000rpm 15 Minuten zentrifugiert. Bei der Detektion von phosphorylierten Proteinen wurde ein Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific) im Verhältnis 1:100 hinzugegeben. Anschließend wurde die Proteinkonzentration der Proben bestimmt (siehe 3.13.2). Nachdem die benötigte Proteinkonzentration und das Volumen berechnet wurden, wurde NuPAGE® LDS Sample Buffer (Invitrogen) im Verhältnis 1:4 zum Gesamtvolumen zur Probe gegeben und die Mischung für 4 Minuten bei 95°C im Thermomixer 5437 (Eppendorf) denaturiert. Die abgekühlten Proben wurden anschließend in Geltaschen eines 10% Mini-PROTEAN® TGX™ Gels (BIO-RAD) aufgetragen, die Auftrennung der Proteine erfolgte für 1 Stunde bei 140V in einer Elektrophorese-Kammer (BIO-RAD). Im Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (BIO-RAD) wurden die Proteine im Gel auf eine 0,2 µm PVDF-Membran (BIO-RAD) transferiert. Nach dem Transfer wurde die Membran 1h in 5% Milch (Difco Skim milk, BD) in PBS<sup>Mg<sup>+</sup>/Ca<sup>+</sup></sup> (Gibco)/0,05% Tween 20 (Sigma) bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blocken. Danach wurden die jeweiligen Primärantikörper in der angegebenen Konzentration (Tabelle unten) in 5% Milch auf die Membran gegeben und bei vorsichtigem Schwenken auf einem Schüttler (Heidolph) 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde danach dreimal 15 Minuten auf einem Schüttler (Heidolph) mit PBS<sup>Mg<sup>+</sup>/Ca<sup>+</sup></sup> (Gibco)/0,05% Tween 20 (Sigma) gewaschen und anschließend mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper 1h inkubiert, wiederum dreimal gewaschen und die Banden durch ein Chemilumineszenzsystem (Clarity™ Western ECL substrate; BIO-RAD) mit dem ChemiDoc™ XRS+ (BIO-RAD) detektiert und die Daten densitometrisch mit der Software Image Lab 5.2.1 (BIO-RAD) ausgewertet.

Antikörper für die Western Blot Analyse

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
<b>Primärantikörper</b>		
Rabbit α-PKR	1:1000	Abcam
Rabbit α-phospho PKR	1:1000	Abcam
Rabbit α-GAPDH	1:1000	Biolegend

<b>Sekundärantikörper</b>		
$\alpha$ -rabbit IgG-HRP	1:3000	Cell signaling

### 3.13 Statistik

Für ungepaarte Proben wurde der ungepaarte studentische T-Test verwendet. Vergleiche mehrerer Versuchsgruppen untereinander wurden mit Hilfe des statistischen Tests ANOVA und Tukey-HSD post-hoc mit dem GraphPad Prism Programm durchgeführt. Alle Daten werden als Mittelwert +/- Standardabweichung präsentiert und ein *p*-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet.

#### 4. Ergebnisse

##### 4.1 Die Mutationen NS1(R35A) und NS1(R46A) führen zu erhöhter Morbidität und Mortalität in PKR-defizienten Mäusen.

Die hier untersuchten Mutanten wurden im Vorfeld *in vitro* analysiert (67). Hier konnte gezeigt werden, dass die Mutanten PR/8 NS1(R35A) und PR/8 NS1(R46A) keine direkte PKR Bindung eingehen können. Bei den Mutanten PR/8 NS1(R38A) und PR/8 NS1(K41A) war die Fähigkeit zur Bindung von PKR auf 55 bis 60 Prozent reduziert im Vergleich zum WT PR/8. Die Fähigkeit zur Bindung von viraler dsRNA war bei PR/8 NS1(K41A) vermindert. Aktivierung von PKR wurde bei den Mutanten PR/8 NS1(R35A) und PR/8 NS1(R46A) beobachtet. Aus der Tabelle 1 können die einzelnen Eigenschaften als Übersicht entnommen werden

PKR wird durch Autophosphorylierung nach Kontakt mit dsRNA aktiviert. Das NS1 Protein ist in der Lage durch Bindung an die dsRNA, diese zu maskieren und auf diese Weise die PKR Aktivierung zu verhindern. Ein weiterer Effekt konnte nach Infektion gezeigt werden: PR/8 NS1(R35A) und PR/8 NS1(R46A) waren schwache IFN Induktoren vergleichbar mit dem WT PR/8. Im Gegensatz dazu zeigten sich hohe IFN-beta Level 24 Stunden nach Infektion mit PR/8 NS1(R38A) und PR/8 NS1(K41A) in A549 Zellen. Schierhorn *et al* untersuchte die Effekte unter isolierten Laborbedingungen in Zellkulturzellen, es stellte sich daher die Frage, ob diese Effekte im komplexen lebenden Organismus ebenfalls Gültigkeit haben.

Um diese Erkenntnisse *in vivo* zu validieren, wurden C57Bl6/J Wildtyp-Mäuse (WT-Mäuse) und PKR-knockout Mäuse (PKR<sup>-/-</sup>-Mäuse) mit einem PR8-Wildtyp Virus (PR8/WT) sowie mit den vier Mutanten NS1(R35A), NS1(R38A), NS1(K41A) und NS1(R46A) orotracheal infiziert und im Verlauf von 21 Tagen nach Infektion wurden Überleben, Körpergewicht sowie Morbiditätsscores in Punkten ermittelt (Abb. 7).

Aus Abbildung 7A wird ersichtlich, dass die Infektion mit dem PR8/WT Virus für WT-Mäuse sowie für PKR<sup>-/-</sup>-Mäuse zu neunzig Prozent letal verlief. WT-Mäuse, die mit den Mutanten infiziert wurden, überlebten zu hundert Prozent. Die Infektion mit PR8 NS1(R35A) und PR8 NS1(R46A) überlebten nur 12,5 Prozent der PKR<sup>-/-</sup>-Mäuse

## Ergebnisse

wohingegen die Infektion mit PR8 NS1(R38A) und PR8 NS1(K41A) in PKR<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht letal verlief. Die 50 Prozent Überlebensrate war bei den WT-Mäusen nach Infektion mit PR/8 WT an Tag 14 erreicht, PKR<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten 50 Prozent Überleben an Tag acht nach Infektion mit PR/8 WT. Des Weiteren lag die 50-Prozent-Überlebensrate bei PKR<sup>-/-</sup>-Mäusen nach Infektion mit PR/8 NS1(R35A) an Tag neun und nach Infektion mit PR8 NS1(R46A) an Tag acht. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass die antivirale Kinase PKR entscheidend für das Überleben der Infektion mit PR8 NS1(R35A) und PR8 NS1(R46A) ist, bzw. dass die Aminosäuren R35 und R46 im NS1 Protein PKR-abhängige Funktionen vermitteln, die das Outcome einer IAV-Infektion *in vivo* beeinflussen, analog zu den *in vitro* Daten (67).

## Ergebnisse

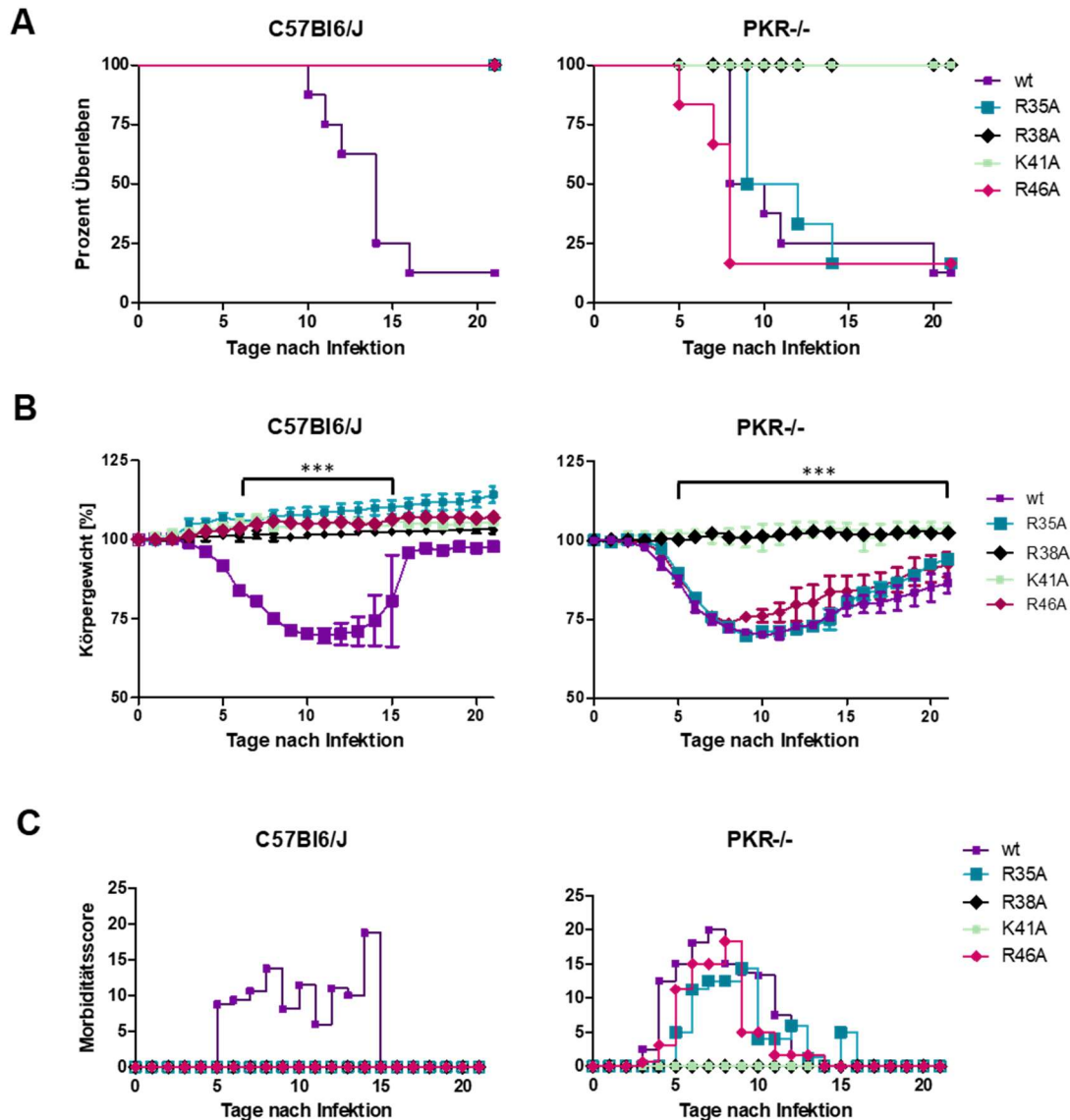


ABBILDUNG 7: ÜBERLEBEN, KÖRPERGEWICHT UND MORBIDITÄTSSCORE *IN VIVO*

Virulenz von rekombinanten Influenza A Viren in WT- und PKR<sup>-/-</sup>-Mäusen. (A-C) Gruppen aus jeweils sieben (für NS1(K41A) bzw. acht (für PR8 WT, NS1(R35A), NS1(R38A) und NS1(R46A)) WT- und PKR<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden mit  $1 \times 10^2$  PFU des WT Virus und der genannten Mutanten orotracheal infiziert und für 21 Tage täglich visitiert. (A) Überlebenskurven von WT- und PKR<sup>-/-</sup>-Mäusen bis 21 Tage nach Infektion. Mäuse wurden nach Erreichen von  $\geq 20$  Morbiditätsscore-Punkten einschließlich klinischer Parameter wie Gewichtsverlust, stumpfes Fell, Hypothermie, eingefallene Augen, verminderte Aktivität und Tachypnoe euthanasiert. (B) Gewichtskurven von WT- und PKR<sup>-/-</sup>-Mäusen nach Infektion. WT- und PKR<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden für 21 Tage jeden Tag zur selben Uhrzeit gewogen. Die Statistik bezieht sich bei den C57Bl6/J auf alle transgenen Viren im Vergleich zum WT-Virus. Die Statistik bezieht sich bei den PKR<sup>-/-</sup>-Mäusen auf die transgenen Viren NS1(R38A) und für NS1(K41A) im Vergleich zum WT-Virus. (C) Morbiditätsscores von WT- und PKR<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden anhand von vorgegebenen Kriterien (Körpergewicht, Allgemeinzustand, Spontanverhalten und Versuchsspezifische Kriterien) ermittelt. Die Mäuse wurden jeden Tag für 21 Tage visitiert und nach den genannten Kriterien beurteilt, bei einem Gesamtscore von  $\geq 10$  Punkten erfolgte die Beurteilung 2-3-mal täglich (angegeben ist der Mittelwert). PFU = plaque forming units. Abbildung aus Schierhorn *et al* (67). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

## Ergebnisse

Der Gewichtsverlust bei Mäusen ist ein wichtiger Indikator für den Gesundheitszustand, deswegen eignet sich dieser objektive Parameter hervorragend, um den Krankheitsverlauf nach Infektion zu beschreiben. WT-Mäuse zeigten einen Verlust von bis zu dreißig Prozent des Körpergewichts nach PR8/WT Infektion, nach Infektion mit den Mutanten blieb eine Reduktion des Körpergewichts komplett aus. PKR<sup>-/-</sup>-Mäuse wiesen eine Reduktion des Körpergewichts nach Infektion mit PR8/WT, PR8 NS1(R35A) und PR8 NS1(R46A) von bis zu dreißig Prozent auf (Abb. 7B). Der Gewichtsverlust begann von Tag 3 auf Tag 4 nach der Infektion mit PR/8 WT in WT-Mäusen und PKR<sup>-/-</sup>-Mäusen. Zum selben Zeitpunkt war eine erste Gewichtsreduktion in PKR<sup>-/-</sup>-Mäusen festzustellen, die mit den Mutanten PR8 NS1(R35A) und PR8 NS1(R46A) infiziert waren. In WT-Mäusen war ein progredienter Gewichtsverlust bis Tag neun nach Infektion mit PR/8 WT feststellbar, von Tag neun bis Tag fünfzehn nach Infektion blieb das Körpergewicht stabil bei unter 75 Prozent des Ausgangsgewichts, wobei der Tiefpunkt mit 70 Prozent am elften Tag erreicht war. Am dreizehnten Tag nach der Infektion stieg die Gewichtskurve bei den überlebenden Tieren steil an und erreichte ein fast konstantes Gewicht von 96 bis 97 Prozent des Ausgangsgewichts an den Tagen sechzehn bis einundzwanzig (Versuchsende). PKR<sup>-/-</sup>-Mäuse haben nach Infektion mit PR/8 WT und PR8 NS1(R35A) eine Gewichtsreduktion von Tag drei auf Tag vier entwickelt. Bis Tag acht verlief die Gewichtskurve sehr steil nach unten bis an Tag neun ein durchschnittliches Körpergewicht von 70 Prozent des Ausgangsgewichts erreicht war. Von Tag zehn an stieg das Gewicht wieder langsam an, die Mäuse erreichten jedoch bis zum Versuchsende an Tag einundzwanzig nur 86 Prozent des Ausgangsgewichts nach Infektion mit PR/8 WT und 94 Prozent nach Infektion mit PR/8 NS1(R35A). Nach Infektion mit PR/8 NS1(R46A) verlief die Gewichtskurve bis Tag acht nahezu identisch wie nach Infektion mit PR/8 WT und PR8 NS1(R35A), jedoch stieg die Gewichtskurve ab Tag neun nach Infektion wieder langsam an, ohne dass sie zum Versuchsende das Ausgangsgewicht erreicht haben, es betrug am Tag einundzwanzig 92 Prozent. Abb. 7C zeigt die ermittelten Morbiditätsscores nach Infektion, dazu wurden die Mäuse 21 Tage nach Infektion mit (PR8/WT) sowie mit den Mutanten NS1(R35A), NS1(R38A), NS1(K41A) und NS1(R46A) täglich visitiert und nach einem Schema die jeweiligen Belastungskriterien erhoben und als Punkte in einem Gesamtscore summiert. Die Vergabe Morbiditätsscores verlief wie in 3.9.2 beschrieben. Positive Scores ergaben sich nach Infektion von WT-Mäusen mit PR/8 WT von Tag 5 bis Tag 15. Die Infektion mit allen vier Mutanten verlief in WT-Mäusen symptomlos,

## Ergebnisse

deshalb wurden sie durchweg mit null Punkten bewertet. PKR<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden bereits am dritten Tag nach der Infektion mit PR/8 WT mit durchschnittlich fünf Punkten bewertet, sie erreichten den Höhepunkt mit zwanzig Punkten zwischen Tag sieben und Tag acht nach Infektion, anschließend sank die Kurve bis Tag zwölf ab. Nach Infektion der PKR<sup>-/-</sup>-Mäuse mit PR/8 NS1(R46A) begann die positive Bewertung am vierten Tag mit durchschnittlich fünf Punkten, erreichte zwischen Tag acht und neun einen Peak von 18,75 Punkten im Mittelwert und fiel im Verlauf am Tag vierzehn wieder auf null ab. Bei PKR<sup>-/-</sup>-Mäusen, die mit PR8 NS1(R35A) infiziert wurden, beobachtete man einen ersten Anstieg der Score Punkte am fünften Tag nach Infektion, wobei der Höhepunkt mit durchschnittlich fünfzehn Punkten am neunten Tag erreicht wurde. Die Beurteilung verlief, mit Ausnahme von Tag vierzehn, bis zum sechzehnten Tag nach Infektion positiv zwischen 3,75 und 7,25 Punkten durchschnittlich. Infektionen mit den Mutanten PR/8 NS1(R38A) und PR/8 NS1(K41A) verliefen symptomlos und klinisch unauffällig in für PKR<sup>-/-</sup>-Mäusen, sodass diese durchweg bis Tag 21 mit null Punkten beurteilt wurden. Zusammenfassend kann man sagen, dass Arginin in den Aminosäurepositionen 35 und 46 im NS1 Protein ausschlaggebend für die Mortalität und die Morbidität von WT-Mäusen nach Infektion waren und dies abhängig von PKR war, ferner wurde die Infektion mit den Mutanten NS1(R38A) und NS1(K41A) von beiden Maus-Linien zu hundert Prozent symptomlos überlebt. Somit konnte im *in vivo* Modell die in den vorbeschriebenen *in vitro* Daten ermittelte Rolle des NS1 Proteins (Position 35 und 46) in der Inhibition der antiviralen Funktion der PKR untermauert werden.

### 4.2 Viruslast und PKR abhängige Unterschiede der IFN- $\beta$ Spiegel nach Infektion

Das Influenza A Virus NS1 ist imstande, die Replikation des Virus durch Hemmung antiviraler Proteine in der Zelle zu verbessern. Um die Viruslast des PR/8 WT und der Mutanten *in vivo* zu adressieren, wurde die Bestimmung der Virustiter herangezogen. Dazu wurden WT-Mäuse und PKR<sup>-/-</sup>-Mäuse mit den jeweiligen Viren infiziert und an den Tagen drei, fünf und sieben aus den gewonnenen BAL-Überständen anhand des Plaque Assay die Virustiter bestimmt. Abbildung 8 zeigt repräsentative Aufnahmen des Plaque Assays der unterschiedlichen Mutanten. Die Ergebnisse zeigen einen deutlichen

## Ergebnisse

Unterschied der viralen Titer, zum einen im Vergleich der Mutanten zum PR/8 WT in WT-Mäusen, zum anderen in Hinsicht auf die PKR abhängigen Mutanten PR/8 NS1(R35A) und PR8 NS1(R46A) in PKR<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen. Es zeigt sich eine deutliche Attenuierung aller Mutanten nach Infektion von WT-Mäusen. Nach Infektion von WT-Mäusen mit PR/8 WT wurden hohe Virustiter an den Tagen 3 und 5 gemessen, am siebten Tag viel der Titer ab. Nach Infektion mit den Mutanten konnten, außer bei PR8 NS1(R46A) an Tag 3, keine Viruspartikel nachgewiesen werden.

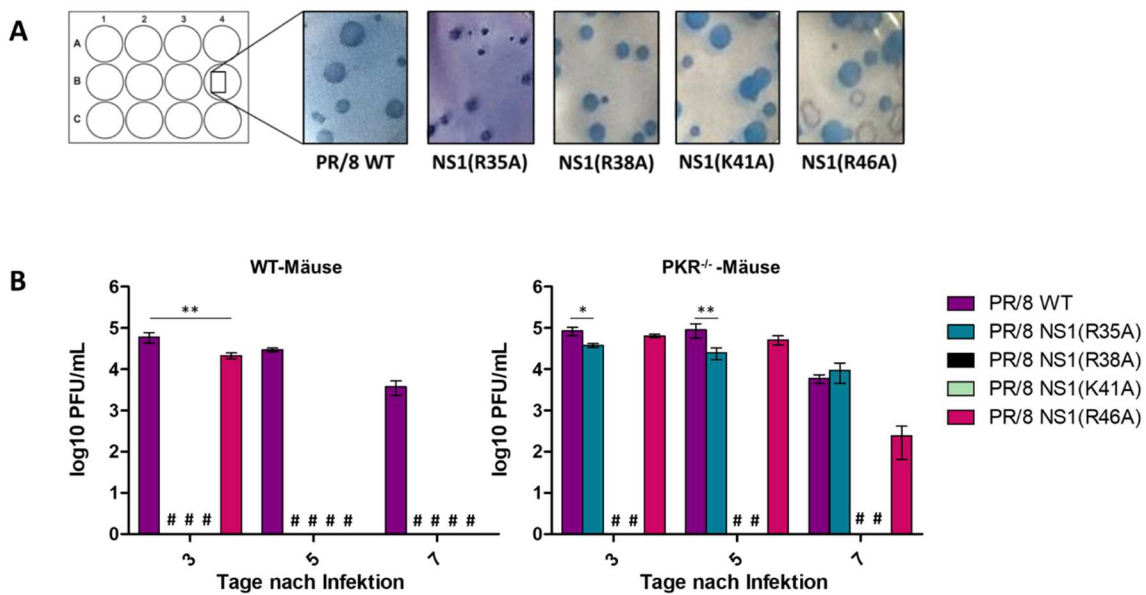


ABBILDUNG 8: BESTIMMUNG DER VIRUSLAST

(A) Repräsentative Aufnahmen von IV Plaques von PR/8 WT und der jeweiligen Mutanten. 12-Well Platte Vorlage von [www.cellsignet.com](http://www.cellsignet.com). (B) An den Tagen 3,5 und 7 dpi wurden BAL Überstände von WT- und PKR<sup>-/-</sup>-Mäusen (n=3-6) BALF anhand eines Plaque Assays quantifiziert und in pfu/ml x log<sub>10</sub> angegeben (Detektionsgrenze 10<sup>1</sup>pfu/ml x log<sub>10</sub>). PFU = plaque forming units. Die Balkendiagramme zeigen jeweils Mittelwerte ± SD, # = nicht detektierbar. \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\*p<0,001. (67)

In PKR<sup>-/-</sup>-Mäusen konnten auch mit diesen Ergebnissen die Aminosäure-Positionen 35 und 46 der RBD des NS1 Proteins als PKR abhängig verifiziert werden. PKR-Defizienz erwies sich somit als vorteilhaft bei der Virus Replikation der Mutanten PR/8 NS1(R35A) und PR/8 NS1(R46A) *in vivo*. Nach Infektion mit den Mutanten PR/8 NS1(R38A) und PR/8 NS1(K41A) konnte in PKR<sup>-/-</sup>-Mäusen keine Virusvermehrung nachgewiesen werden, diese Mutanten waren gleichermaßen attenuiert wie in WT-Mäusen.

## Ergebnisse

*In vitro* Daten ergaben, dass die Replikation der Mutanten PR/8 NS1(R35A) und PR/8 NS1(R46A) in A549-Zellen PKR abhängig eingeschränkt war, wohingegen die Mutanten PR/8 NS1(R38A) und PR/8 NS1(K41A) auch PKR-unabhängig replikationsfähig waren (siehe Tabelle 1 und (67)). *In vivo* zeigte sich jedoch, dass die Mutanten PR/8 NS1(R38A) und PR/8 NS1(K41A) in WT-Mäusen und in PKR<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht replizierten. Diese Daten legen eine große Relevanz der NS1-abhängigen Blockade der PKR-Aktivierung, vermittelt über die Bindung durch Aminosäurepositionen 35 und 46 im Infektionsgeschehen und der viralen Replikation nahe.

Typ I Interferone gehören zu den proinflammatorischen Zytokinen, deren Hochregulierung unverzüglich nach Erkennung von viralen Pathogenen in der Zelle initiiert wird. Viele Signalwege führen zur Transkription proinflammatorischer Gene, sowie zu deren Sekretion aus der Zelle. Ein zentraler Ligand bei der Einleitung der Immunantwort ist virale dsRNA. Die Zelle weist unterschiedliche Sensoren für virale dsRNA auf, zu nennen sind RIG-I, MDA5, TLR3, TLR10 und PKR (70) (71) (72) (73). Im Folgenden wurde untersucht, inwiefern sich PKR-Defizienz in Mäusen auf die Ausschüttung von Interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) auswirkt und ob ein Unterschied in Hinsicht auf die jeweiligen Mutanten gegeben ist. In Abbildung 9 ist die Ausschüttung von IFN- $\beta$  auf Proteinebene dargestellt. Zur Analyse wurden BAL Überstände 3 Tage nach Infektion mit den jeweiligen Viren von WT- und PKR<sup>-/-</sup>-Mäusen gewonnen nach und unter Verwendung eines ELISA ausgewertet. Als Kontrolle dienten Proben von mock-infizierten Mäusen der gleichen Zeitpunkte.

## Ergebnisse

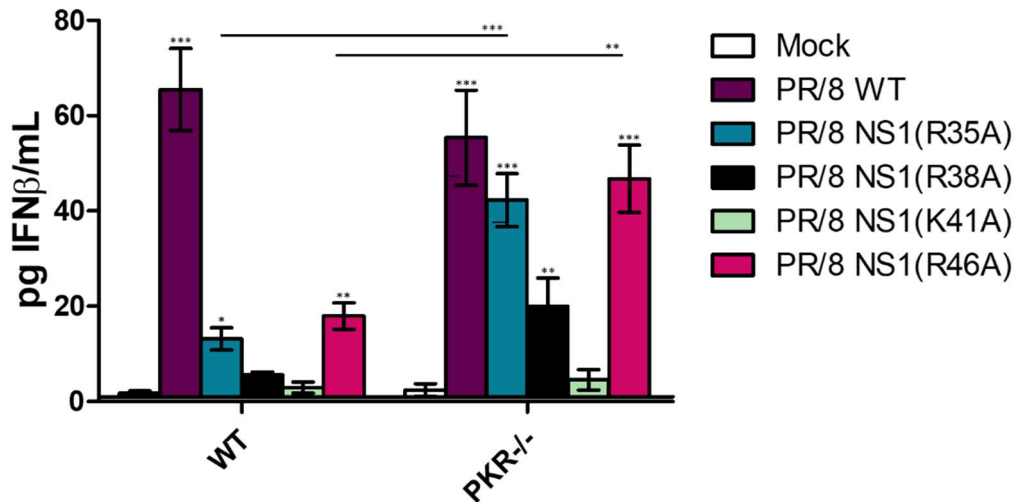


ABBILDUNG 9: INTERFERON- $\beta$  SPIEGEL IN BAL ÜBERSTÄNDEN

WT und PKR<sup>-/-</sup> Mäuse (n=3-6) wurden mit 100pfu des PR/8 WT und den jeweiligen Mutanten infiziert und die IFN- $\beta$  Konzentrationen wurden nach 3 Tagen in den zellfreien Überständen der bronchoalveolären Lavagen gemessen. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert  $\pm$  SD. \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\*p<0,001.

Am dritten Tag nach orotrachealer Infektion ist der Höhepunkt der Virusreplikation erreicht. Um den Zusammenhang zwischen Virusreplikation und IFN- $\beta$  Ausschüttung zu zeigen, wurde dieser Zeitpunkt gewählt. Nach Infektion mit PR/8 WT lassen sich in beiden Mauslinien hohe IFN- $\beta$  Konzentrationen nachweisen. In WT-Mäusen wird nach Infektion mit den Mutanten PR/8 NS1(R35A) und PR/8 NS1(R46A) eine Erhöhung der IFN- $\beta$  Spiegel sichtbar, welche jedoch weit unter dem des PR/8 WT sind. Nach Infektion mit den Mutanten PR/8 NS1(R38A) und PR/8 NS1(K41A) konnte keine signifikant höhere Ausschüttung von IFN- $\beta$  im Vergleich zu mock-infizierten Mäusen gemessen werden. In den BAL Überständen von PKR<sup>-/-</sup>-Mäusen stiegen die IFN- $\beta$  Konzentrationen nach Infektion mit PR/8 WT, PR/8 NS1(R35A) und PR/8 NS1(R46A) auf das Vielfache der mock-infizierten Tiere an. Generell ist zu erkennen, dass die IFN- $\beta$  Spiegel mit den Entzündungsparametern korrelieren, so ist eine vermehrte Ausschüttung von IFN- $\beta$  nach Infektion mit PR/8 WT in den BAL-Überständen beider Mauslinien zu erkennen.

### 4.3 Rolle der NS1-Mutanten auf die Rekrutierung von Leukozyten

Wie bereits in der Einleitung 1.5 beschrieben, spielt die Rekrutierung von Leukozyten eine wichtige Rolle, um die Infektion einzudämmen. Im Folgenden stellte sich die Frage, ob es einen Unterschied im Rekrutierungsverhalten nach Infektion mit den Mutanten PR/8 NS1(R35A), PR/8 NS1(R38A), PR/8 NS1(K41A) und PR/8 NS1(R46A) im Vergleich zum PR/8 WT gibt und ob dies PKR-abhängig geschieht. Um diese Frage zu beantworten, wurden WT-Mäuse und PKR<sup>-/-</sup>-Mäuse mit 100 pfu des PR/8 WT und der jeweiligen Mutanten orotracheal infiziert und an den Tagen drei, fünf und sieben nach Infektion eine BAL der Mauslungen durchgeführt. Als Referenz dienten BALs aus mock-infizierten Mäusen der gleichen Zeitpunkte. Die gewonnenen BALs wurden nach Protokoll (3.9.4) prozessiert. Anhand Abb. 10 ist zu erkennen, dass WT-Mäuse eine starke Erhöhung der Gesamtzellzahl am fünften und am siebten Tag nach Infektion mit PR/8 WT aufweisen. Am dritten Tag nach der Infektion ist die Gesamtzellzahl vergleichbar mit der nicht-infizierten Gruppe. Die Infektion von WT-Mäusen mit den Mutanten PR/8 NS1(R35A), PR/8 NS1(R38A), PR/8 NS1(K41A) und PR/8 NS1(R46A) führte zu keiner signifikanten Leukozytenrekrutierung in die Lunge. In PKR<sup>-/-</sup>-Mäusen war die Erhöhung der Gesamtzellzahl nach Infektion mit PR/8 WT am fünften Tag besonders ausgeprägt. Nach Infektion von PKR<sup>-/-</sup>-Mäusen mit der Mutante PR/8 NS1(R35A) zeigte sich an den Zeitpunkten fünf und sieben eine signifikante Erhöhung der Gesamtzellzahl in der BAL im Vergleich zu mock-infizierten PKR<sup>-/-</sup>-Mäusen. Die Infektion mit PR/8 NS1(R46A) führte in PKR<sup>-/-</sup>-Mäusen bereits am dritten Tag zum Anstieg der Gesamtzellzahl, am fünften Tag war der Höhepunkt erreicht und ein rückläufiges Bild zeigte sich an Tag sieben nach Infektion. Keine signifikante Veränderung der Gesamtzellzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich an den Zeitpunkten drei, fünf und sieben nach Infektion mit den Mutanten PR/8 NS1(R38A) und PR/8 NS1(K41A) in den BALs von PKR<sup>-/-</sup>-Mäusen.

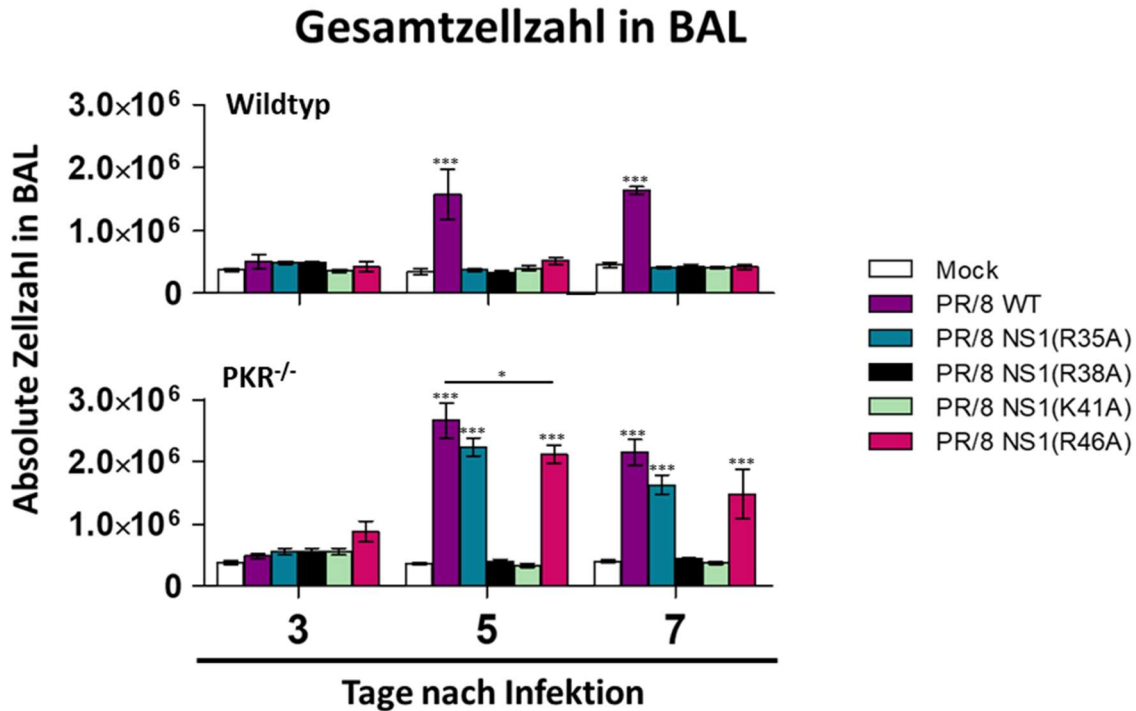


ABBILDUNG 10: ZELLINFILTRATION NACH INFEKTION

Bestimmung der Gesamtzellzahl aus der BAL (n=3-5) an Tag 3, 5 und 7 nach PR8-WT und Mutanten Infektion von WT- und PKR<sup>-/-</sup>-Mäusen. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert ± SD.

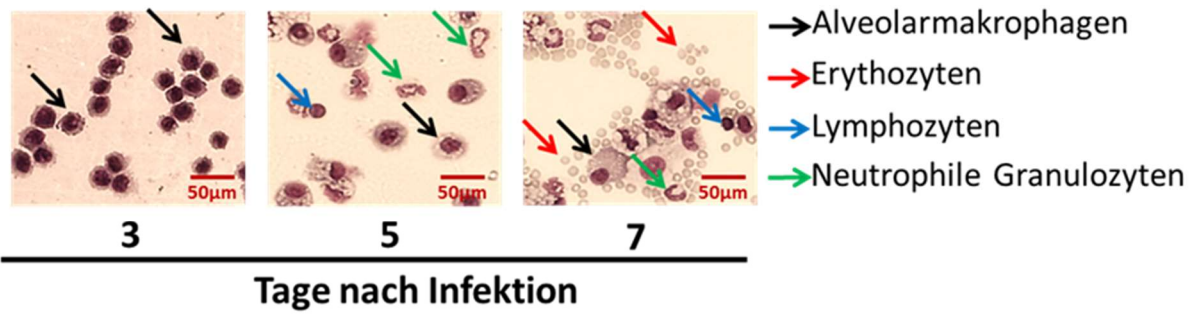
\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\*p<0,001.

Die Zellzahl-Erhöhung in der BAL ist ein guter Indikator für entzündliche Prozesse in der Lunge. Um zu eruieren, welche Leukozytenpopulationen zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion rekrutiert wurden, führte man eine Differentialzytologie der BAL anhand von Pappenheim-gefärbten Zytozentrifugenpräparaten durch. In Abb. 11 A und B ist die Verteilung der einzelnen Zellpopulationen dargestellt, gezeigt sind die jeweiligen Zellpopulationen fünf Tage nach Infektion mit PR/8 WT und den jeweiligen Mutanten PR/8 NS1(R35A), PR/8 NS1(R38A), PR/8 NS1(K41A) und PR/8 NS1(R46A). An diesem Zeitpunkt ist der größte Unterschied zwischen den WT- und PKR<sup>-/-</sup>-Mäusen erkennbar. Die Durchführung der Zytozentrifugenpräparate schließt sich an die Bestimmung der Gesamtzellzahl in der BAL an, wie in 3.9.4 beschrieben. Eine BAL, gewonnen aus einer gesunden Mauslunge, besteht zu fünfundneunzig bis einhundert Prozent aus Alveolarmakrophagen (AM), die Absolutzellzahl beträgt dabei 250.000 bis 450.000 Zellen pro BAL. Mock-infizierte WT- und PKR<sup>-/-</sup>-Mäuse wiesen eine vergleichbare Zellzahl und Zusammensetzung in der BAL an den Tagen drei, fünf und sieben auf. Drei Tage nach Infektion mit PR/8 WT zeigte sich eine minimale

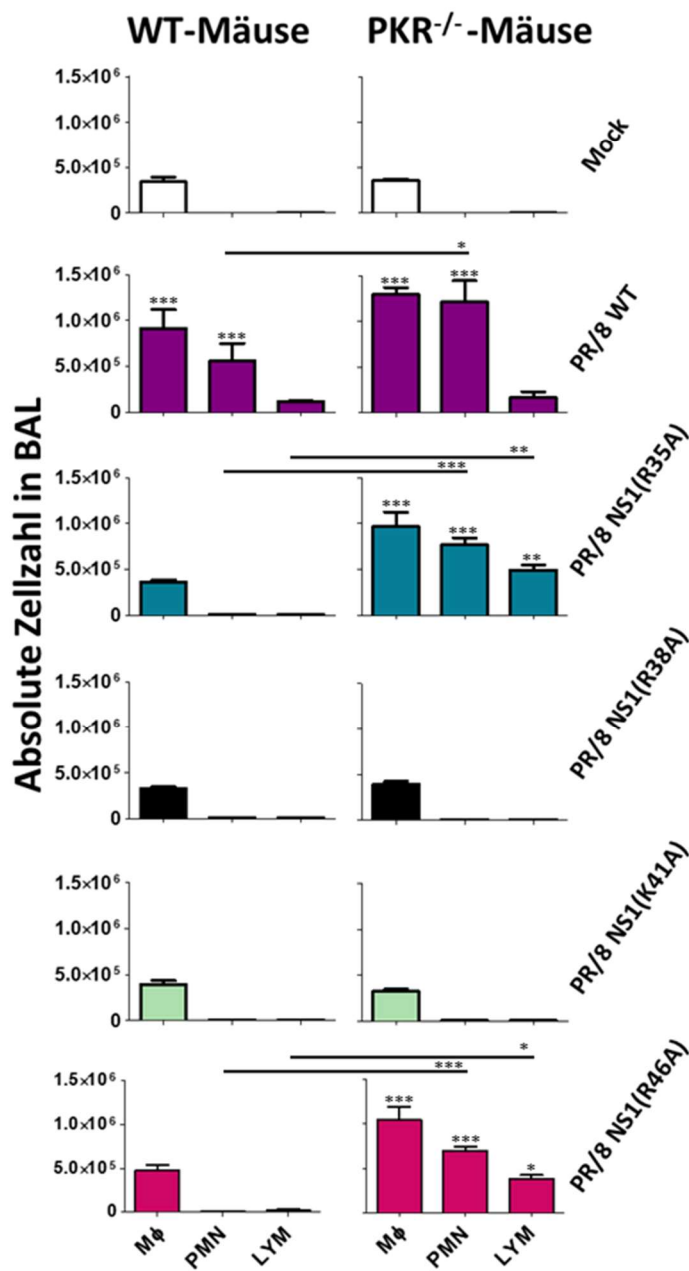
## Ergebnisse

Erhöhung der Zellzahl insgesamt in WT- und PKR<sup>-/-</sup>-Mäusen sowie ein leichter Influx von neutrophilen Granulozyten in PKR<sup>-/-</sup>-Mäusen (Daten nicht gezeigt). Am fünften Tag nach Infektion mit PR/8 WT zeigt sich eine deutliche Zellzahl-Erhöhung in der BAL beider Mauslinien, zu diesem Zeitpunkt bestehen die Zellpopulationen überwiegend aus Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten. Hierbei zeigt sich, dass die absoluten Zellzahlen der einzelnen Populationen in der BAL von PKR<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen deutlich erhöht sind. An Tag sieben nach Infektion mit PR/8 WT gleichen sich die absoluten Zellzahlen der jeweiligen Populationen beider Mauslinien einander an, es finden sich darüber hinaus vermehrt Erythrozyten in der BAL, wie Abb. 11A Tag 7 zeigt. Nach Infektion mit PR/8 NS1(R35A) ändert sich die Zusammensetzung der Zellen in der BAL der WT-Mäuse an allen drei definierten Zeitpunkten kaum. Im Vergleich dazu bietet sich in PKR<sup>-/-</sup>-Mäusen ein anderes Bild: am dritten Tag nach Infektion ist noch keine Änderung zu mock-infizierten PKR<sup>-/-</sup>-Mäusen ersichtlich, jedoch zeigt sich im Verlauf an den Tagen fünf und sieben eine starke Zellzahlerhöhung mit verhältnismäßig vielen neutrophilen Granulozyten, wobei sich an Tag sieben die Zusammensetzung der BAL-Zellen in Richtung der Lymphozyten verschiebt, Makrophagen sind zu diesem Zeitpunkt mit knapp dreißig Prozent vertreten (Tag 7 Daten nicht gezeigt).

### A Zytozentrifugenpräparate der BAL-Zellen



### B



## Ergebnisse

### ABBILDUNG 11: DIFFERENTIALZYTOLOGIE VON BAL AM 5. TAG NACH INFEKTION

(A) Repräsentative Aufnahmen von zytologischen BAL-Präparaten nach Pappenheim Färbung von WT-Mäusen infiziert mit PR/8 WT an 3, 5 und 7 Tage nach Infektion. 40-fache Vergrößerung. (B) Zytozentrifugen-Präparate der BAL 5 Tage nach Infektion wurden angefertigt und nach Pappenheim Färbung mikroskopisch analysiert. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert  $\pm$  SD. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . M $\phi$ =Makrophagen, PMN=polymorphkerniger Leukozyt, LYM=Lymphozyten.

Nach Infektion mit den Mutanten PR/8 NS1(R38A) und PR/8 NS1(K41A) zeigte sich keine relevante Veränderung in beiden Mauslinien an allen drei Zeitpunkten. Nach Infektion mit PR/8 NS1(R46A) blieb eine Veränderung der Verteilung der BAL-Zellen in WT-Mäusen aus, PKR<sup>-/-</sup>-Mäuse allerdings zeigten eine deutliche Leukozytenrekrutierung: am dritten Tag nach Infektion zeigte sich bereits ein Influx von neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten, welcher sich über Tag fünf bis Tag sieben verstärkte (Tag 3 und 7 nicht gezeigt).

Diese Daten belegen, dass die Mutationen R35A und R46A in WT-Mäusen, aber nicht in PKT-defizienten Mäusen attenuiert im Hinblick auf die inflammatorische Antwort einer IV-Infektion wirken.

#### 4.4 Histopathologie der Lunge im Verlauf der IV-Infektion und Analyse der alveolären Barrierefunktion zeigen vermehrten Lungenschaden in PKR<sup>-/-</sup>-Mäusen nach Infektion mit PR8 NS1(R35A) und PR8 NS1(R46A) im Vergleich zu WT-Mäusen.

Da die Expansion der Zellzahlen in der BAL von PKR<sup>-/-</sup>-Mäusen nach Infektion mit den Mutanten PR8 NS1(R35A) und PR8 NS1(R46A) sich deutlich von denen in WT-Mäusen unterschied, wurde im Folgenden untersucht, ob weitere Parameter Veränderungen aufweisen. Bekannt ist, dass Alveolarmakrophagen nach IV-Infektion das proinflammatorische Zytokin IFN- $\beta$  ausschütten (75). Im Zusammenhang mit IV-Infektion erfolgt die Sekretion von IFN- $\beta$  abhängig vom PKR/NF $\kappa$ B Signalweg (75). Des Weiteren bewirkt die autokrine Stimulation von IFN- $\beta$  am Typ I Interferonrezeptor

## Ergebnisse

(IFNAR) der Alveolarmakrophagen eine Hochregulierung und vermehrte Abgabe von TRAIL (Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand). TRAIL bindet am TRAIL-Rezeptor von Alveolarepithelzellen, die daraufhin apoptotisch zugrunde gehen und damit maßgeblich die epitheliale Barriereintegrität herabsetzen (75). Um den Lungenschaden zu adressieren, wurde die alveoläre Leakage bestimmt, diese eignet sich hervorragend, um die Integrität der Luft-Blut-Schranke darzustellen. Hierzu wurde FITC-markiertes Albumin verwendet. Albumin ist ein Plasmaprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 66 kDa, durch seine Größe und seine negative Ladung ist es nicht in Lage, unter physiologischen Bedingungen aus dem Blutkreislauf in den Alveolarraum überzutreten, liegt jedoch ein Barrierschaden vor, kann das FITC-Albumin in die Alveolen gelangen und durch die Messung der Fluoreszenzintensität im BAL Überstand detektiert werden. Die Lungen-Histologie eignet sich ebenfalls besonders gut, um einen Lungenschaden sichtbar zu machen. Durch die Färbung mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) wird die Anreicherung von Leukozyten sowie die Ödemausbildung im Lungengewebe ersichtlich.

### Verlauf Influenza Infektion

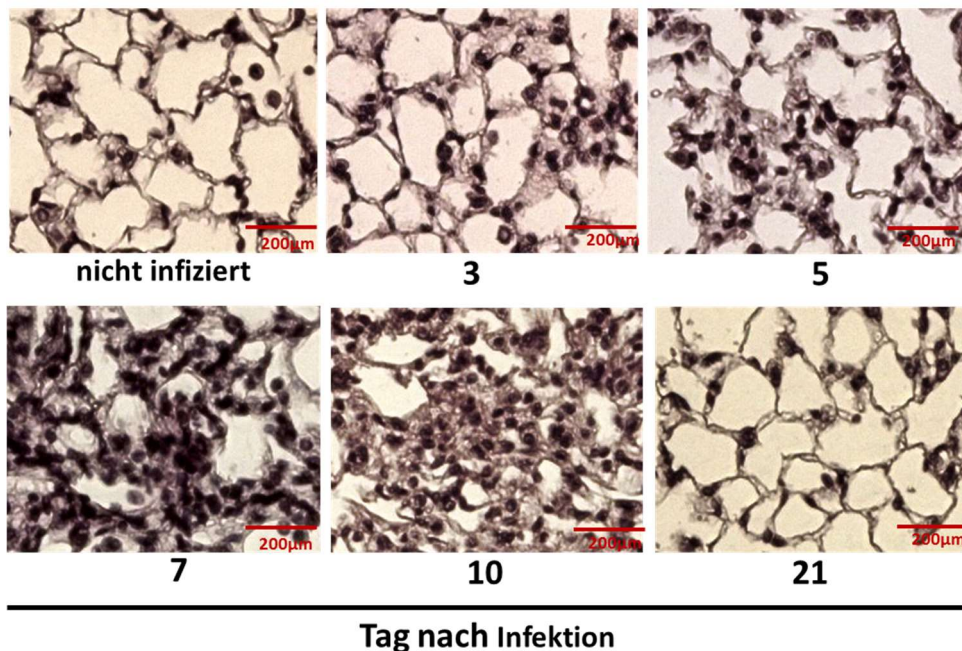


ABBILDUNG 12: PARAFFIN LUNGENSCHNITTE AN VERSCHIEDEN ZEITPUNKTEN NACH INFEKTION

Repräsentative Aufnahmen von Paraffin Lungenschnitten zur Verdeutlichung der Veränderungen nach Infektion mit PR/8. Lungen von WT-Mäusen (n=3) wurden fixiert, in Paraffin eingebettet und 4µm dicke

## Ergebnisse

Schnitte wurden angefertigt. Nach Hämatoxylin und Eosin Färbung wurden mikroskopische Aufnahmen gemacht. Vergrößerung 40x.

In Abbildung 13 wird ein typischer Infektionsverlauf nach PR8/WT Virus Infektion histologisch dargestellt. Die Aufnahmen von H&E gefärbten Paraffinlungen-Schnitten im zeitlichen Verlauf nach Infektion stellen deren Auswirkungen auf alveolärer Ebene bildlich dar. Das native Lungenparenchym weist eine zarte Architektur der Alveolenwände auf, Alveolarmakrophagen sind im Alveolarraum zu sehen. 3 Tage nach Infektion ist der Höhepunkt der Virusreplikation erreicht, mikroskopisch sieht man keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu nicht infizierten Lungen. Am fünften Tag konnte eine Zunahme von Immunzellen im Lungenparenchym objektiviert werden. Nach 7 Tagen zeigte sich ein Progress der Infiltrierung in den Alveolen durch Leukozyten gezeigt. 10 Tage nach Infektion stellten sich weiterhin entzündliche Infiltrate im Lungengewebe dar. Die Regeneration des Lungengewebes nach durchgemachter IV-Infektion funktioniert zur Restitutio ad Integrum, wie Tag 21 in Abbildung 12 zeigt.

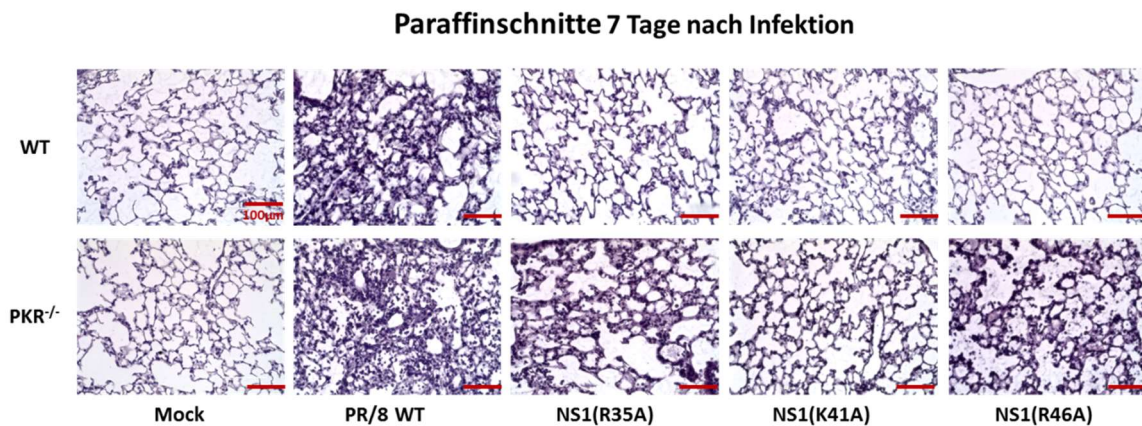


ABBILDUNG 13: LUNGENSCHADEN ANHAND VON HISTOLOGISCHEN AUFNAHMEN

Mauslungen (n=3) wurden 7 dpi mit PR/8 WT und den jeweiligen Mutanten (PR/8 NS1(R38A) morphologisch vergleichbar mit K41A, nicht abgebildet) entnommen, fixiert und in Paraffin eingebettet. 4µm dicke Schnitte wurden angefertigt, mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt und mikroskopische Aufnahmen in 20x Vergrößerung erzeugt. (67)

## Ergebnisse

In Abb. 13 wird ersichtlich, dass nach Infektion mit PR/8 WT eine ausgeprägte Inflammation in WT- sowie  $PKR^{-/-}$ -Mäusen zu verzeichnen ist, wobei sich diese im Verlauf in  $PKR^{-/-}$ -Mäusen tendenziell früher entwickelt. Die Infektion mit den Mutanten PR/8 NS1(R38A), PR/8 NS1(K41A) hat in beiden Mauslinien und zu allen Zeitpunkten keinen Einfluss auf die alveoläre Präsenz bzw. Akkumulation von Leukozyten, die Werte der gemessenen Leakage in Abb. 14 sowie die histologischen Befunde waren mit den der Kontroll-Mäuse vergleichbar unauffällig.

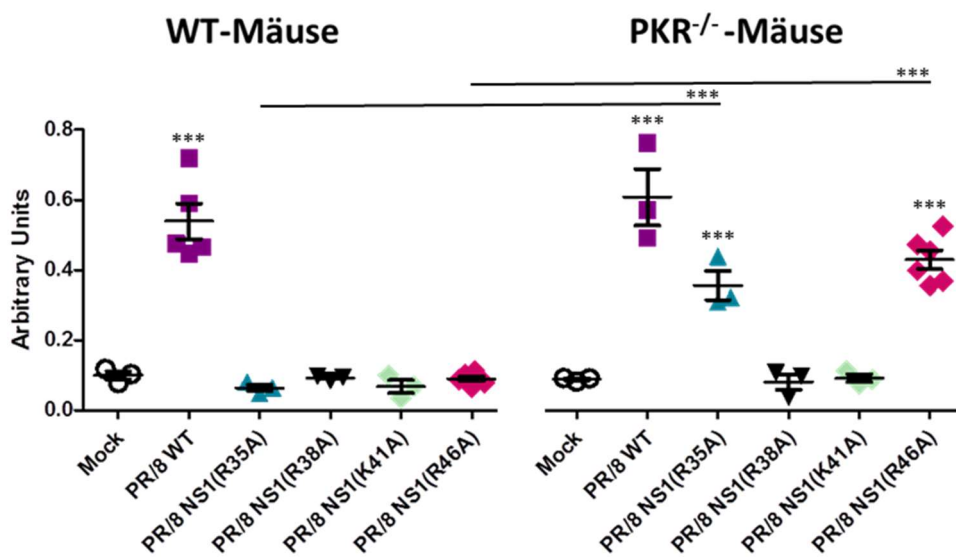


ABBILDUNG 14: BESTIMMUNG DER ALVEOLÄREN SCHRANKENSTÖRUNG

Die alveoläre Albuminleakage ist 7 Tage nach Infektion mit PR/8 WT und den jeweiligen Mutanten in WT- und  $PKR^{-/-}$ -Mäusen im Verhältnis der BALF- und Serum-FITC-Fluoreszenzen in Arbitrary Units (AU) angegeben (67). Die Daten zeigen den Mittelwert von 3-6 Tieren/Gruppe +/- Standardabweichung. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

$PKR^{-/-}$ -Mäuse, die mit den Mutanten PR8 NS1(R35A) und PR8 NS1(R46A) infiziert wurden, zeigten eine erhöhte Barriere-Schaden gemessen an der alveolären Leakage und ausgeprägte leukozytäre Infiltrate in den histologischen Aufnahmen. Im Vergleich dazu blieb in WT-Mäusen die Lungenbarriere intakt. Im Vergleich zur Infektion mit PR/8 WT fiel die Leakage in  $PKR^{-/-}$ -Mäuse signifikant geringer aus.

## 5. Diskussion

Influenzaviren sind in der Lage, die oberen und unteren Atemwege zu infizieren. Besonders die Infektion des distalen Alveolarepithels führt nicht selten zur Pneumonie und als Komplikation zum akuten Lungenversagen (ARDS), welches mit einem schlechten Outcome korreliert. Verantwortlich für einen schweren Verlauf der Influenza-Pneumonie ist neben dem Immunstatus des Patienten und seiner Komorbiditäten, die Ausstattung der Virulenzfaktoren der Influenzaviren. Ziel dieser Arbeit war es, Influenza A Viren mit Punktmutationen im NS1-Gen auf Virulenz im lebenden Organismus zu untersuchen. Im Besonderen wurde dabei die Interaktion mit der antiviralen Proteinkinase R im Maus-Modell adressiert. Die Inhibierung der PKR durch NS1 ist ein wichtiger Schritt zur Blockierung der antiviralen Antwort der Wirtszelle und trägt somit auch direkt zur Virulenz dieser Influenza Viren bei. In der Literatur ist allgemein akzeptiert, dass das NS1 Protein von Influenza A Viren als PKR-Antagonist fungiert, wenngleich der genaue Mechanismus noch nicht vollständig geklärt ist. So postulierte die Arbeitsgruppe um R.M. Krug zunächst für die Inhibition der PKR-Aktivierung den Mechanismus der dsRNA-Sequestrierung durch das NS1 Protein des Influenza A/Udorn/72 (H3N2) Virus (76), während in einer späteren Veröffentlichung eine direkte PKR-Bindung beschrieben wurde, die unabhängig von der RNA-Bindungsdomäne geschehen soll (63). Falcon und Kollegen jedoch konnte keine NS1-PKR-Interaktion des A/Victoria/3/75 (H3N2) Influenza Virus *in vitro* und *in vivo* nachweisen (77). In Zellkultur-Experimenten der Arbeitsgruppe von Thorsten Wolff konnte gezeigt werden, dass Veränderungen von einzelnen Aminosäurepositionen in der RNA-Binde-Domäne des NS1 Proteins wesentliche Auswirkungen auf die Interaktion mit PKR aufwiesen, dabei wurden definierte Aminosäurestellen beschrieben, die direkte PKR-Abhängigkeit aufwiesen und deren Austausch zu Alanin zur Attenuierung der NS1-Mutante in immunkompetenten Zellen geführt hat (67). Eine Vielzahl von Forschungsarbeiten wurden bereits zum NS1-Protein und diverser Veränderungen in seiner genetischen Struktur veröffentlicht (78) (79), die genauen Aminosäurepositionen, die im Zusammenhang mit PKR im wichtigen *in vivo* Modell aber eine Rolle spielen, wurden bis dato nicht identifiziert.

## Diskussion

In dieser Arbeit wurden Erkenntnisse gewonnen, welche Aminosäurestellen im NS1 Protein des Influenza A Virus spezifisch in Hinsicht auf eine PKR-Blockade *in vivo* agieren. Dies eröffnet die Möglichkeit, neue Therapieoptionen zu generieren, welche gegen den Virulenzfaktor NS1 gerichtet sind, mit dem Ziel, die IAV Pneumonie und deren Komplikationen wie ALI bzw. das ARDS abzumildern oder gar zu vermeiden.

Untersucht wurden zwei verschiedene Mauslinien, dabei handelte es sich um C57Bl/6J, eine Wildtyp-Mauslinie, und PKR<sup>-/-</sup>, eine Knockout-Mauslinie generiert auf C57Bl/6J genetischem Hintergrund, welche homozygot defizient für PKR waren. Die mutierten Influenza Viren wurden im Robert-Koch-Institut in Berlin von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thorsten Wolff generiert und für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um die NS1-Mutanten PR8/NS1(R35A), PR8/NS1(R38A), PR8/NS1(K41A) und PR8/NS1(R46A) verwendet, als Kontrolle diente PR8/Wildtyp (A/PR/8/34 H1N1). Die genannten NS1-Mutanten wurden gezielt ausgewählt, da sie in Zellkultur-Experimenten unterschiedliche PKR-abhängige Eigenschaften zeigten, wobei die spezifische PKR-Abhängigkeit dabei durch A549 PKR KD (Knockdown) Zellen verifiziert wurde, dabei handelt es sich um eine humane Alveolarepithel-Zelllinie, bei der die PKR durch genetisches Knockdown mittels shRNA ausgeschaltet wurde.

### 5.1 PKR abhängige Mutanten PR/8 NS1(R35A) und PR/8 NS1(R46A).

Der Inaktivierung der PKR bedienen sich unterschiedliche Viren, da sie eine zentrale Rolle in der antiviralen Verteidigung der Wirtszelle spielt. Die Unterdrückung der IFN-Antwort der Zelle ist essentiell für die virale Propagation und somit überlebenswichtig für das Virus (64) (80). Punktmutationen im NS1 Protein, die zum Austausch der ursprünglichen Aminosäure führen, wurden bisher intensiv erforscht (80) (81). Durchweg wurden Auswirkungen auf die Virulenz des Influenza Virus durch diese Mutationen beschrieben. Saisonale Influenza Varianten weisen oft Veränderungen im NS1 Protein auf und beeinflussen damit den Verlauf der Infektion (82) (83). Bekannt ist, dass die Aminosäurestellen 35 und 46 multiple intermolekulare Salzbrücken und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den alpha-helices zweier NS1 Proteine bilden

## Diskussion

und damit die dimere Form stabilisieren (80). Dieser Mechanismus ermöglicht die Maskierung von viraler dsRNA, die als Substrat für die PKR notwendig ist, um eine Immunkaskade zu initiieren. Bekannt ist auch, dass Alveolarmakrophagen (AM) bei der viralen Immunantwort eine zentrale Rolle spielen und besonders PKR-Defizienz in AM zur ineffektiven Virusbeseitigung führt (75).

Mit dem Austausch zu Alanin an den genannten Aminosäurestellen konnte eine PKR-abhängige Attenuierung des Influenza A Virus *in vivo* bestätigt werden. Ausschlaggebend dafür war die mangelnde Fähigkeit zur Bindung sowohl von dsRNA als auch von PKR (67). In WT Mäusen, welche nach Infektion mit PR/8 WT eine ausgeprägte Morbidität und eine Mortalität von 87,5% aufwiesen, konnte nach Infektion mit den Mutanten PR8/NS1(R35A) und PR8/NS1(R46A) keine Pathologie bezüglich der klinischen Parameter im Verlauf festgestellt werden, das Überleben lag bei 100 Prozent. PKR<sup>-/-</sup>-Mäuse verhielten sich ähnlich in Bezug auf Morbidität, vergleichbar mit WT-Mäusen lag die Mortalität bei 87,5% nach Infektion mit dem PR8 WT. Im Gegensatz zu WT-Mäusen zeigten PKR<sup>-/-</sup>-Mäuse eine mit dem PR8/WT vergleichbar ausgeprägte Pathologie nach Infektion mit den Mutanten PR8/NS1(R35A) und PR8/NS1(R46A). Vor diesem Hintergrund erwies sich PKR Defizienz als fatal in der IV-Pneumonie.

Die Interferon- $\beta$ -Ausschüttung nach Influenza Virus Infektion ist entscheidend für eine adäquate Immunreaktion. Nach Infektion von A549 Zellen wurden IFN- $\beta$  Level auf Protein Ebene mittels ELISA bestimmt. Es zeigte sich, dass die Mutanten PR8 NS1(R35A) und PR8 NS1(R46A) schwache IFN Induktoren sind, die Level waren vergleichbar mit denen nach Infektion mit PR/8 WT (67). In dieser Arbeit wurden die IFN- $\beta$  Konzentrationen in den BAL-Überständen infizierter WT- und PKR<sup>-/-</sup>-Mäuse bestimmt. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass vergleichbar zum PR8(WT) die IFN- $\beta$ -Level der Mutanten PR8 NS1(R35A) und PR8 NS1(R46A) *in vivo*, sowohl in WT-, als auch in PKR<sup>-/-</sup>-Mäusen niedrig ausfielen, wobei die Ausprägung der Inflammation dabei eine wesentliche Rolle spielt. Diese Ergebnisse untermauern ebenfalls, dass die Aminosäurepositionen 35 und 46 im NS1 PKR-abhängig die Virulenz des Influenza A Virus A/PR/8/34 beeinflussen.

### 5.2 Nicht PKR abhängige Mutanten PR/8 NS1(R38A) und PR/8 NS1(K41A)

Allgemein auffallend ist, dass alle 4 untersuchten Mutanten in WT-Mäusen attenuiert waren; das bestätigt den Stellenwert des NS1-Proteins in der Funktion als Virulenzfaktor. In PKR<sup>-/-</sup>-Mäusen ist zu beobachten, dass die Mutanten PR8 NS1(R38A) und PR8 NS1(K41A) in ähnlicher Form attenuiert waren. Die Virulenz muss daher in diesen Mutanten durch andere, PKR unabhängige, Faktoren inhibiert worden sein.

NS1 ist in der Lage andere Interferon-induzierende Faktoren zu binden, besonders RIG-I und die Ubiquitin Ligase TRIM25 sind als wichtige Kandidaten zu nennen. Die dadurch inhibierte IFN Produktion erweist sich als vorteilhaft für die virale Propagation (87). Genau diese Eigenschaft prüfte Chen *et al* als potenziell relevant zur Herstellung Interferon-sensitiver Influenza Lebend-Impfstoffe. In der Studie wurden die Aminosäurestellen R38 und K41 der RNA-bindenden-Domäne des NS1-Proteins untersucht, welche jeweils mit Alanin ersetzt wurden. Die generierte Influenza Doppel-Mutante NS1 (R38A/K41A) war in der Lage, Zellen in vollem Umfang zu infizieren. Durch eine robuste antivirale Immunantwort war die Replikation jedoch erheblich eingeschränkt, sodass das Virus in einer kurzen Zeit von der Zelle eliminiert wurde (88). Schierhorn *et al* konnten ebenfalls zeigen, dass die Replikation nach Infektion mit den Mutanten PR/8 NS1(R38A) und PR/8 NS1(K41A) in A549 Zellen nicht beeinträchtigt war. In PKR-Knockdown Zellen konnte eine gesteigerte IFN- $\beta$  Expression *in vitro* objektiviert werden. *In vivo* zeigten sich Virulenz, alveoläre Schrankenstörung, Gewichtsverlust, Überleben, als auch histologische Auswertungen ohne pathologischen Befund. WT-Mäuse gleichermaßen wie PKR<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten nach Infektion mit den Mutanten PR/8 NS1(R38A) und PR/8 NS1(K41A) weder Influenza-typische Symptome noch veränderte klinische Parameter im Vergleich zu mock-infizierten Tieren nach 3, 5 und 7 Tagen. Vor dem Hintergrund der *in vitro* Ergebnisse, ist es wahrscheinlich, dass *in vivo* die direkte Stimulation verschiedener Zellpopulationen und deren Interaktionen eine suffiziente Virusreplikation verhindern können. Die Inhibierung der Replikation könnte in diesen Fällen durch andere ISGs, wie RIG-I und TRIM-25 gewährleistet worden sein (82). Der genaue Zeitpunkt der

## Diskussion

vollständigen viralen Clearance dieser Mutanten *in vivo* sollte gesondert erforscht werden, um eine Zeitspanne für antivirale Behandlungen eingrenzen zu können.

### 5.3 Potentielle Therapieansätze für IV-Pneumonie

Einen ausreichenden Schutz vor einer IV Infektion bieten derzeit die jährlichen Impfungen, welche die potenziell saisonal auftretenden pandemischen Varianten abdecken. Von der STIKO empfohlen wird die jährliche Gripeschutzimpfung als Standardimpfung für Patienten über 60 Jahren und als Indikationsimpfung für Schwangere ab dem 2. Trimenon, für Personen ab 6 Monaten mit erhöhter gesundheitlicher Gefährdung infolge eines Grundleidens, für Bewohner von Alters- oder Pflegeheimen und für medizinisches Personal (85). Im Falle einer Ansteckung und Ausbreitung in der distalen Lunge, fehlen leider weiterhin adäquate Therapiemöglichkeiten, um dem Fortschreiten der Infektion und der Vermeidung von komplizierten Verläufen ausreichend entgegenzuwirken.

Da die Entwicklung neuer antiviraler Medikamente vor dem Hintergrund saisonal pandemischer Influenza-Varianten immer wichtiger wird, zielen die Ergebnisse dieser Arbeit besonders auf den Erwerb neuer Grundlageninformationen über mögliche Angriffspunkte neuer antiviraler Therapeutika.

Aufgrund seiner Funktion als zentrales Protein für effiziente Virusvermehrung und seiner hochkonservierten Struktur, ist das NS1-Protein ein vielversprechendes Angriffsziel für potenzielle Therapieoptionen.

Zurzeit gibt es zwei antivirale Medikamentenklassen, die für die Therapie der IV Infektion zugelassen sind: M2-Ionen-Hemmer und Neuraminidase-Inhibitoren (NAIs). Auf Grund von plötzlichen Resistenzentwicklungen ist es jedoch dringend notwendig, weitere antivirale Medikamente zu entwickeln, um somit besser während auftretender Influenza-Pandemien aufgestellt zu sein. Resistenzen gegenüber M2-Hemmern wie Amantadin sind mittlerweile für viele Influenza Subtypen bekannt, weshalb M2-Hemmer nur noch selten eingesetzt werden (79). Bei NAIs wurden ebenfalls Resistenzen beobachtet, 98-100% der zirkulierenden Influenza Stämme aus dem Jahr

## Diskussion

2008/2009 waren resistent gegen Oseltamivir und liefern den Beweis, dass Resistenzen auf Grund der genetischen Variabilität auftreten können (83) (81).

Neue Zielstrukturen des IV müssen in Betracht gezogen werden, um neue Medikamente zu entwickeln. Diese Zielstrukturen sollten nach ihrer genetischen Stabilität ausgewählt werden, um der Resistenzentwicklung durch hohe genetische Variabilität zu entkommen. Mittlerweile sind Inhibitoren des viralen Polymerasekomplexes in der Etablierung und versprechen einen neuen Angriffspunkt in der Influenza Therapie (84). Seit Januar 2021 ist Baloxavir (Xofluza®) in der EU als Therapie zugelassen. Baloxavir greift ebenfalls in der Frühphase der Infektion ein, in dem es die Cap-abhängige Endonuklease PA hemmt und somit die Transkription von vRNA in mRNA verhindert (36).

Insgesamt konnte mit dieser Arbeit die Relevanz der Aminosäurepositionen 35 und 46 im NS Protein für die virale Replikation, die Morbidität und Mortalität in vivo klar gezeigt werden. Daher erscheint es aussichtsreich, diese Molekularstrukturen durch die Entwicklung von Inhibitoren für eine antivirale Therapie zu adressieren, um auf diese Weise schwere Komplikationen der IV-Pneumonie, wie das ARDS, abzumildern und sogar verhindern zu können.

## 6. Zusammenfassung

Das Influenza-Virus verursacht beim Menschen bisweilen schwere Pneumonien, die bis zum akuten Lungenversagen (ARDS) fortschreiten können. Mit dem Virulenzfaktor NS1, bedient sich das Influenza A Virus mehrerer Strategien, um die wirtsspezifische Immunantwort zu inhibieren. Als besonderer Angriffspunkt des NS1 Proteins zählt die zelluläre Proteinkinase R (PKR). PKR gehört zu der Familie der Interferon stimulierten Gene (ISG) und ist ein wichtiger Sensor viraler Infektionen der Zelle. Die Aktivierung von PKR wird durch Bindung viraler dsRNA getriggert und resultiert letztendlich einerseits in der Hochregulation von Typ I Interferon Genen und andererseits über die Phosphorylierung von eIF-2 $\alpha$  in einem Translationsarrest und darauffolgender Abschaltung der Proteinsynthese, wodurch eine suffiziente Virusvermehrung verhindert werden kann.

In dieser Arbeit wurden Influenza A Virus NS1 Mutanten PR/8 NS1(R35A), PR/8 NS1(R38A), PR/8 NS1(K41A) und PR/8 NS1(R46A), die vielversprechenden Eigenschaften in Zellkultur-Experimenten aufwiesen, im Mausmodell evaluiert. Um die PKR Abhängigkeit zu beweisen, wurden WT-Mäuse und PKR<sup>-/-</sup>-Mäuse verwendet. Es zeigte sich, dass PKR für eine adäquate Immunantwort und Viruseliminierung nach Infektion mit den Mutanten PR/8 NS1(R35A) und PR/8 NS1(R46A) *in vivo* unerlässlich ist. Dies zeigte sich anhand klinischer Parameter wie Viruslast, Inflammation in der Lunge und Zerstörung der Barriere-Funktion des Lungeneithels, in diesem Zusammenhang haben PKR-defiziente Mäuse signifikant schlechtere Werte im Vergleich zu WT-Mäusen. Besonders deutlich zeigte sich die PKR-Abhängigkeit in Bezug auf Morbidität und Überleben. PKR<sup>-/-</sup>-Mäuse waren nach Infektion mit den Mutanten PR/8 NS1(R35A) und PR/8 NS1(R46A) objektiv morbid und zeigten eine ausgeprägt hohe Letalität. WT-Mäuse hingegen zeigten keine krankheitsbedingten Auffälligkeiten wie Gewichtsverlust oder Tachypnoe und überlebten die Infektion zu 100 Prozent. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Mutanten PR/8 NS1(R38A) und PR/8 NS1(K41A) keinen PKR abhängigen Effekt aufwiesen, diese Mutanten waren in PKR<sup>-/-</sup>-Mäusen und WT-Mäusen attenuiert und zeigten keine relevanten Unterschiede nach Infektion.

Mit diesen Ergebnissen hat NS1, als hochkonserviertes virales Protein, das Potential als neue Zielstruktur für mögliche antivirale Therapieansätze in Betracht zu kommen. Aufgrund der hier gewonnenen Erkenntnisse erwarten wir, dass die Entwicklung von Molekülen, die die Aminosäurestellen 35 und/oder 46 des NS1 Proteins maskieren können, einen positiven Effekt auf die PKR-abhängige Kaskade des antiviralen Status in infizierten Zellen haben und diese damit adäquat inflammatorisch auf die Infektion reagieren können, wodurch sich das Outcome des ARDS verbessert.

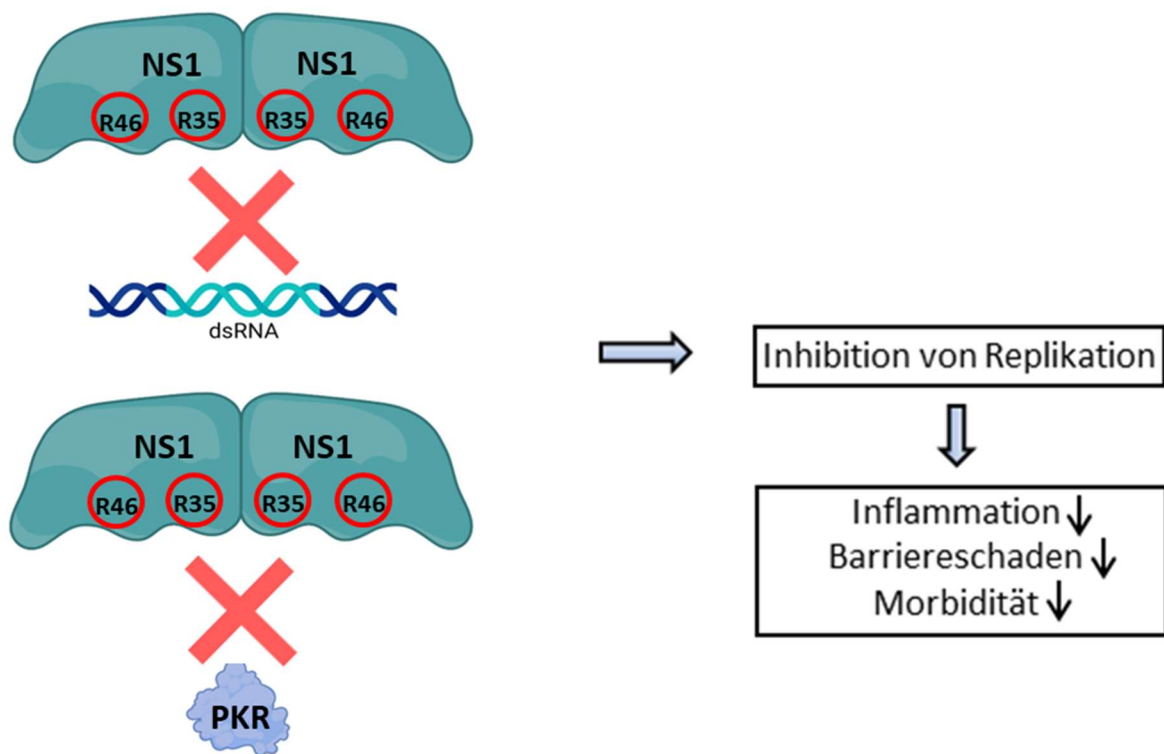


ABBILDUNG 15: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER PKR-ABHÄNGIGEN AMINOSÄURENSTELLEN IM NS1-PROTEIN UND DEREN AUSWIRKUNGEN NACH DER INFEKTION

Durch die PKR-abhängigen Aminosäurestellen 35 und 46 im NS1-Protein des Influenza A Virus (IAV) kann eine Inhibierung der viralen Replikation und als Folge die Inflammation, der Barrierschaden und die Morbidität *in vivo* signifikant reduziert werden. Created with BioRender.

## 7. Summary

Influenza viruses can cause pneumonia in humans with progression to acute respiratory distress syndrome (ARDS). Using the virulence factor NS1, Influenza virus is able to use many strategies to suppress the innate immune response of infected cells. One of the most important targets of NS1 is the cellular Protein kinase R (PKR). PKR is a member of the interferon stimulated genes family (ISG) and therefore one of the essential viral sensors in infected cells. In its active form after binding to viral dsRNA, PKR is stimulating the transcription of type I-Interferon genes via the IKK/ NF- $\kappa$ B pathway. Furthermore, it can phosphorylate the eIF-2 $\alpha$  and inaugurate translational shut-off for preventing viral propagation. Utilizing experiments in mouse model using WT- and PKR<sup>-/-</sup>-mice confirmed the relevance of two conserved amino acids in the RNA-binding-domain (RBD) of the NS1 protein. Mice were infected with indicated mutant viruses PR/8 NS1(R35A), PR/8 NS1(R38A), PR/8 NS1(K41A) und PR/8 NS1(R46A), which were promising in cell culture experiments in perspective to PKR interaction. The crucial amino acid positions 35 and 46 were *in vivo* confirmed for the importance of PKR dependent immune response in viral clearance. Clinical parameters, such as barrier-dysfunction in the alveolar epithelium or inflammation showed that PKR-deficient mice were significantly worse responding after infection in comparison to WT-mice. Especially highlighting were the results on morbidity and survival. PKR<sup>-/-</sup>-mice were objectively suffering from illness shown by reduction of weight or tachypnea and had a high lethality after infection with the mutants PR/8 NS1(R35A) and PR/8 NS1(R46A), whereas WT-mice survived the infection completely and had not shown any signs of morbidity.

Furthermore, it was shown that the mutants PR/8 NS1(R38A) and PR/8 NS1(K41A) were not attenuated in a PKR dependent manner. PKR<sup>-/-</sup>-mice as well as WT-mice have not shown development of influenza-specific symptoms after infection.

Our *in vivo* studies indicate that development of small molecules to disguise the amino acid positions 35 and/or 46 of the NS1 protein is a promising approach for novel therapeutical strategies to treat IV-infection. Blocking interaction elicited by NS1 35 and/or 46 are expected to have attenuating effect on viral replication and virus induced inflammation, thus improving outcome in IAV-induced ARDS.

**Literaturverzeichnis**

- 1. Welsch U, Kummer W, Deller T.** *Histologie Das Lehrbuch.* s.l. : Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 2018. 9783437444340.
- 2. Fehrenbach H.** Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Resiratory Research.* 2001, Bd. 2, 1, S. 33-46.
- 3. P Dhar, E Eck, JN Israelachvili.** Lipid-Protein Interactions Alter Line Tensions and Domain Size Distributions in Lung Surfactant Monolayers. *Biophysical Journal.* 2012, 102:56-65.
- 4. Robert J., Mason.** Biology of alveolar type II cells. *Respirology.* 2006, Bd. 11, s1.
- 5. Cakarova L, et al.** Macrophage tumor necrosis factor-alpha induces epithelial expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: impact on alveolar epithelial repair. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 2009, Bd. 180, 6, S. 521-532.
- 6. Geissmann F, Jung S, Littman DR.** Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 2003, Bd. 19, 1, S. 71-82.
- 7. Gordon S.** Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology.* 2003, Bd. 3, 1, S. 23-35.
- 8. Maus UA, et al.** Resident alveolar macrophages are replaced by recruited monocytes in response to endotoxin-induced lung inflammation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.* 2006, Bd. 35, 2, S. 227-235.
- 9. Sminia T, van der Brugge-Gamelkoorn GJ, Jeurissen SH.** Structure and function of bronchus-associated lymphoid tissue (BALT). *Critical Reviews in Immunology.* **1989, 9:119-150.**
- 10. Hippenstiel S, Opitz B, Schmeck B, Suttorp N.** Lung epithelium as a sentinel and effector system in pneumonia - molecular mechanisms of pathogen recognition and signal transduction. *Respiratory Research.* 2006, Bd. 7, 97.
- 11. Mason RJ.** Biology of alveolar type II cells. *Respirology, Supplementary.* 2006, Bd. 11, S. S12-15.

12. **Kamisoglu K, Haimovich B, Calvano SE.** Human metabolic response to systemic inflammation: assessment of the concordance between experimental endotoxemia and clinical cases of sepsis/SIRS. *Critical Care*. 19, 2015, 71.
13. **Compans RW, Meier-Ewert H, Palese P.** Assembly of lipid-containing viruses. *Journal of Supramolecular Structure*. 1974, Bd. 2, 2-4, S. 496-511.
14. **Tong S, Zhu X, Li Y.** New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLOS Pathogens*. 9, 2013, 10.
15. **[http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)). [Online]**
16. **Robb NC, Fodor E.** The accumulation of influenza A virus segment 7 spliced mRNAs is regulated by the NS1 protein. *Journal of general Virology*. 2012, 93: 113-118.
17. **Medina RA, Garcia-Sastre A.** Influenza A viruses: new research developments. *Nature Review Microbiology*. 2011, Bd. 9, 8, S. 590-603.
18. **Dubois J, Terrier O, Rosa-Calatrava M.** Influenza Viruses and mRNA Splicing: Doing More with Less. *mBio*. 2014, Bd. 5, 3.
19. **Kumlin U, Olofsson S, Dimock K, Arnberg N.** Sialic acid tissue distribution and influenza virus tropism. *Influenza Other Respiratory Viruses*. 2008, 2.
20. **Jakubcova L, Holly J, Vareckova L.** The role of fusion activity of influenza A viruses in their biological properties. *Acta Virologica*. 60, 2016, 2:121-135.
21. **Lamb RA, Choppin PW.** The structure and replication of influenza virus. *Annual Review of Biochemistry*. 1983, 52:467-506.
22. **Dias AD, Bouvier T, Crepin AA, McCarthy DJ, Hart F, Baudin S.** The cap-snatching endonuclease of influenza. *Nature*. 2009, 458:914-8.
23. **Krug RM, Broni BA, Bouloy M.** Are the 5' ends of influenza viral. *Cell*. 1979, 18:329-34.
24. **Knipe, D. M., P. M. Howley, D. E. Griffin.** Fields Virology, 5. Auflage ed. *Fields Virology*. s.l. : Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
25. **Noda T, Murakami S, Nakatsu S.** Importance of the 1+7 configuration of ribonucleoprotein complexes for influenza A virus genome packaging. *Nature Communications*. 2018, 4;9(1):54.

- 26. Holland J, Spindler K, Horodyski F, Grabau E, Nichol S, VandePol S.** Rapid evolution of RNA genomes. *Science*. 1982, 215(4540): 1577-85.
- 27. Steinhauer DA, Holland JJ.** Rapid evolution of RNA viruses. *Annual Review of Microbiology*. 1987, Bd. 41, S. 409-433.
- 28. Klenk HD.** Influenzaviren auf dem Weg vom Tier zum Mensch. *Pharmakologie in unserer Zeit*. 2, 2011, Bd. 40.
- 29. Herold S.** Pathogenesis, symptoms and treatment of virus influenza. *Pharmakologie in Unserer Zeit*. 2011, Bd. 40, 2, S. 115-119.
- 30. Lemaitre M, Carrat F, Rey G.** Mortality Burden of the 2009 A/H1N1 Influenza Pandemic in France: Comparison to Seasonal Influenza and the A/H3N2 Pandemic. *Plos One*. 2012, 7(9): e45051.
- 31. ED, Kilbourne.** Influenza Pandemics of the 20th Century. *Emerging infectious diseases*. 2006, 12(1): 9–14.
- 32. Poggensee G, et al.** The first wave of pandemic influenza (H1N1) 2009 in Germany: from initiation to acceleration. *BioMed Central Infectious Diseases*. 2010, Bd. 10, S. 155.
- 33. Tang JW, Shetty N, Lam TT.** Features of the new pandemic influenza A/H1N1/2009 virus: virology, epidemiology, clinical and public health aspects. *Curr Opin Pulm Med*. 2010, 16(3): 235-241.
- 34. Herold S, Becker C, Ridge KM, Scott Budinger GR.** Influenza virus-induced lung injury: pathogenesis and implications for. *European Respiratory Journal*. 2015, 45: 1463-1478.
- 35. Hussain M, Galvin HD, Haw TY, Nutsford AN, Husain M.** Drug resistance in influenza A virus: the epidemiology and management. *Infection and drug resistance*. 2017, 20;10:121-134.
- 36. Hayden FG, Sugaya N, Hirotsu N, Lee N, de Jong MD, Hurt AC, Ishida T, Sekino H, Yamada K, Portsmouth S, Kawaguchi K, Shishido T, Arai M, Tsuchiya K, Uehara T, Watanabe A und Group, Baloxavir Marboxil Investigators.** Baloxavir Marboxil for Uncomplicated Influenza in Adults and Adolescents. *N Engl J Med*. 2018, 379(10):913-923.

- 37. Kuiken T, Taubenberger JK.** Pathology of human Influenza revisited. *National Institute of Health - Vaccine*. 2008, Bd. 26, suppl 4, S. D59-D66.
- 38. Rawal G, Yadav S, Kumar R.** Acute Respiratory Distress Syndrome: An Update and Review. *Journal of translational internal medicine*. 2018, 26;6(2):74-77.
- 39. Renz-Polster H, Krautzig S.** *Basislehrbuch Innere Medizin*. München : Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, 2008. ISBN 978-3-437-41053-6.
- 40. Matthay MA, Robriquet L, Fang X.** Alveolar epithelium: role in lung fluid balance and acute lung injury. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2005, Bd. 2, 3, S. 206-213.
- 41. Carrasco Loza R, Villamizar Rodríguez G, Medel Fernández N.** Ventilator-Induced Lung Injury (VILI) in Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS): Volutrauma and Molecular Effects. *The open Respiratory medicine journal*. 2015, 26;9:112-9.
- 42. Kawai T, Akira S.** Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*. 2011, Bd. 34, 5, S. 637-650.
- 43. Peteranderl C, Herold S.** The Impact of the Interferon/TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Signaling Axis on Disease Progression in Respiratory Viral Infection and Beyond. *Frontiers in Immunology*. 2017, 22;8:313.
- 44. Thorley AJ, Grandolfo D, Lim E, Goldstraw P, Young A, Tetley TD.** Innate immune responses to bacterial ligands in the peripheral human lung--role of alveolar epithelial TLR expression and signalling. *PLoS one*. 2011, 6(7):e21827.
- 45. Herold S, et al.** Alveolar Epithelial Cells Direct Monocyte Transepithelial Migration upon Influenza Virus Infection: Impact of Chemokines and Adhesion Molecules. *The Journal of Immunology*. 2006, Bd. 177, S. 1817-1824.
- 46. Martinez-Moczygemba M, Huston DP.** Biology of common beta receptor-signaling cytokines: IL-3, IL-5 and GM-CSF. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2003, Bd. 112, 4, S. 653-665.
- 47. Maus U, et al.** The role of CC chemokine receptor 2 in alveolar monocyte and neutrophil immigration in intact mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2002, Bd. 166, 3, S. 268-273.

- 48. Vremec D, Lieschke GJ, Dunn AR, Robb L, Metcalf D, Shortman K.** The influence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell levels in mouse lymphoid organs. *European Journal of Immunology*. 1997, Bd. 27, 1, S. 40-44.
- 49. Thorley AJ, et al.** Primary Human Alveolar Type II Epithelial Cell CCL20 (Macrophage Inflammatory Protein-3)–Induced Dendritic Cell Migration. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. April 2005, Bd. 32, S. 262-267.
- 50. McGill J, Van Rooijen N, Legge KL.** Protective influenza-specific CD8 T cell responses require interactions with dendritic cells in the lung. *Journal of Experimental Medicine*. 2008, Bd. 205, 7, S. 1635–1646.
- 51. JP, Mizgerd.** New England journal of medicine. *Acute lower respiratory tract infection*. 2008, 14;358(7):716-27.
- 52. Cheng A, Wong SM, Yuan YA.** Structural basis for dsRNA recognition by NS1. *Cell Research*. 2009, 19, pages 187–195.
- 53. D, Marc.** Influenza virus non-structural protein NS1: interferon antagonism and beyond. *Journal of general virology*. 2014, 95: 2594-2611.
- 54. Carrillo B, Choi JM, Bornholdt ZA, Sankaran B, Rice AP, Prasad BV.** The Influenza A Virus Protein NS1 Displays Structural Polymorphism. *Journal of Virology*. 2014, 88(8):4113-22.
- 55. Ramos I, Fernandez-Sesma A.** Innate Immunity to H5N1 Influenza Viruses in Humans. *Viruses*. 2012, 4(12):3363-88.
- 56. L, Malmgaard.** Induction and regulation of IFNs during viral infections. *Journal of interferon and cytokine research*. 2004, 24(8):439-54.
- 57. Rui Kang, Daolin Tang.** PKR-Dependent Inflammatory Signals. *Sci signal*. 5, 2012, 247.
- 58. Li F, Chen Y, Zhang Z, Ouyang J, Wang Y, Yan R, Huang S, Gao GF, Guo G, Chen JL.** Robust expression of vault RNAs induced by influenza A virus plays a critical role in suppression of PKR-mediated innate immunity. *Nucleic acids research*. 2015, 2;43(21).

- 59. Garcia MA, Gil J, Ventoso I, Guerra S, Domingo E.** Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2006, 70(4): 1032–1060.
- 60. Gil J, Alcamí J, Esteban M.** Activation of NF-kappa B by the dsRNA-dependent protein kinase, PKR involves the I kappa B kinase complex. *Oncogene*. 2000, 19(11):1369-78.
- 61. Zamanian-Daryoush M, Mogensen TH, DiDonato JA, Williams BR.** NF-kappaB activation by double-stranded-RNA-activated protein kinase (PKR) is mediated through NF-kappaB-inducing kinase and IkappaB kinase. *Molecular and Cellular Biology*. 2000, 20(4):1278-90.
- 62. Szretter KJ, Gangappa S, Belser JA, Zeng H, Chen H, Matsuoka Y, Sambhara S, Swayne DE, Tumpey TM, Katz JM.** Early control of H5N1 influenza replication by the type I interferon response in mice. *Journal of Virology*. 2009, 83(11):5825-3.
- 63. Min JY, Li S, Sen GC, Krug RM.** A site on the influenza A virus NS1 protein mediates both inhibition of PKR activation and temporal regulation of viral RNA synthesis. *Virology*. 2006, 20;363(1):236-43.
- 64. Bergmann M, Garcia-Sastre A, Carnero E, Pehamberger H, Wolff K, Palese P, Muster T.** Influenza virus NS1 protein counteracts PKR-mediated inhibition of replication. *Journal of Virology*. 2000, 74:6203– 6206.
- 65. Lu Y, Wambach M, Katze MG, Krug RM.** Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor. *Virology*. 1995, 214:222–228.
- 66. Tan SL, Katze MG.** Biochemical and genetic evidence for complex formation between the influenza A virus NS1 protein and the interferon induced PKR protein kinase. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 1998, 18:757–766.
- 67. Schierhorn KL, Jolmes F, Bernalow J, Saenger S, Peteranderl C, Dzieciolowski J, Mielke M, Budt M, Pleschka S, Herrmann A, Herold S, Wolff T.** Influenza A Virus Virulence Depends on Two Amino Acids in the N-Terminal Domain of Its NS1 Protein To Facilitate Inhibition of the RNA-Dependent Protein Kinase PKR. *Journal of Virology*. 2017, 28;91(10).

- 68. Hale BG, Randall RE, Ortín J, Jackson D.** The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *The Journal of general virology*. 2008, 89(Pt 10):2359-76.
- 69. Opitz B, Rejaibi A, Dauber B, Eckhard J, Vinzing M, Schmeck B, Hippenstiel S, Suttorp N, Wolff T.** IFN $\beta$  induction by influenza A virus is mediated by RIG-I which is regulated by the viral NS1 protein. *Cellular Microbiology*. 2007, 9:930–938.
- 70. Donelan NR, Basler CF, Garcia-Sastre A.** A recombinant influenza A virus expressing an RNA-binding-defective NS1 protein induces high levels of beta interferon and is attenuated in mice. *Journal of Virology*. 2003, 77:13257–13266.
- 71. Weber-Gerlach M, Weber F.** Standing on three legs: antiviral activities of RIG-I against influenza viruses. *Current opinion in Immunology*. 2016, 42:71-75.
- 72. Schulz O, Pichlmair A, Rehwinkel J, Rogers NC, Scheuner D, Kato H, Takeuchi O, Akira S, Kaufman RJ, Reis e Sousa C.** Protein kinase R contributes to immunity against specific viruses by regulating interferon mRNA integrity. *Cell, Host and Microbe*. 2010, Bd. 20, 7(5):354-61.
- 73. Loving CL, Brockmeier SL, Ma W, Richt JA, Sacco RE.** Innate cytokine responses in porcine macrophage populations: evidence for differential recognition of double-stranded RNA. *Journal of Immunology*. 2006, Bd. 15, 177(12).
- 74. Suki Man-Yan Lee, Tsz-Fung Yip, Sheng Yan, Dong-Yan Jin, Hong-Li Wei, Rey-Ting Guo, Joseph Sriyal Malik Peiris.** Recognition of Double-Stranded RNA and Regulation of Interferon Pathway by Toll-Like Receptor 10. *Frontiers in Immunology*. 2018, Bd. 16, 9:516.
- 75. Högner K, Wolff T, Pleschka S, Plog S, Gruber AD, Kalinke U, Walmrath HD, Bodner J, Gattenlöhner S, Lewe-Schlosser P, Matrosovich M, Seeger W, Lohmeyer J, Herold S.** Macrophage-expressed IFN- $\beta$  Contributes to Apoptotic Alveolar Epithelial Cell Injury in Severe Influenza Virus Pneumonia. *PLoS Pathogens*. 2013, 9(2):e1003188.
- 76. Lu Y, Wambach M, Katze MG, Krug RM.** Binding of the Influenza Virus NS1 Protein to Double-Stranded RNA Inhibits the Activation of the Protein Kinase That Phosphorylates the eIF-2 Translation Initiation Factor. 1995, 214(1): 222-228.

- 77. Falcon AM, Fortes P, Marion RM, Beloso A, Ortin J.** Interaction of Influenza Virus NS1 Protein and the Human Homologue of Staufen in vivo and in vitro. *Nucleic acids research*. 1999, 27(11): 2241-2247.
- 78. Kanrai P, Mostafa A, Madhugiri R, Lechner M, Wilk E, Schughart K, Ylösmäki L, Saksela K, Ziebuhr J, Pleschka S.** Identification of specific residues in avian influenza A virus NS1 that enhance viral replication and pathogenicity in mammalian systems. *The Journal of General Virology*. 2016, 97(9):2135-48.
- 79. DeDiego ML, Nogales A, Lambert-Emo K, Martinez-Sobrido L, Topham DJ.** NS1 Protein Mutation I64T Affects Interferon Responses and Virulence of Circulating H3N2 Human Influenza A Viruses. *Journal of Virology*. 2016, Bd. 14, 90(21):9693-9711.
- 80. Plant EP, Ilyushina NA, Sheikh Faruk, Donnelly RP, Ye Z.** Influenza Virus NS1 Protein Mutations at Position 171 Impact Innate Interferon Responses by Respiratory Epithelial Cells. *Virus Research*. 2017, 240:81-86.
- 81. Pereira CF, Wise HM, Kurian D, Pinto RM, Amorim MJ, Gill AC, Digard P.** Effects of mutations in the effector domain of influenza A virus NS1 protein. *BMC research notes*. 2018, 18;11(1):673.
- 82. Nogales A, Martinez-Sobrido L, Topham DJ, DeDiego ML.** NS1 Protein Amino Acid Changes D189N and V194I Affect Interferon Responses, Thermosensitivity, and Virulence of Circulating H3N2 Human Influenza A Viruses. *Journal of Virology*. 2017, Bd. 14, 91(5).
- 83. Lamine EN, Pekosz A.** The R35 Residue of the Influenza A Virus Protein has minimal Effects on nuclear Localization but alters Virus Replication through Disrupting Dimerization. *Virology*. 2014, 458-459:33-42.
- 84. Gack MU, Kirchhofer A, Shin YC, Inn KS, Liang C, Cui S, Myong S, Ha T, Hopfner KP, Jung JU.** Roles of RIG-I N-terminal Tandem CARD and Splice Variant in TRIM25-mediated Antiviral Signal Transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008, 105(43).
- 85. Chen C, Fan W, Li J, Zheng W, Zhang S, Yang L, Liu D, Liu W, Sun L.** A promising IFN-Deficient System to Manufacture IFN-Sensitive Influenza Virus. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2018, 1;8:127.

- 86. Pham AM, Gilfoy Santa Maria F, Lahiri T, Friedman E, Marie IJ, Levy DE.** PKR Transduces MDA5-Dependent Signals for Type I IFN Induction. *PLoS Pathogens*. 2016, 12(3):e1005489.
- 87. A, Chen-Yu Hsu.** Influenza Virus: A Master Tactician in Innate Immune Evasion and Novel Therapeutic Interventions. *Frontiers in Immunology*. 2018, 9: 743.
- 88. Melville K, Rodriguez T, Dobrovolny HM.** Investigating Different Mechanisms of Action in Combination Therapy for Influenza. *Frontiers in Pharmacology*. 2018, 23;9:1207.
- 89. Baz M, Carbonneau J, Rhéaume C, Cavanagh MH, Boivin G.** Combination Therapy with Oseltamivir and Favipiravir Delays Mortality but Does Not Prevent Oseltamivir Resistance in Immunodeficient Mice Infected with Pandemic A(H1N1) Influenza Virus. *Viruses*. 2018, 3;10(11).
- 90. Naesens L, Stevaert A, Vanderlinden E.** Antiviral therapies on the horizon for influenza. *ScienceDirect*. 2016, 30:106-115.
- 91. RKI.** Epidemiologisches Bulletin. 2018, 23. August 2018/Nr. 34.
- 92. DeDiego ML, Nogales A, Lambert-Emo K, Martinez-Sobrido L, Topham DJ.** NS1 Protein Mutation I64T Affects Interferon Responses and Virulence of Circulating H3N2 Human Influenza A Viruses. *Journal of Virology*. 2016, 90:9693-9711.
- 93. Kaewborisuth C, Zanin M, Häcker H, Webby RJ, Lekcharoensuk P.** G45R mutation in the nonstructural protein 1 of A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) enhances viral replication independent of dsRNA binding activity and type I interferon biology. 2016, 13:127.
- 94. Jing X, Xu J, Fan M, Ma L, Huang X, Wang X, Sun S, Zhu C, Liu H.** Mutation analysis of the RNA silencing suppressor NS1 encoded by avian influenza virus H9N2. *Journal of General Virology*. 2015, 96:1613-1618.
- 95. Sanders CJ, Doherty PC, Thomas PG.** Respiratory epithelial cells in innate immunity to influenza virus infection. *Cell Tissue Research*. 2010, Bd. 343, 1, S. 13-21.
- 96. Jain S, et al.** Hospitalized Patients with 2009 H1N1 Influenza in the United States, April–June 2009. *The New England Journal of Medicine*. 2009, Bd. 361, 20, S. 1935-1944.

- 97. Mauad T, et al.** Lung pathology in fatal novel human influenza A (H1N1) infection. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2010, Bd. 181, 1, S. 72–79.
- 98. Matzinger P.** Friendly and dangerous signals: is the tissue in control? *Nature Immunology*. Januar 2007, Bd. 8, 1.
- 99. Lyles DS.** Cytopathogenesis and inhibition of host gene expression by RNA viruses. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2000, Bd. 64, 4, S. 709-724.
- 100. Parker D, Prince A.** Innate immunity in the respiratory epithelium. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2011, Bd. 45, 2, S. 189-201.
- 101. Maus U, et al.** Alveolar JE/MCP-1 and endotoxin synergize to provoke lung cytokine upregulation, sequential neutrophil and monocyte influx, and vascular leakage in mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2001, Bd. 164, 3, S. 406-411.
- 102. Maus U, et al.** Molecular pathways of monocyte emigration into the alveolar air space of intact mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2002, Bd. 165, 1, S. 95-100.
- 103. Pizzorno A, Abed Y, Boivin G.** Influenza drug resistance. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 2011, Bd. 32, 4, S. 409-422.
- 104. www.rki.de. (Epidemiologisches Bulletin).**
- 105. Michaelis M.** Influenzaviren: Biologie und Pathogenitätsfaktoren. *Pharmakologie in unserer Zeit*. 2, 2011, Bd. 40.
- 106. Hutchinson, Edward C.** Influenza Virus. *Trends in Microbiology*. MICROBE OF THE MONTH, 2018, Volume 25, Issue 9.
- 107. Sadler A J, Williams B R G.** Interferon-inducible antiviral effectors. *Nature Reviews Immunology*. 2008, 8(7): 559–568.
- 108. Tome-Amat J, Ramos I, Amanor F, Fernández-Sesma A, Ashour J.** Influenza A virus utilizes low affinity, high avidity interactions with the nuclear import machinery to ensure infection and immune evasion. *Journal of Virology*. 2018, 10.1128/JVI.01046-18.

- 109. Denney L, Ho LP.** The role of respiratory epithelium in host defence against influenza virus infection. *Biomedical Journal*. 2018, 41(4):218-233.
- 110. Lam WY, Yeung AC, Chu IM, Chan PK.** Profiles of cytokine and chemokine gene expression in human pulmonary epithelial cells induced by human and avian influenza viruses. *Virology Journal*. 2010, 26;7:344.
- 111. Peiró T, Patel DF, Akthar S, Gregory LG, Pyle CJ, Harker JA, Birrell MA, Lloyd CM, Snelgrove RJ.** Neutrophils drive alveolar macrophage IL-1 $\beta$  release during respiratory viral infection. *Thorax*. 2018, 73(6):546-556.
- 112. Camp JV, Jonsson CB.** A Role for Neutrophils in Viral Respiratory Disease. *Frontiers of Immunology*. 2017, 12;8:550.
- 113. Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA.** The acute respiratory distress syndrome. *The journal of clinical investigation*. 2012, 122(8): 2731–2740.
- 114. Dauber B, Wolff T.** Activation of the Antiviral Kinase PKR and Viral Countermeasures. *Viruses*. 2009, 1(3):523-44.
- 115. Dauber B, Martínez-Sobrido L, Schneider J, Hai R, Waibler Z, Kalinke U, García-Sastre A, Wolff T.** Influenza B virus ribonucleoprotein is a potent activator of the antiviral kinase PKR. *PLoS Pathogens*. 2009, 5(6):e1000473.
- 116. García-Sastre A, Biron CA.** Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in détente . *Science (New York, N.Y.)*. 2006, 12;312(5775):879-82.
- 117. Thomis DC, Samuel CE.** Mechanism of interferon action: evidence for intermolecular autophosphorylation and autoactivation of the interferon-induced, RNA-dependent protein kinase PKR. *Journal of Virology*. 1993, 67(12):7695-700.
- 118. Samuel, CE.** The eIF-2 alpha protein kinases, regulators of translation in eukaryotes from yeasts to humans. *The journal of biological chemistry*. 1993, 15;268(11):7603-6.
- 119. Li S, Min JY, Krug RM, Sen GC.** Binding of the influenza A virus NS1 protein to PKR mediates the inhibition of its activation by either PACT or double-stranded RNA. *Virology* . 2006, 349:13–21.
- 120. Levene RE, Gaglia MM.** Host Shutoff in Influenza A Virus: Many Means to an End. *Viruses*. 2018, 5;10(9).

**121. Pereira CF, Wise HM, Kurian D, Pinto RM, Amorim MJ, Gill AC, Digard P.** Effects of mutations in the effector domain of influenza A virus NS1 protein. *BMC Research notes*. 2018, 18;11(1):673.

**122. Hume A, Mühlberger E.** Marburg Virus Viral Protein 35 Inhibits Protein Kinase R Activation in a Cell Type-Specific Manner. *The journal of infectious diseases*. 2018, 28.

**123. Mateer EJ, Paessler S, Huang C.** Visualization of Double-Stranded RNA Colocalizing With Pattern Recognition Receptors in Arenavirus Infected Cells. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2018, Bd. 8, 251.

**124. Wolferstätter M, Schweneker M, Späth M, Lukassen S, Klingenberg M, Brinkmann K, Wielert U, Lauterbach H, Hochrein H, Chaplin P, Suter M, Hausmann J.** Recombinant modified vaccinia virus Ankara generating excess early double-stranded RNA transiently activates protein kinase R and triggers enhanced innate immune responses. *Journal of Virology*. 2014, Bd. 88, (24):14396-411.

**125. DA, Engel.** The influenza virus NS1 protein as a therapeutic target. *Antiviral research*. 2013, Bd. 99, (3):409-16.

**126. Trapp S, Soubieux D, Lidove A, Esnault E, Lion A, Guillory V, Wacquiez A, Kut E, Quéré P, Larcher T, Ledevin M, Nadan V, Camus-Bouclainville C, Marc D.** Major contribution of the RNA-binding domain of NS1 in the pathogenicity and replication potential of an avian H7N1 influenza virus in chickens. *Virology Journal*. 2018, Bd. 27, 15(1):55.

**127. Park HS, Liu G, Thulasi Raman SN, Landreth SL, Liu Q, Zhou Y.** NS1 Protein of 2009 Pandemic Influenza A Virus Inhibits Porcine NLRP3 Inflammasome-Mediated Interleukin-1 Beta Production by Suppressing ASC Ubiquitination. *Journal of Virology*. 2018, 28;92(8).

**128. Danielle E. Goodman, Carla D. Pretto, Tomas A. Krepostman, Kelly E. Carnahan, Katherine R. Spindler.** Enhanced Replication of Mouse Adenovirus Type 1 following Virus-Induced Degradation of Protein Kinase R (PKR). *American Society for Microbiology*. 2019, 10:e00668-19.

- 129. Pereira CF, Wise HM, Kurian D, Pinto RM, Amorim MJ, Gill AC, Digard P.** Effects of mutations in the effector domain of influenza A virus NS1 protein. *BMC Research Notes*. 2018, 11:673.
- 130. Mok BW, Liu H, Chen P, Liu S, Lau S, Huang X, Liu Y, Wang P, Yuen K, Chen H.** The Role of Nuclear NS1 Protein in highly pathogenic H5N1 Influenza Viruses. *Microbes and Infections*. 2017, (12):587-596.
- 131. Wang S, Zhang L, Zhang R, Chi X, Yang Z, Xie Y, Shu S, Liao Y, Chen J.** Identification of two residues within the NS1 of H7N9 influenza A virus that critically affect the protein stability and function. *Veterinary Research*. 2018, 49:98.

## Danksagung

Ich danke Prof. Werner Seeger für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit an der medizinischen Klinik II der JLU Giessen durchführen zu können.

Ich danke Prof. Dr. Susanne Herold PhD für die Überlassung des Themas und relevanter Vordaten, sowie die ausgezeichnete Unterstützung. Ich danke für die zahlreichen Anregungen, Hilfestellungen und Diskussion bei der Bearbeitung des Themas.

Ich danke dem Kooperationspartner PD Dr. Torsten Wolff, ohne den diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

Ein besonderer Dank gilt meinen Kollegen Christin Peteranderl, Katrin Högner, Larissa Hamann, sowie Margret Lohmeyer für die vor allem auch moralische Unterstützung. Außerdem danke ich Barbara Rösler, Jennifer Quantius, Balachandar Selvakumar und Oana Gottschald für fachliche Diskussionen und Hilfestellungen, die gemeinsame Zeit und den Spaß im Labor.

Irina Kuznetzova möchte ich auf diesem Wege herzlich danken, weil es immer schön und kurzweilig war über Experimente zu sprechen und Ergebnisse zu besprechen.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und allen Freunden danken, die mich unterstützt und in Durststrecken motiviert haben. Besonders danke ich meinem Sohn Elias für das viele Verständnis und die Geduld, wenn es im Labor mal wieder länger geworden ist. Ich danke Maik, der mich auf den letzten Schritten der Fertigstellung wunderbar unterstützt und angetrieben hat.

## **Erklärung zur Dissertation**

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt 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 sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommenes Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Gießen, den 11.07.2023

---

Julia Bespalowa