

Charakterisierung der Influenzavirus-Vermehrung in genetisch veränderten humanen Zelllinien zur Optimierung der Impfstoffproduktion

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

von Dipl. Biologin Mandy Bachmann

geboren am 26.07.1987 in Bautzen

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

Promotionskommission: Prof. Dr. rer. nat. habil. Helmut Weiß (Vorsitz)
Prof. Dr.-Ing. Udo Reichl (Gutachter)
Prof. Dr. Sven-Erik Behrens (Gutachter)
Dr. Ingo Jordan (Gutachter)

eingereicht am: 27.09.2019

Promotionskolloquium am: 01.08.2019

ZUSAMMENFASSUNG

Die Zellkultur-basierte Influenza-Impfstoffproduktion stellt eine vielversprechende Alternative sowohl zu klassischen Ei-basierten Produktionsverfahren als auch zur Produktion von rekombinanten Influenzavirus-Proteinen in Insektenzellen dar und wird seit mehreren Jahren mithilfe von MDCK- und Vero-Zellen erfolgreich durchgeführt. Um die Vielfalt möglicher Produktionssysteme zu erweitern und um eine optimale Immunogenität der erzeugten Impfstoffe zu gewährleisten, gewinnen humane Produktionszelllinien wie beispielsweise PER.C6-, CAP-, HEK293- und AGE1.HN-Zellen ebenfalls an Bedeutung. Bei der Verwendung humaner Zelllinien ist jedoch zu beachten, dass diese eine stark ausgeprägte antivirale Immunantwort gegenüber Influenzavirus-Infektionen ausbilden, welche die Virusproduktion einschränken können. Des Weiteren scheint die Virusproduktion durch zelluläre Schlüsselfaktoren limitiert zu sein, da wesentlich weniger Viren freigesetzt werden als intrazelluläre Ressourcen zur Verfügung stehen. Anhaltspunkte hierfür lieferten bereits Studien zu Wirtzellfaktoren, in denen durch den Knockdown, wie beispielsweise des Interferon- α/β -Rezeptors (Zelloberflächenrezeptor zur Bindung von Typ-I-Interferonen), bzw. durch die Überexpression, wie beispielsweise der α -2,6-Sialyltransferase (katalysiert den Transfer von Sialinsäuren von CMP-Sialinsäuren auf Galaktose-enthaltende Substrate, ermöglicht die Umwandlung von α -2,3- Sialinsäuren zu α -2,6- Sialinsäuren), die Virustiter gesteigert werden konnten.

Der erste Teil dieser Dissertation befasste sich daher mit der Fragestellung, ob die antivirale Immunantwort die Virusproduktion in humanen Produktionszelllinien sowie in Modellzelllinien limitiert. Als Produktionszelllinien kamen die humanen Zelllinien AGE1.HN (ProBioGen AG) und HEK293SF zum Einsatz, welche bereits erfolgreich für die Vermehrung von Influenzaviren getestet wurden. Als Modellzelllinien dienten A549- und HEK293-Zellen, welche sehr häufig für die Influenzavirus-Grundlagenforschung verwendet werden. Zunächst erfolgten Untersuchungen der antiviralen Immunantwort durch die Stimulation mit Interferon- β (einem Aktivator der antiviralen Immunantwort) sowie Infektionsversuche mit Influenzavirus A/PR/8/34 und einem deletierten Virusstamm, Influenzavirus delNS1, in Kombination mit Interferon- β -Stimulationen von HEK293-, HEK293SF-, AGE1.HN- und A549-Zellen. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede bei der Aktivierung der antiviralen MxA-Genexpression (Interferon-induzierte GTPase zur Abwehr von Virusinfektionen) sowie bei den erzielten Virustitern. So konnte weder nach einer direkten IFN-Stimulation noch im Rahmen einer Virusinfektion für die Zelllinien HEK293, HEK293SF und AGE1.HN eine Steigerung der antiviralen MxA-Genexpression beobachtet werden. Im Vergleich dazu zeigten A549-Zellen einen deutlichen Anstieg des MxA-Genexpressionslevels unter beiden Bedingungen. Des

weiteren kam es durch die Aktivierung der antiviralen Immunantwort zu einer Verzögerung der Virusproduktion (Gesamtvirustiter) bei den A549-Zellen. Anschließende Literaturrecherchen ergaben, dass es sich bei den verwendeten Produktionszelllinien (HEK293, HEK293SF und AGE1.HN) um adenoviral-transformierte Zelllinien handelt, welche u. a. die adenoviralen Gene E1A und E1B für die Zellimmortalisierung exprimieren. Im Gegensatz dazu erreichten A549-Zellen durch natürliche Mutationen ihren immortalisierten Zustand. Nachfolgende E1A- und E1B-Knockdownstudien mit HEK293- und AGE1.HN-Zellen zeigten deutlich, dass durch den Knockdown von E1A die MxA-Genexpression über die Stimulation mit Interferon- β gesteigert werden konnte. Infektionsversuche mit Interferon-sensitiven Virusstämmen (Vesicular-Stomatitis-Virus, Influenzavirus delNS1) zeigten zudem, dass sich diese adenoviral-transformierten Zelllinien aufgrund ihrer unterdrückten antiviralen Immunantwort gut für die Vermehrung von Interferon-sensitiven Viren eignen.

Der zweite Teil dieser Dissertation befasste sich mit der Fragestellung, ob durch eine gezielte Überexpression bzw. einen *short hairpin* RNA-vermittelten Knockdown von ausgewählten Wirtszellfaktoren die Virusvermehrung gesteigert werden kann. Die Auswahl der Genkandidaten basierte dabei auf den Ergebnissen eines genomweiten RNAi-Screens. Für die Erzeugung der Überexpressions- und Knockdownzelllinien mittels lentiviraler Transduktion wurde die A549-Modellzelllinie verwendet, welche in dem oben genannten RNAi-Screen zum Einsatz kam. Der Hauptfokus dieser Arbeit lag auf der Steigerung des Gesamtvirustiters. Leider konnte dieser durch keine der getesteten Überexpressions- und Knockdownzelllinien erreicht werden. Darauf folgende Studien der frühen Replikationssphase zeigten jedoch für einige Zelllinien Unterschiede in der Virusproduktionsdynamik. Basierend auf diesen Erkenntnissen erfolgte die Herstellung von Zelllinien mit mehreren Genüberexpressionen („Kombinationszelllinien“), wodurch die frühen Gesamtvirustiter weiter gesteigert werden konnten. Weiterführende molekularbiologische Analysen anhand von fünf Überexpressionszelllinien erlaubten anschließend die Aufstellung von Theorien über den Einfluss der untersuchten Genkandidaten auf die Influenzavirus-Replikation. Dabei erfolgte die Untersuchung des nukleären viralen Ribonukleoprotein-Komplex (vRNP)-Imports und vRNP-Exports mittels bildgebender Durchflusszytometrie, die Analyse der viralen RNA-Synthese mittels quantitativer reverser Transkription *real-time* PCR und die Bestimmung des viralen M1-, PA- und NP-Proteinlevels durch Western Blot-Analysen, wobei zum Teil deutliche Unterschiede zu den Kontrollzelllinien (parentale A549-Zelllinie und Überexpressions-Kontrollzelllinie) beobachtet werden konnten. Neben diesen Untersuchungen erfolgte die Generierung und Untersuchung von Einzelzell-basierten Zellpopulationen. Mithilfe dieser Methode konnte gezeigt werden, dass keine Korrelation zwischen einer starken Genüberexpression und gesteigerten frühen Gesamtvirustitern für die untersuchten Zelllinien

bestand. Eine anschließende Validierung der Ergebnisse in der humanen Produktionszelllinie AGE1.HN war geplant, konnte jedoch aus Zeitgründen nicht mehr umgesetzt werden.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Dissertation gezeigt werden, dass (1) die Influenza-Impfstoffproduktion in den derzeitig zur Verfügung stehenden adenoviral-transformierten, humanen Produktionszelllinien nicht durch die antivirale Immunantwort beeinträchtigt wird und (2), dass durch die Veränderung der Genexpression von Wirtszellfaktoren, v. a. durch eine gezielte Genkombination, ein früherer Anstieg der Virustiter erzielt werden kann, ein Steigerung des finalen Gesamtvirustiters jedoch nicht möglich ist.

ABSTRACT

Influenza vaccine production using cell-based systems has become an attractive alternative to well-established egg-based manufacturing as well as to the production of recombinant influenza virus proteins in insect cells due to advantages in scalability and flexibility in process scheduling. However, only two animal cell lines (Vero and MDCK) are currently approved and used for influenza vaccine production. To broaden the field of suitable production cell lines and to improve immunogenicity of influenza vaccines, human-derived production cell lines such as PER.C6-, CAP-, HEK293- and AGE1.HN cells are gaining importance. However, human cells are able to establish a strong antiviral immune response which might limit influenza virus production. In addition, influenza virus replication seems to be restricted by specific cellular bottlenecks while intracellular resources for precursors appear to be abundant. Evidence for this has already been provided by several studies where virus titres could be increased by either knockdown or overexpression of selected host cell factors, for example interferon- α/β receptor (cell surface receptor for type I interferon binding) and α -2,6-sialyltransferase (catalyses the transfer of sialic acid from CMP-sialic acid to galactose-containing substrates, turns α -2,3-linked sialic acids to α -2,6-linked sialic acids), respectively.

Therefore, the first part of this thesis addressed the question whether the antiviral immune response limits virus production in human production cell lines or other model cell lines. For this, we used the human production cell lines AGE1.HN (ProBioGen AG) and HEK293SF, which have already been successfully tested for the production of influenza viruses. Model cell lines were A549 and HEK293 cells, which are used frequently for basic influenza virus research. To investigate the influence of the antiviral immune response, HEK293, HEK293SF, AGE1.HN, and A549 cells were either stimulated with interferon- β (activator of antiviral immune response) or stimulated in combination with an influenza virus A/PR/8/34 or an influenza deletion strain (influenza virus delNS1) infection. Interestingly, for HEK293, HEK293SF and AGE1.HN only low MxA gene expression levels were detected in both experiments, whereas A549 cells established a much stronger antiviral response. In addition, virus production was delayed in interferon- β stimulated A549 cells. Subsequent literature research suggested a potential impact of adenoviral E1A and E1B protein expression on the antiviral immune response. In contrast to A549 cells, which spontaneously transformed by gene mutations, HEK293, HEK293SF and AGE1.HN cells were immortalized by adenoviral transformation and thereby express adenoviral protein E1A and E1B. Knockdown studies of E1A in HEK293 and AGE1.HN cells demonstrated a partial restoration of MxA gene expression. In addition, vesicular stomatitis virus and influenza virus delNS1 infection studies showed that these adenoviral transformed cell lines support replication of interferon sensitive viruses due to their impaired antiviral immune response.

The second part of this thesis addressed the question whether virus production can be increased by targeted overexpression or short hairpin RNA (shRNA)-mediated knockdown approaches of selected host cell factors. Selection of gene candidates was based on the results of a genome-wide RNAi screen performed in A549 cells. Production of overexpression and knockdown cell lines was performed by lentiviral transduction. First, the final concentration of virions (total virus titre) was analysed. However, none of the tested overexpression and knockdown cell lines displayed increased titres. Though, subsequent studies showed differences in early virus production or some cell lines. Based on these findings, cell lines with several gene overexpressions were produced, which further increased early total virus titres. To gain deeper insights in the biological background of these effects, different steps of influenza virus replication were analysed using imaging flow cytometry (vRNP nuclear import and export studies), quantitative reverse transcription real-time PCR (quantification of v/c/mRNA level of segment 5) and western blot analysis (determination of M1, PA and NP protein level). Thereby, clear differences of some overexpression cell lines compared to control cell lines (parental A549 cell line and overexpression control cell line) could be observed. In addition to these investigations, single cell-based cell populations were generated to analyse possible correlations between strong gene overexpression and increased early HA titres. However, this could not be confirmed. A subsequent validation of the results in AGE1.HN cells was planned but could not be implemented due to time constraints.

In summary, this thesis showed that (1) influenza vaccine production is not impaired by the antiviral immune response in currently available adenoviral-transformed human production cell lines and (2) that by altering gene expression of host cell factors, in particular by targeted gene combinations, early virus release can be achieved but an increase in final total virus titres was not possible.

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsberatung in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form als Dissertation eingereicht und ist als Ganzes auch noch nicht veröffentlicht.

Dresden, 15.03.2019

INHALTSVERZEICHNIS

1	Motivation und Aufgabenstellung	1
2	Theoretische Grundlagen.....	3
2.1	Das Influenzavirus	3
2.1.1	Klassifizierung von Influenzaviren	3
2.1.2	Aufbau von Influenza-A-Viren.....	3
2.1.3	Replikation von Influenza-A-Viren	6
2.1.4	Epidemiologie	11
2.1.5	Antivirale Medikamente	12
2.1.6	Influenza-Impfstoffe.....	13
2.2	Die Influenza-Impfstoffproduktion.....	16
2.2.1	Influenza-Impfstoffproduktion in embryonierten Hühnereiern.....	17
2.2.2	Die Zellkultur-basierte Impfstoffproduktion	17
2.3	Die angeborene Immunantwort	20
2.3.1	Induktion und Funktion des Interferonsystems	20
2.3.2	IFN-induzierte Genprodukte mit antiviraler Wirkung	22
2.3.2.1	Mx-Proteine.....	22
2.3.3	Virale Gegenmaßnahmen	23
2.3.3.1	Das Influenza NS1-Protein	23
2.3.3.2	Das Influenza PB1-F2-Protein.....	24
2.3.3.3	Das adenovirale Protein E1A	24
2.4	Zelltransformation durch adenovirale Proteine	25
2.5	Generierung genetisch modifizierter Zelllinien mittels lentiviraler Transduktion	26

2.6	Identifizierung von zellulären Schlüsselfaktoren für die Virusreplikation	27
2.6.1	Der RNAi-Mechanismus.....	27
2.6.2	RNAi-Screens	28
3	Material und Methoden	30
3.1	Zellkultivierung.....	30
3.1.1	Medien und Lösungen für die Zellkultivierung	30
3.1.2	Zelllinien.....	31
3.1.2.1	A549-Zellen.....	31
3.1.2.2	HEK293- und HEK293SF-Zellen	31
3.1.2.3	AGE1.HN-Zellen	32
3.1.3	Kultivierung und Passagierung von adhärenen Zelllinien	32
3.1.4	Kultivierung und Passagierung von Suspensionszelllinien	33
3.1.5	Auftauen von kryokonservierten Zelllinien	33
3.1.6	Einfrieren von Zellen	33
3.1.7	Zellzahlbestimmung mithilfe des <i>ViCell™ XR</i>	33
3.1.8	Bestimmung der spezifischen Zellwachstumsrate	34
3.2	Viruskultivierung.....	36
3.2.1	Medien für die Virusinfektion	36
3.2.2	Saatvirusproduktion	36
3.2.3	Verwendete Virusstämme	36
3.2.4	Virusinfektion	37
3.2.4.1	Zellaussaat.....	37
3.2.4.2	Infektion	37

3.2.4.3	Probenahme	39
3.3	Untersuchung der antiviralen Immunantwort	40
3.3.1	Stimulation der Zellen mit IFN- β	40
3.3.2	Knockdown adenoviraler Gene mithilfe von siRNAs	40
3.3.2.1	siRNA-Design	40
3.3.2.2	Transfektion von siRNAs	42
3.4	Untersuchung der Überexpressions- und Knockdownzelllinien	42
3.4.1	Virustiter-Screening von Zelllinien	44
3.4.2	Klonale Expansion	44
3.5	Analytik	46
3.5.1	Bestimmung der Gesamtvirustiter (HA-Assay)	46
3.5.2	Bestimmung der Konzentration infektiöser Viruspartikel (TCID ₅₀ -Assay)	46
3.5.3	Relative RNA-Quantifizierung mittels RevT-PCR	47
3.5.3.1	Probenahme	47
3.5.3.2	RNA-Isolation	47
3.5.3.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	47
3.5.3.4	Relative Quantifizierung zellulärer RNAs	47
3.5.3.4.1	Reverse Transkription der zellulären RNA	49
3.5.3.4.2	<i>Real-time</i> PCR zellulärer RNA-Proben	50
3.5.3.4.3	Berechnung der relativen Genexpression	51
3.5.4	Absolute Quantifizierung intrazellulärer viraler RNAs	51
3.5.4.1	Herstellung des RNA-Standards	51
3.5.4.2	Reverse Transkription intrazellulärer viraler RNAs	51

3.5.4.3	<i>Real-time</i> PCR intrazellulärer viraler RNAs	53
3.5.4.4	Berechnung der viralen RNA-Molekülanzahl	54
3.5.5	Untersuchung der viralen Proteinexpression	55
3.5.5.1	Probengewinnung	55
3.5.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	56
3.5.5.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot	56
3.5.5.4	Quantitative Auswertung von Western Blots.....	57
3.5.6	Untersuchung des vRNP-Imports und -Exports	58
3.5.6.1	vRNP-Import	58
3.5.6.2	vRNP-Export	58
3.5.7	Bildgebende Durchflusszytometrie (ImageStream® Mark II)	59
3.5.7.1	Untersuchung der GFP-Expression.....	59
3.5.7.1.1	Probengewinnung für die GFP-Expressionsmessung	59
3.5.7.1.2	Messung der GFP-Expression	59
3.5.7.1.3	Auswertung der GFP-Expression.....	60
3.5.7.2	Probengewinnung für DAPI- und Antikörperfärbungen	60
3.5.7.2.1	Immunologische Färbungen.....	61
3.5.7.2.2	Messung der gefärbten Proben.....	62
3.5.7.2.3	Auswertung der gefärbten Proben.....	62
3.6	Statistik	64
3.6.1	Shapiro-Wilk-Test.....	64
3.6.2	Mann-Whitney-U-Test	64
4	Ergebnisse und Diskussion	66

4.1	Statistische Auswertung der Daten	66
4.2	Einfluss des IFN-Systems auf die Influenzavirus-Vermehrung in humanen Zelllinien	66
4.2.1	IFN-vermittelte Stimulation der angeborenen Immunantwort	66
4.2.2	Influenzavirus-Replikation in den verwendeten humanen Zelllinien	68
4.2.3	Untersuchung der E1A- und E1B-Genexpression	71
4.2.4	siRNA-vermittelter Knockdown von E1A und E1B	72
4.2.5	Infektion von E1A Knockdownzellen mit Influenza deINS1 Virus	74
4.2.6	Replikation IFN-sensitiver Viren in Ad _t - und nicht-Ad _t -Zelllinien	75
4.3	Auswahl der Genkandidaten	80
4.4	Experimentelle Charakterisierung der Influenzavirus-Vermehrung in genetisch modifizierten Zelllinien.....	83
4.4.1	Analyse der Virusvermehrung in Knockdown- und Überexpressionszelllinien .	83
4.4.1.1	Untersuchung der finalen Gesamtvirustiter von Influenzavirus A/PR/8/34-Infektionen	83
4.4.1.2	Untersuchung der Gesamtvirustiter von Influenzavirus A/WSN/33-Infektionen	85
4.4.1.3	Untersuchung früher Gesamtvirustiter von Influenza A/PR/8/34-Infektionen	87
4.4.1.4	Untersuchung früher Gesamtvirustiter von Influenza A/WSN/33-Infektionen	89
4.4.1.5	Validierung der C6orf1- und GRAMD4-Knockdownzelllinien	93
4.4.2	Bestimmung der spezifischen Zellwachstumsraten	97
4.4.3	Bewertung der Zelllinien	99
4.4.4	Detailstudien der vielversprechenden Zelllinien.....	102

4.4.4.1	Untersuchung der infektiösen Virustiter nach Infektion mit Influenzavirus A/PR/8/34.....	102
4.4.4.2	Infektion mit Influenzavirus A/PR/8/34 mit einer MOI von 1	103
4.4.4.3	Analyse der Virusvermehrung in Einzelzell-basierten Zellpopulationen ..	104
4.4.5	Analyse der Virusvermehrung in Kombinations-Überexpressionszelllinien	111
4.4.6	Molekularbiologische Untersuchungen der vielversprechenden Zelllinien	114
4.4.6.1	Untersuchung des vRNP-Imports.....	115
4.4.6.2	Untersuchung des vRNP-Exports.....	116
4.4.6.3	Untersuchung der viralen RNA-Synthese.....	118
4.4.6.4	Untersuchung der viralen PA-, M1- und NP-Proteinexpression	120
5	Ausblick	131
6	Verzeichnisse	133
6.1	Literaturverzeichnis.....	133
6.2	Abbildungsverzeichnis	156
6.3	Tabellenverzeichnis	159
6.4	Formeln, Symbole und Einheiten	162
7	Anhang	165
7.1	Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	165
7.2	Verwendete Chemikalien und Kits.....	168
7.3	Anlagen Statistik	170
7.3.1	Kritische U-Werte	170
7.3.2	Kleinstmögliche p-Werte (zweiseitig).....	171
7.3.3	Übersicht möglicher statistischer Testverfahren	172

7.4	Arbeitsanweisungen.....	173
	SOP V/05 Hemagglutination assay (HA assay)	173
	SOP V/08: Bestimmung des TCID50	173
	SOP MoBi/01: Western Blot mit anschließender Immundetektion	173
	SOP MoBi/02: Preparation of RNA standards	173

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
Ad5	Adenovirus Typ 5
Ad _t	adenoviral transformiert
AEM	<i>adenovirus expression medium</i>
Ago	Argonaut-Protein
BSA	Rinderserumalbumin
CAP	<i>amniocyte derived cell line</i>
CBP	<i>CREB binding protein</i>
cDNA	komplementäre DNA
CHX	Cycloheximid
CRISPR/Cas	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR-associated protein</i>
CRM1	<i>chromosomal maintenance 1</i> , zelluläres Exportprotein
cRNA	<i>complementary RNA</i> , komplementäre RNA
CT	<i>cycle of treshold</i> , Schwellenwert
delNS1	Influenzavirus Deletionsmutante NS1
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsRNA	<i>double stranded RNA</i> , doppelsträngige RNA
E1A	<i>early region 1 A protein</i>
E1B	<i>early region 1 B protein</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF1-alpha	<i>human elongation factor-1 alpha</i>
eGFP	<i>enhanced GFP</i>
eIF2a	eukaryotischer Initiationsfaktor 2a
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMCV	Encephalomyocarditis-Virus
ER	Endoplasmatischen Retikulum
FI	Fluoreszenzintensität
FKS	fetales Kälberserum
G418	Geneticin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
GOI	<i>gene of interest</i> , Zielgen
HA	Hämagglutinin
HA-Assay	Hämagglutinationshemmtest

Abkürzung	Bedeutung
HCD	<i>high cell density</i> , Hochzelldichte
HDR	<i>homology-directed repair</i>
HEK293	<i>human embryonic kidney 293 cell line</i> , humane Nierenzelllinie 293
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
hpi	<i>hours post infection</i>
HZI	Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
IAV	Influenza-A-Virus
IBV	Influenza-B-Virus
ICV	Influenza-C-Virus
IFN	Interferon
IFNAR1	Interferon- α/β -Rezeptor
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
IRF-3	<i>interferon regulatory factor 3</i>
IRF-9	<i>interferon regulatory factor 9</i>
JAK/STAT	<i>Janus kinase / signal transducers and activators of transcription</i>
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LV	Lentiviraler Vektor
M1	Matrixprotein 1
M2	membranständiger Ionenkanal bei Influenzaviren
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney cell line</i> , Hundenierenzellen
MFI	<i>mean fluorescent intensity</i>
miRNAs	<i>microRNAs</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MPI-IB	Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
mvRNAs	<i>mini viral RNAs</i> , kleine virale RNAs
Mx	<i>myxovirus resistance proteins</i>
N40	Protein mit unbekannter Funktion
NA	Neuraminidase
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumphosphat
NaCl	Natriumchlorid
Neo	Neomycinresistenz
NEP	<i>nuclear export protein</i> , Kernexportprotein
NF- κ B	<i>nuclear factor-κB</i>
NGS	<i>next generation sequencing</i>
NHEJ	<i>nonhomologous end joining</i>
nicht-Ad _t	nicht-adenoviral transformiert
NLRP3	<i>NOD-like receptor family pyrin domain containing 3</i>

Abkürzung	Bedeutung
NP	Nukleoprotein
NRT	<i>no-reverse transcriptase control</i> , Kontrolle ohne Zugabe von reverser Transkriptase
NS1	<i>nonstructural protein 1</i>
NTC	<i>no template control</i> , Kontrolle ohne DNA/RNA-Zugabe
OAS	<i>oligoadenylate synthetase</i>
PA	<i>polymerase acidic protein</i> , saure Polymeraseuntereinheit
PAMP	<i>pathogen-associated marker pattern</i>
PB1	<i>polymerase basic protein 1</i> , basische Polymeraseuntereinheit 1
PB1-F2	<i>PB1 Frame 2</i> , PB1 Leserahmen 2
PB2	<i>polymerase basic protein 2</i> , basische Polymeraseuntereinheit 2
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	<i>phosphatidylinositol 3 kinase</i>
PKR	<i>protein kinase R</i> , Proteinkinase R
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
qRevT	<i>quantitative reverse Transkription</i>
RdRp	<i>RNA dependend RNA polymerase</i> , RNA-abhängigen RNA-Polymerase
RevT	Reverse Transkription
RFP	rot-fluoreszierendes Protein
RIG-I	<i>retinoic acid inducible gene-I</i>
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
ROI	<i>region of interest</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
shRNAs	<i>short hairpin RNAs</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
ss	<i>single stranded</i> , einzelsträngig
ssRNA	<i>single stranded RNA</i> , einzelsträngige RNA
STAT1	<i>signal transducer and activator of transcription 1</i>
TALEN	<i>transcription activator-like effector nucleases</i>
TCID ₅₀	<i>50 % tissue culture infective dose</i>
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptoren
Vero	Nierenzellen von Grünen Meerkatzen

Abkürzung	Bedeutung
vRNA	genomische virale RNA
vRNP	viraler Ribonukleoprotein-Komplex
VSV	Vesikular-Stomatitis-Virus
WHO	<i>World Health Organisation</i> , Weltgesundheitsorganisation
ZNF	Zinkfinger-Nukleasen

1 MOTIVATION UND AUFGABENSTELLUNG

Influenzaviren führen zu globalen Epidemien und Pandemien und infizieren jährlich Millionen von Menschen mit 290.000 bis 650.000 Todesopfern (WHO, 2018). Den besten Schutz und die effizienteste Strategie zur Vermeidung von Influenzavirus-Infektionen stellt die jährliche Influenza-Impfung dar. Aufgrund der sich ständig verändernden Influenzavirus-Stämme muss der Impfstoff jedoch jährlich angepasst werden (Milian und Kamen, 2015). Um zum einen die weltweit steigende Nachfrage an Influenza-Impfstoffen zu bedienen und um zum anderen im Falle einer weltweiten Pandemie den sprunghaft erhöhten Bedarf an Impfstoffen kurzfristig decken zu können, gewinnen Zellkultur-basierte Impfstoffproduktionssysteme immer mehr an Bedeutung und stellen eine attraktive Alternative zur konventionellen Produktion in embryonierten Hühnereiern sowie der Produktion von Influenzavirus-Proteinen in Insektenzellen dar (Milian und Kamen, 2015). Bisher wurden die zwei kontinuierlichen Zelllinien *Madin-Darby canine kidney* (Nierenzellen von Hunden, MDCK) und Vero (Nierenzellen von Grünen Meerkatzen) für die Produktion von Influenza-Impfstoffen zugelassen (Lee und Hu, 2012). Weitere Produktionszelllinien, wie beispielsweise PER.C6-, CAP-, *Human Embryonic Kidney* (HEK) 293-, AGE1.CR- und EB66-Zellen, wurden ebenfalls für die Produktion von Influenza-Impfstoffen getestet, besitzen jedoch noch keine Zulassung (Pau u. a., 2001; Le Ru u. a., 2010; Petiot u. a., 2011; Genzel u. a., 2012; Milian und Kamen, 2015). Bei PER.C6-, CAP- und HEK293-Zellen handelt es sich um humane Zelllinien, welche neben der Kultivierung im Großmaßstab auch die Vermehrung der Influenzaviren in einem wirtszellspezifischen Produktionssystem ermöglichen (Pau u. a., 2001; Petiot u. a., 2011; Genzel u. a., 2012). Neben der Verwendung geeigneter Produktionszelllinien und der Optimierung von Kultivierungsbedingungen (Genzel und Reichl, 2009) stellt die Identifikation zellulärer Schlüsselfaktoren einen Ansatzpunkt zur Steigerung der Virustiter dar. Berechnungen aus einer Studie basierend auf MDCK-Daten zeigten beispielsweise, dass nur ein Bruchteil der in der Zelle zur Verfügung stehenden Ressourcen für die Influenzavirus-Produktion genutzt wird (Sidorenko und Reichl, 2004). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass bestimmte Schlüsselfaktoren während der Virusreplikation die Virusproduktion limitieren. Um diese Schlüsselfaktoren zu identifizieren, sollten im Rahmen des Verbundprojektes *CellSys* am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) in Braunschweig und am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie (MPI-IB) in Berlin Zelllinien mittels lentiviraler Transduktion hergestellt werden, welche ausgewählte Wirtszellfaktoren überexprimieren bzw. einen Knockdown von bestimmten Faktoren aufweisen. Als Grundlage diente der genomweite RNA-Interferenz-Screen (RNAi-Screen) von Karlas und Kollegen. Bei diesem Screen wurden 168 zelluläre Proteine, welche anscheinend die Influenzavirus-

Replikation unterstützen (Überexpressionskandidaten) sowie weitere 25 Proteine, die einen gegenteiligen Effekt auf die Influenzavirus-Replikation ausüben (Knockdownkandidaten), identifiziert (Karlas *u. a.*, 2010). Nach Eingrenzung der potentiellen Überexpressionskandidaten auf eine überschaubare Menge an zellulären Faktoren, sollte durch das Einbringen von Genüberexpressionskassetten bzw. spezifischer *short hairpin* RNAs (shRNAs) mittels lentiviraler Transduktion die Genexpression in der humanen Modellzelllinie A549 gezielt verändert und anschließend im Rahmen dieser Arbeit die erzielten Virustiter analysiert werden. Neben der Untersuchung zellulärer Schlüsselfaktoren für die Virusreplikation sollte auch der Einfluss der antiviralen Immunantwort auf die Influenzavirus-Vermehrung in humanen Produktionszelllinien untersucht werden. Nach der Infektion von Zellen mit Influenzaviren kommt es in der Regel zur Aktivierung des Typ-I IFN-Systems der angeborenen Immunantwort und somit zur Expression antiviraler Proteine (Ehrhardt *u. a.*, 2010). Diese antiviralen Proteine besitzen vielseitige Funktionen, um die Ausbreitung der Virusinfektion einzudämmen (Stark *u. a.*, 1998; Haller, Kochs und Weber, 2006; Ehrhardt *u. a.*, 2010). Dem entgegen stehen vom Virus produzierte multifunktionale Antagonisten, wie beispielsweise das NS1-Protein (Ehrhardt *u. a.*, 2010; Garcia-Sastre, 2011). In dieser Arbeit sollte deshalb ermittelt werden, inwieweit sich die Aktivierung der antiviralen Immunantwort auf die Influenzavirus-Produktion in humanen Modell- und Produktionszelllinien auswirkt.

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.1 DAS INFLUENZAVIRUS

2.1.1 KLASSIFIZIERUNG VON INFLUENZAVIREN

Influenzaviren gehören zur Familie der *Orthomyxoviridae* und zeichnen sich durch ein einzelsträngiges (*single stranded*, ss), segmentiertes Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*, RNA)-Genom mit negativer Polarität aus. Sie werden in die drei Typen Influenza-A-Virus (IAV), Influenza-B-Virus (IBV) und Influenza-C-Virus (ICV) unterteilt (Fields *u. a.*, 2001). Weiterhin erfolgt eine Untergliederung der IAV in Subtypen anhand der Glykoproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA). Bisher konnten insgesamt 18 verschiedene HA und 11 verschiedene NA-Subtypen identifiziert werden (Tong *u. a.*, 2013; Paules und Subbarao, 2017). IAV können eine Vielzahl von Organismen infizieren, wie beispielsweise Vögel, Schweine, Pferde und Menschen. Im Gegensatz dazu scheint das Wirtsspektrum von IBV und ICV begrenzt zu sein. Bisher konnten IBV-Infektionen nur bei Menschen und Robben und ICV-Infektionen nur bei Menschen, Schweinen und Hunden beobachtet werden (Fields *u. a.*, 2001; Bodewes *u. a.*, 2013; Wang und Veit, 2016). Bei der Entstehung von saisonalen Epidemien und Pandemien spielen nur IAV und IBV eine Rolle, da ICV-Infektionen meist sehr mild verlaufen und somit der Ausbruch einer Epidemien unwahrscheinlich ist (Paules und Subbarao, 2017). Die Benennung der Influenzaviren erfolgt nach der systematischen Nomenklatur (Virustyp/Spezies aus der das Virus isoliert wurde (wenn nicht-human)/Standort wo das Virus isoliert wurde/Isolatnummer/Jahr der Isolation/HA- und NA-Subtyp (nur bei IAV)) (Bouvier und Palese, 2008).

2.1.2 AUFBAU VON INFLUENZA-A-VIREN

IAV besitzen eine vielseitige Gestalt und weisen einen Durchmesser von ungefähr 100 nm auf. Die Virushülle besteht aus einer Lipiddoppelschicht, welche von der Wirtszellmembran abstammt und in die die drei Transmembranproteine HA, NA und der Ionenkanal M2 eingebettet sind. Die Lipiddoppelschicht weist eine mosaikartige Struktur mit cholesterinreichen *lipid rafts* und *non-raft* Lipiden auf (Bouvier und Palese, 2008; Nayak *u. a.*, 2009). Unter dieser äußeren Hülle befindet sich eine Schicht aus Matrixproteinen (M1), die der Abgrenzung des Virionkerns dient. Das IAV-Genom liegt in Form von acht viralen Ribonukleoprotein (vRNP)-Komplexen vor und kodiert für mindestens 17 Proteine, welche *u. a.* durch alternative offene Leseraster und alternative Spleißvorgänge gebildet werden (siehe Tabelle 1) (Wang und Veit, 2016; Paules und Subbarao, 2017). Die vRNPs setzen sich aus der viralen RNA, aus Nukleoproteinen (NPs) sowie einer heterotrimären RNA-abhängigen

RNA-Polymerase (RdRp), bestehend aus zwei basischen Untereinheiten (PB1, PB2) und einer sauren Untereinheit (PA), zusammen. Die Numerierung der einzelnen Segmente erfolgt nach deren Länge, beginnend mit dem längsten Segment (Segment 1, PB2). Des weiteren befinden sich geringe Mengen des nukleären Exportproteins (NEP) im Viruskern (Bouvier und Palese, 2008). Eine schematische Darstellung über den Aufbau eines IAV ist in Abbildung 1 dargestellt.

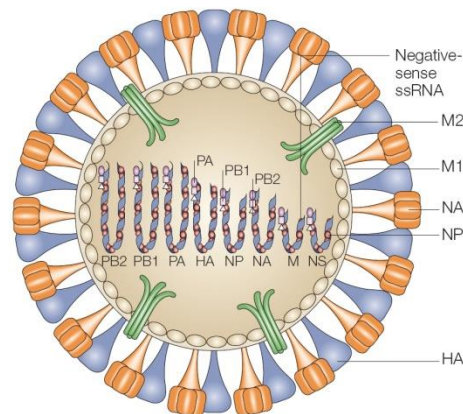


Abbildung 1: Aufbau eines Partikels des Influenza-A-Virus (Clancy, 2008).

Tabelle 1: Genomstruktur von IAV am Beispiel des Influenzavirus-Stammes A/PuertoRico/8/1934 (A/PR/8/34)

Segment	Protein	Name	AA ¹	Funktion
1	PB2	Basische Polymeraseuntereinheit 2	759	Polymeraseuntereinheit, Erkennung der Cap-Bindestelle
2	PB1	Basische Polymeraseuntereinheit 1 Leserahmen 1	757	Polymeraseuntereinheit, Elongation
	PB1-F2	PB1 Leserahmen 2	87	Pro-apoptotische Aktivität, Interferon (IFN)-Antagonist
	N40	-	718	Unbekannte Funktion

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN – DAS INFLUENZAVIRUS

Segment	Protein	Name	AA ¹	Funktion
3	PA	Saure Polymeraseuntereinheit	716	Polymeraseuntereinheit, Endonukleaseaktivität, Protease
4	HA	Hämagglutinin	560	Oberflächenglykoprotein, Rezeptorbindung, Fusionsaktivität, Hauptantigen, Virusassemblierung und Virusfreisetzung
5	NP	Nukleoprotein	498	RNA-Bindung, RNA-Synthese, Import der vRNPs in den Zellkern
6	NA	Neuraminidase	454	Oberflächenglykoprotein, Neuraminidaseaktivität
7	M1	Matrixprotein Leserahmen 1	252	Matrixprotein, Interaktion mit RNPs und Glykoproteinen, Export der vRNPs aus dem Kern in das Zytoplasma, Virusassemblierung und Virusfreisetzung
	M2	Membranprotein Leserahmen 2	97	Membranprotein, Ionenkanalaktivität, Virusassemblierung und Virusfreisetzung
8	NS1	Nichtstrukturprotein 1 Leserahmen 1	230	Multifunktionales Protein, IFN-Antagonist
	NEP	Kernexportprotein Leserahmen 2	121	Export der vRNPs aus dem Kern in das Zytoplasma, Regulation der RNA-Synthese

¹ AA – Aminosäuren

2.1.3 REPLIKATION VON INFLUENZA-A-VIREN

Die einzelnen Schritte des IAV-Replikationszyklus sind in der folgenden Abbildung 2 schematisch dargestellt und werden anschließend kurz erläutert.

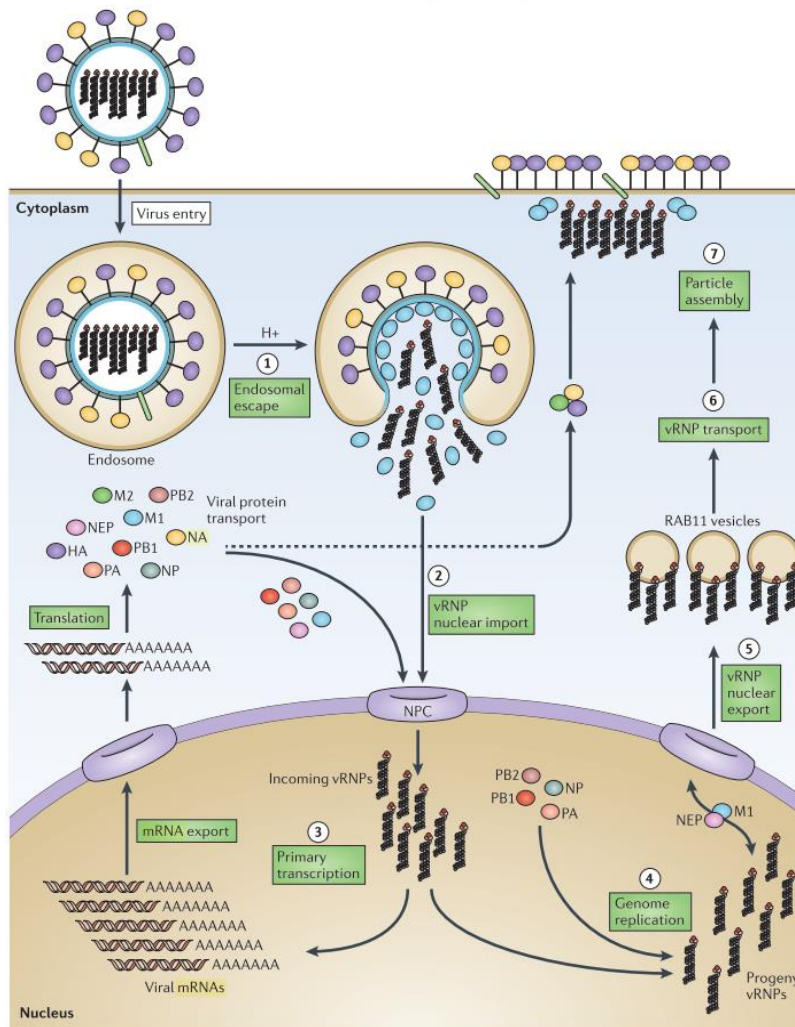


Abbildung 2: Schematische Darstellung des IAV-Replikationszyklus nach dem Viruseintritt. 1) Freisetzung des IAV-Genoms (vRNPs) in das Zytoplasma, 2) vRNP-Kernimport, 3) Transkription, 4) Genomreplikation, 5) vRNP-Kernexport, 6) vRNP-Transport zur Wirtszellplasmamembran, 7) Zusammenbau der Nachkommenviren. Die dargestellten Vorgänge sind im nachfolgenden Text erläutert (Eisfeld, Neumann und Kawaoka, 2015).

Anlagerung

Die Replikation beginnt mit der Anlagerung des Virus an die Zelloberfläche. Dabei binden die HA-Moleküle je nach Spezifität an Sialinsäure-Rezeptoren auf der Wirtszelloberfläche. Die Sialinsäuren von humanen Epithelzellen sind vorrangig α -2,6-verknüpft, wohingegen Vögel zum Großteil α -2,3-Verknüpfungen aufweisen (Bouvier und Palese, 2008; Jakubcová, Hollý und Varečková, 2016). Trotz der vorrangigen Expression von α -2,6-Verbindungen, sind beim

Menschen auch α -2,3-Verbindungen, vor allem im unteren Teil des respiratorischen Traktes (Bronchien und Alveolen), zu finden. Dies führt dazu, dass aviäre Viren den Menschen nur mit einer sehr geringen Effizienz befallen können (Bouvier und Palese, 2008).

Virusaufnahme, Genomfreisetzung und Kernimport (Schritt ① und ②)

Nach der erfolgreichen Bindung der HA-Proteine an die zellulären Sialinsäuren wird das Virus durch Endozytose von der Zelle aufgenommen (Bouvier und Palese, 2008). Die Freisetzung der vRNPs aus dem endosomalen Vesikel erfolgt anschließend durch aufeinander abgestimmte Funktionen der viralen HA-Moleküle und M2-Proteinkanäle. Zunächst erfolgt die Ansäuerung des endosomalen Vesikels (pH-Wert 5.0 bis 6.0) durch zelluläre Protonenpumpen, was zu einer Konformationsänderung der HA-Moleküle führt. Dies ermöglicht die Fusion der viralen mit der endosomalen Membran, wodurch der Viruspartikel Zugang zum Zytoplasma erhält. Zudem führt der niedrige pH-Wert innerhalb der endosomalen Vesikel zur Aktivierung der viralen M2-Ionenkanäle und somit zum Anstieg der Protonenkonzentration innerhalb des Virus. Es folgt die Dissoziation der vRNPs von der Virionenmatrix, welche vorrangig aus M1-Proteinen besteht. Diese Freisetzung der vRNPs von den M1-Proteinen ist essentiell für den Transport der vRNPs vom Zytoplasma in den Zellkern. Dieser Transport der vRNPs erfolgt anschließend durch Kernimportsequenzen an den viralen Proteinen über den klassischen Importin- α -Importin- β 1-abhängigen Kernimportweg (Nieto *u. a.*, 1994; Bouvier und Palese, 2008; Einfeld, Neumann und Kawaoka, 2015; Jakubcová, Hollý und Varečková, 2016).

Transkription und Replikation (Schritt ③ und ④)

Im Zellkern findet anschließend die Transkription und Replikation des viralen Genoms statt. Die RdRp nutzt dabei die virale RNA (vRNA, Negativstrang) als Vorlage für die Synthese der *messenger* RNA (mRNA, Positivstrang) und *complementary* RNA (cRNA, Positivstrang). Die mRNA bildet die Vorlage für die virale Proteinsynthese und die cRNA ist ein Zwischenprodukt für die Transkription weiterer Kopien der vRNA (Bouvier und Palese, 2008). Den ersten Schritt der Transkription bildet die Bindung der Polymeraseuntereinheit PB2 an das 5'-Ende von Wirtszell-mRNAs. Durch einen Prozess, welcher als *Cap-snatching* bezeichnet wird, kommt es zu einem Schnitt der zellulären mRNA 10 bis 15 Nukleotide abwärts von der RNA *Cap*-Struktur durch die endonukleolytische Aktivität der PA-Untereinheit. Diese kurzen Oligomere werden anschließend von der PB1-Untereinheit als Primer für die Transkription der viralen mRNA benutzt (Nayak *u. a.*, 2009; Reich *u. a.*, 2014; Einfeld, Neumann und Kawaoka, 2015). Es wird vermutet, dass der Prozess des *Cap-snatching* durch die Bindung der konservierten

Enden der vRNA an die Polymerase reguliert wird (Guilligay *u. a.*, 2014). Im Gegensatz zu der Wirtszell-mRNA, welche durch eine spezielle Poly(A)-Polymerase polyadenyliert wird, wird der Poly(A)-Schwanz der viralen mRNA durch eine uracilreiche Sequenz (fünf bis sieben Wiederholungen) von der vRNA kodiert, welche nach der Umschreibung in den Plusstrang einen Strang an Adenosinen als Poly(A)-Schwanz bildet. Nach der Anlagerung der *Cap*-Struktur sowie der Polyadenylierung wird die virale mRNA gegebenenfalls post-transkriptional modifiziert (z. B. Spleißen der RNA), in das Zytoplasma exportiert und dort durch die zellulären Ribosomen translatiert (Bouvier und Palese, 2008; Reich *u. a.*, 2014; Einfeld, Neumann und Kawaoka, 2015). Anschließend wird ein Teil dieser Proteine (NP, PA, PB1, PB2, NEP, M1) zurück in den Zellkern transportiert, wo sie zu neuen vRNP-Komplexen zusammengesetzt werden. Die verbleibenden Proteine HA, NA und M2 werden nach ihrer Synthese in das Endoplasmatische Retikulum (ER) transloziert. Dort erfolgt die korrekte Faltung der Proteine sowie ein Teil der posttranslationalen Modifikationen. Im Anschluss werden diese Proteine zum Golgi-Apparat transportiert, wo sie mit weiteren post-translationalen Modifikationen versehen werden, bevor der abschließende Transport zur Wirtszellplasmamembran erfolgt. Für die Replikation des viralen Genoms wird eine vollständig zur vRNA komplementäre RNA, die cRNA, synthetisiert, welche als Vorlage für die vRNA-Synthese dient. Die Initialisierung der Synthese erfolgt dabei durch einen Primer-unabhängigen (*de novo*) Prozess (Oymans und te Velhuis, 2017; Pflug *u. a.*, 2017). Des Weiteren weist die cRNA keine Polyadenylierung auf. Ob eine Umschaltung von der mRNA-Transkription (Proteinbildung) auf die cRNA-Synthese (Vorlage für die Genombildung) notwendig ist und wie diese im Detail funktioniert oder ob beide Prozesse bis zu einem gewissen Grad parallel ablaufen können, wurde bisher noch nicht abschließend geklärt und ist Thema aktueller Studien. Ein Modell von Vreede und Kollegen (Vreede, Jung und Brownlee, 2004) verfolgt beispielsweise die Theorie, dass keine Umschaltung von der Transkription (mRNA-Synthese) auf die Replikation (cRNA-Synthese) stattfindet. Ihrer Theorie nach erfolgt die Synthese beider RNA-Spezies gleichzeitig, jedoch wird die nackte cRNA so lange von zellulären Nukleasen abgebaut bis diese durch die neu gebildeten viralen RNA-Polymerasen und die NP-Proteine geschützt werden kann (Vreede, Jung und Brownlee, 2004). Eine Studie von Perez und Kollegen (Perez *u. a.*, 2010) stellte hingegen die Theorie auf, dass kleine regulatorische RNAs (*small viral RNAs* – svRNAs) bei der Umschaltung der RdRp von einer Transkriptase zu einer Replikase beteiligt sind (Perez *u. a.*, 2010).

vRNP-Export und Zusammenbau neuer Viruspartikel (Schritt ⑤, ⑥ und ⑦)

Nach der Replikation müssen die neu gebildeten vRNP-Komplexe in das Zytoplasma transportiert werden. Dafür werden die zwei viralen Proteine M1 und NEP benötigt. Diese besitzen nukleäre Exportsequenzen und können somit über das zelluläre Exportprotein *chromosomal maintenance 1* (CRM1) die vRNP-Komplexe in das Zytoplasma transportieren (Bui *u. a.*, 2000; Einfeld, Neumann und Kawaoka, 2015; Li *u. a.*, 2015). Wie der anschließende Transport zu den *lipid raft*-Domänen der Wirtszellplasmamembran von den vRNPs zusammen mit M1 im Detail stattfindet, ist bisher noch nicht abschließend geklärt. Für M1 wurde bisher noch kein apikales Sortierungssignal identifiziert, jedoch gibt es Erkennungssequenzen für Lipidbindungen, für RNA/RNP/NP-Bindungen (Noton *u. a.*, 2007) und für Interaktionen mit den transmembranen Domänen und zytoplasmatischen Enden von HA und NA (Ali *u. a.*, 2000). Neben dem eigentlichen Transportprozess muss zudem eine Navigation der vRNP-Komplexe durch die dichte Matrix der zytoplasmatischen Strukturen zur Wirtszellplasmamembran erfolgen. Es wird vermutet, dass die vRNPs auf dem Mikrotubulinetzwerk zusammen mit *Ras-related protein Rab-11* (RAB11)-positiven Recyclingendosomen transportiert werden. Der Transport der Hüllproteine zu den *lipid raft*-Domänen der Wirtszellplasmamembran erfolgt über ein apikales Sortierungssignal, welches sich in deren Transmembrandomänen oder in den zytoplasmatischen Enden befindet (Mora *u. a.*, 2002; Bouvier und Palese, 2008; Rossman und Lamb, 2011). Nach dem Transport dieser Komponenten ist für die Bildung neuer infektiöser Viruspartikel entscheidend, dass die Hüllproteine, alle acht vRNPs sowie die M1-Proteine zusammen in ein Viruspartikel verpackt werden (Nayak *u. a.*, 2009). Für die Verpackung der vRNP-Segmente bestehen derzeit zwei Theorien (Abbildung 3A). Die erste Theorie basiert auf einer zufälligen Verpackung der vRNP-Segmente, wobei zwar ein spezifischer Einbau von viralen vRNP-Segmenten (kein Einbau von zellulärer RNA) in die neuen Viruspartikel erfolgt, jedoch keine Differenzierung dieser stattfindet (Einfeld, Neumann und Kawaoka, 2015). Somit erfolgt der Einbau der vRNP-Segmente rein zufällig und infektiöse Viren entstehen nur, wenn mindestens eine Kopie eines jeden vRNP-Segmentes in das neue Viruspartikel eingebaut wird (Bancroft und Parslow, 2002; Noda und Kawaoka, 2012). Die zweite Theorie, welche vor allem durch aktuelle Studien unterstützt wird, geht davon aus, dass jedes vRNP-Segment eine spezifische zweigliedrige Sequenz an dem 5'- und 3'-Ende aufweist, welche neben den konservierten Promotorsequenzen auch Segment-spezifische, nicht-kodierende Regionen besitzt und somit eine spezifische Selektion der einzelnen vRNP-Segmente ermöglicht. Dadurch wird nur eine Kopie eines jeden Genomsegmentes in das Virus eingebaut (Noda und Kawaoka, 2010; Noda *u. a.*, 2018). Ob diese neu synthetisierten vRNP-Segmente nach dem Kernexport einzeln (Chou *u. a.*, 2013) oder als vRNP-Bündel (Lakdawala *u. a.*, 2014) zur Wirtszellplasmamembran transportiert werden, konnte bisher noch nicht

abschließend geklärt werden. Elektronenmikroskopie-Studien zeigen zudem, dass die eingebauten vRNP-Segmente in einer „1+7“-Formation vorliegen, wobei sieben vRNP-Segmente mit unterschiedlicher Länge ein zentrales vRNP-Segment ummanteln (Fournier *u. a.*, 2012; Noda *u. a.*, 2012, 2018; Giese, Bolte und Schwemmle, 2016). Eine schematische Darstellung dieser „1+7“-Formation ist in Abbildung 3B dargestellt.

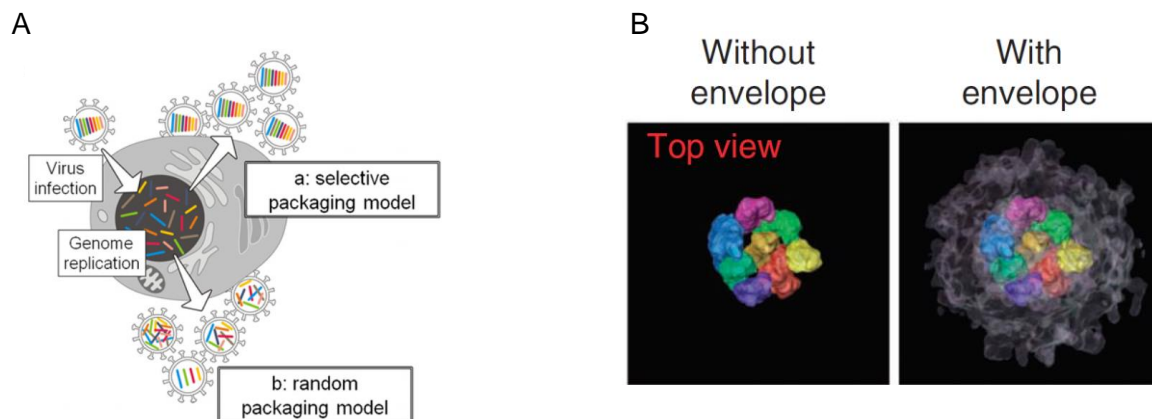


Abbildung 3: vRNP-Verpackungsmodelle. (A) Hypothetische Modelle der vRNP-Verpackung. Nach der Virusreplikation im Zellkern werden die viralen RNA-Segmente in Form von vRNPs zur Wirtszellplasmamembran transportiert, wo diese anschließend zusammen mit den Hüllproteinen zu neuen Viruspartikeln zusammengelagert werden. (a) Selektives Verpackungsmodell; (b) Zufälliges Verpackungsmodell. (B) 3-D Modell der acht vRNPs innerhalb eines Virions. Die Aufnahme erfolgte mittels Elektronentomographie. Jedes vRNP-Segment und die Virushülle werden in unterschiedlichen Farben dargestellt (Noda *u. a.*, 2012).

Virusknospung und Freisetzung

Nach dem Transport der vRNPs sowie von HA, NA und M2 zu den *lipid raft*-Domänen der Wirtszellplasmamembran kommt es vermutlich zu einer Veränderung der Membrankrümmung, wodurch der Knospungsprozess („*budding*“) eingeleitet wird (Rossman und Lamb, 2011). Nach der erfolgreichen Abschnürung von der Wirtszellplasmamembran können die Nachkommenviren aufgrund der Interaktionen des viralen HA-Proteins mit den zellulären Sialinsäuren zunächst nicht freigesetzt werden. Das virale NA-Protein spaltet daher die Sialinsäuren von den zellulären Membranglykolipiden und Glykoproteinen ab und verhindert somit die Selbstaggregation und die Wiederanlagerung der Nachkommenviren an die Wirtszelle (Calder *u. a.*, 2010; Rossman und Lamb, 2011). Eine schematische Darstellung des Knospungsprozesses befindet sich in Abbildung 4.

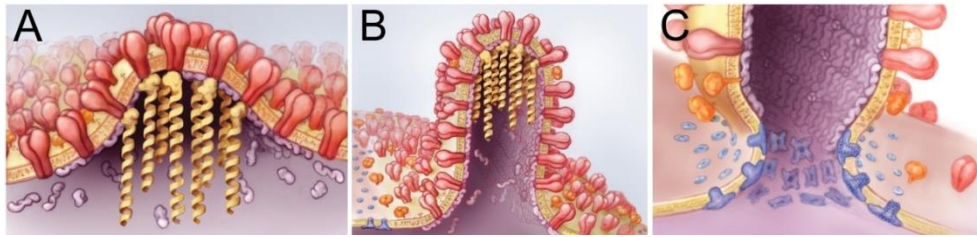


Abbildung 4: Modell des Knospungsvorganges bei Influenzaviren. (A) Initiation der Knospung durch die Zusammenlagerung von HA (rot)- und NA (orange)-Proteinen in den *lipid raft*-Domänen. M1 (violett) bindet an die zytoplasmatischen Bereiche von HA und NA und fungiert als Andockstation für die vRNPs (gelb). (B) Verlängerung des knospenden Virions durch die Polymerisation von M1-Proteinen und Rekrutierung von M2-Proteinen (blau). (C) Durch den Einbau von M2-Helixstrukturen und der Veränderung der Membrankrümmung kommt es zur Knospung sowie zur anschließenden Freisetzung der Nachkommenviren (Rossman und Lamb, 2011).

2.1.4 EPIDEMIOLOGIE

Wasservögel und Watvögel zählen zu den natürlichen Wirten von IAV (Shao *u. a.*, 2017). Von dieser Ursprungsquelle aus können die Viren weitere Organismen, wie z. B. den Menschen, befallen. Eine direkte Übertragung auf den Menschen führt jedoch in der Regel aufgrund der unterschiedlichen Spezifitäten gegenüber den Sialinsäuren der Zelloberflächenrezeptoren zu keiner weiteren Ausbreitung der Viren. Diese natürliche Barriere dient somit zum Schutz vor Spezies-übergreifenden Infektionen (Chen *u. a.*, 1998; Boivin *u. a.*, 2010). Wahrscheinlicher sind Infektionen von Zwischenwirten, wie beispielsweise Hühnern und Schweinen, welche sowohl α -2,3- als auch α -2,6-Sialinsäure-Verbindungen auf ihren Rezeptoren tragen. Infektionen dieser Zwischenwirte können daher zur Generierung von neuen, gegebenenfalls hoch-virulenten, Influenzavirus-Stämmen führen, welche in der Lage sind, Wirte unterschiedlicher Spezies zu befallen (Castrucci *u. a.*, 1993; Ma, Kahn und Richt, 2008). So besteht beispielsweise die Gefahr, dass sich der derzeit kursierende hoch-virulente aviäre IAV-Stamm H5N1 an den Menschen adaptiert und zu einer konkreten Bedrohung wird (Boivin *u. a.*, 2010). Bis Juli 2018 wurden bereits 860 H5N1-Infektionen bei der *World Health Organization* (Weltgesundheitsorganisation, WHO) gemeldet, welche in rund 60 % der Fälle tödlich verliefen. Der Hauptteil dieser Infektionen erfolgte durch einen direkten oder nahen Kontakt mit infizierten lebenden oder toten Vögeln (World Organisation for Animal Health, 2018). Gründe für die schnelle Evolution von Influenzaviren liegen in den großen Populationen, der kurzen Generationszeit und der hohen Mutationsrate des viralen Genoms (Shao *u. a.*, 2017). Aufgrund der fehlenden Korrekturlesefähigkeit der viralen Polymerase kommt es immer wieder zu Genmutationen (rund eine Mutation pro repliziertem Genom) (Drake, 1993), wodurch infizierte Zellen bis zu 10.000 mutierte Nachkommenviren freisetzen können (Boivin *u. a.*, 2010). Vor allem Mutationen in den HA- und NA-Proteinen besitzen das Potential die äußeren Erkennungsstrukturen so zu verändern, dass diese von der

Antikörperantwort des Wirtszellorganismus nicht mehr erkannt werden (Boivin *u. a.*, 2010). Dieser Prozess wird als *antigenic drift* bezeichnet und führt dazu, dass eine bereits erworbene Immunität eines Organismus durch vorhergegangene Infektionen oder Immunisierungen ihre Wirkung gegenüber Infektionen mit neuen Influenzaviren verliert (Boivin *u. a.*, 2010; Shao *u. a.*, 2017). Des Weiteren trägt das segmentierte Genom maßgeblich zu der schnellen Evolution von Influenzaviren bei. Kommt es zu einer Co-Infektion von Zellen mit unterschiedlichen Influenzaviren, so können die Segmente der unterschiedlichen Ausgangsviren gemischt und in neue Viruspartikel verpackt werden (Boivin *u. a.*, 2010). Dieser Prozess wird als *antigenic shift* bezeichnet (Boivin *u. a.*, 2010; Shao *u. a.*, 2017). Beispielsweise kam es bei dem pandemischen IAV-Stamm H1N1 zu einer Vermischung von drei IAV-Stämmen. Dieser enthält die Polymerase-Untereinheiten PB2 und PA von Vögeln, das humane PB1 und das HA vom Schwein (Neumann, Noda und Kawaoka, 2009; Trifonov, Khiabani und Rabadan, 2009). Mutationen und Reassortierungen des viralen Influenzavirus-Genoms sind in der Lage, neue Influenzavirus-Subtypen zu generieren, welche sich weltweit ausbreiten und gegebenenfalls zu Pandemien führen können (Reid und Taubenberger, 2003). Neben Mutationen und Reassortierungen können Rekombinationen das virale Genom verändern. Diese können über zwei Mechanismen erfolgen: durch die nicht-homologe Rekombination zwischen zwei verschiedenen RNA-Fragmenten (Orlich, Gottwald und Rott, 1994; Suarez *u. a.*, 2004) oder durch die homologe Rekombination, welche jedoch extrem selten auftritt (Chare, Gould und Holmes, 2003).

2.1.5 ANTIVIRALE MEDIKAMENTE

Um Influenza-Erkrankungen zu begegnen, sind derzeit drei Klassen von antiviralen Medikamenten für den klinischen Einsatz zugelassen. Dabei handelt es sich um M2-Blocker, NA-Inhibitoren und Nucleosid-Analoga für die RdRp (Yen, 2016). Zu den M2-Blockern zählen die Adamantan-Derivate Amantadin und Rimantadin, welche die Freisetzung der viralen RNA von IAV in die Zelle verhindern. Infektionen mit IBV können hingegen nicht mit diesen Medikamenten behandelt werden (Yen, 2016). Überlebensstudien zur Bestimmung von Resistenzen zeigen jedoch, dass die Anzahl an resistenten Influenzavirus-Subtypen zunimmt (Gubareva *u. a.*, 2010). Zu den NA-Inhibitoren zählen die Wirkstoffe Zanamivir, Oseltamivir Carboxylate, Peramivir und Laninamivir. Diese verhindern die Freisetzung der Viren von der Zelloberfläche und werden als Therapie und Prophylaxe von IAV- und IBV-Infektionen eingesetzt (Yen, 2016). Zu der Gruppe der Nucleosid-Analoga für die RdRp zählen die Wirkstoffe Favipiravir und Ribavirin. Diese inhibieren die Aktivität der RdRp von Influenza- und anderen RNA-Viren (Furuta *u. a.*, 2013). Zusätzlich zu diesen bereits zugelassenen antiviralen Medikamenten ermöglichten Detailstudien des IAV-Nukleoproteins und der IAV-

Polymeraseproteine in den letzten Jahren die Neuentwicklung sowie die Verbesserung bereits vorhandener RNP-Inhibitoren. Zu diesen zählen u. a. die Wirkstoffe Nucleozin (inhibiert den Transport von NP vom Zytoplasma in den Zellkern), *small molecules* (Inhibition der NP-Oligomerisation), Naproxen (Inhibition der NP-RNA-Interaktion), RK424 (bindet an funktionale Domänen von NP und stört somit dessen Interaktionen) und VX-787 (Inhibition des *Cap-snatchings*). Neben antiviralen Medikamenten können zudem Immunmodulatoren, wie beispielsweise Statine (interferieren mit den Proteinen des Zytoskeletts und den *lipid rafts*) bei der Behandlung von Influenza-Erkrankungen zum Einsatz kommen (Gasparini *u. a.*, 2014). Eine weitere Strategie für eine effektive Behandlung von Influenza bildet die Kombinationstherapie bei der mehr als ein Wirkstoff zum Einsatz kommt. Diese Methode verringert das Risiko der Entwicklung von resistenten Virusvarianten und führt zu möglichen additiven und synergetischen Effekten der eingesetzten Wirkstoffe. Auch die Kombination von antiviralen Medikamenten und Immunmodulatoren wurde bereits in Tiermodellen und bei Menschen mit schweren Influenza-Erkrankungen getestet (Gasparini *u. a.*, 2014; Yen, 2016).

2.1.6 INFLUENZA-IMPFSTOFFE

Die Impfstoffproduktion stellt die kosteneffizienteste und beste Methode dar, um Infektionen mit Influenzaviren zu vermeiden. Der Großteil der Influenza-Impfstoffe wird derzeit in embryonierten Hühnereiern produziert. Alternative Produktionsplattformen bilden Zellkultur-, Insektenzell- und Pflanzenzell-basierte Systeme sowie die rein synthetische Herstellung der HA- und NA-Proteine. Die derzeitigen Influenza-Impfstoffe basieren auf der Induktion von neutralisierenden Antikörpern gegen die viralen Oberflächenproteine HA und NA (Cox und Hollister, 2009; Soema *u. a.*, 2015). Aufgrund der stetigen Veränderungen des viralen Genoms durch die Prozesse des *antigenic drifts*, *antigenic shifts* und durch Rekombinationsereignisse (siehe Abschnitt 2.1.4) sind die gebildeten neutralisierenden Antikörper jedoch nicht in der Lage, den Menschen vor abweichenden Influenzavirus-Stämmen zu schützen. Aufgrund dessen erfolgten in den letzten Jahren viele Bestrebungen, sogenannte universelle Influenza-Impfstoffe zu entwickeln. Diese sollen in der Lage sein, unabhängig von den genetischen Veränderungen des Virus, einen Schutz gegen alle Influenzavirus-Stämme aufzubauen. In den letzten Jahren konnten bereits einige Ansätze die klinische Testphase erreichen. Ein möglicher Ansatzpunkt ist Bildung von Antikörpern gegen konservierte Epitope, wie beispielsweise die Hals-Region (*stalk*) des HAs und die extrazellulären Domänen von M2. Ebenso könnte durch die Aktivierung der zellulären Immunantwort gegen intrazelluläre Influenzavirus-Proteine eine Grundlage für die Entwicklung eines universellen Influenza-Impfstoffes darstellen (Soema *u. a.*, 2015).

Momentan werden sowohl trivalente (zwei IAV-Stämme und ein IBV-Stamm) als auch quadrivalente (zwei IAV-Stämme und zwei IBV-Stämme) Influenza-Impfstoffe für die saisonale Gripeschutzimpfung eingesetzt. In den letzten Jahren rückte der quadrivalente Impfstoff immer weiter in den Fokus, da seit 1985 zwei unabhängige IBV-Stämme zirkulieren, wodurch die Effizienz der trivalenten Influenza-Impfstoffe eingeschränkt wird (Ambrose und Levin, 2012; Nafziger und Pratt, 2014). Für die Herstellung der Influenza-Impfstoffe werden entweder abgeschwächte Influenzavirus-Stämme (*live attenuated*) oder inaktivierte Antigene von Influenzaviren verwendet. Bei den inaktivierten Influenza-Impfstoffen kommen entweder vollständige Viren (*whole influenza virus*, WIV), Virosomen oder Spalt (*Split*)- bzw. Untereinheit (*Subunit*)-Produkte von Antigenen zum Einsatz (Soema *u. a.*, 2015). Die ersten saisonalen Influenza-Impfstoffe bestanden aus inaktivierten WIV (Inaktivierung z. B. durch die Zugabe von Formaldehyd oder β -Propiolacton (Doroshenko und Halperin, 2009)), führten jedoch zu Unverträglichkeiten, welche u. a. durch Eiproteine hervorgerufen wurden (Al-Mazrou *u. a.*, 1991; Nafziger und Pratt, 2014). Neue Produktionsverfahren erlauben jedoch auch die Herstellung von reinen und besser definierten WIV-Impfstoffen, wodurch eine gute Reaktivität und Verträglichkeit ermöglicht wird (van Boxtel *u. a.*, 2015). Die heutigen Influenza-Impfstoffe bestehen jedoch vorrangig aus Spalt- oder Untereinheit-Produkten von Influenzavirus-Antigenen. Für beide Produkte werden die Viruspartikel entweder durch eine Behandlung mit Diethylether oder durch die Zugabe von Detergenzien aufgespalten. Impfstoffe aus Split-Produkten (z. B. Fluarix von GSK (Pérez Rubio und Eiros, 2018)) enthalten, bis auf die einzelsträngige RNA (ssRNA), alle viralen Proteine. Durch die Zerstörung der Viruspartikelstruktur und die Entfernung der ssRNA, wird die ursprüngliche Immunogenität des Virus jedoch leicht abgeschwächt. Bei den Impfstoffen aus Untereinheit-Produkten (z. B. Optaflu von Novartis (Doroshenko und Halperin, 2009)) erfolgt nach der Aufspaltung der Viruspartikel eine zusätzliche Abtrennung der viralen HA- und NA-Proteine von den restlichen Virus- und Lipidbestandteilen. Somit enthalten diese Impfstoffe nur noch die spezifischen HA- und NA-Proteine, wodurch gegebenenfalls die Zugabe von Adjuvantien benötigt wird um die erforderliche Immunogenität der Impfstoffe zu gewährleisten (Soema *u. a.*, 2015). Eine Übersicht über inaktivierte Influenza-Impfstoffe ist in Abbildung 5 zu finden.

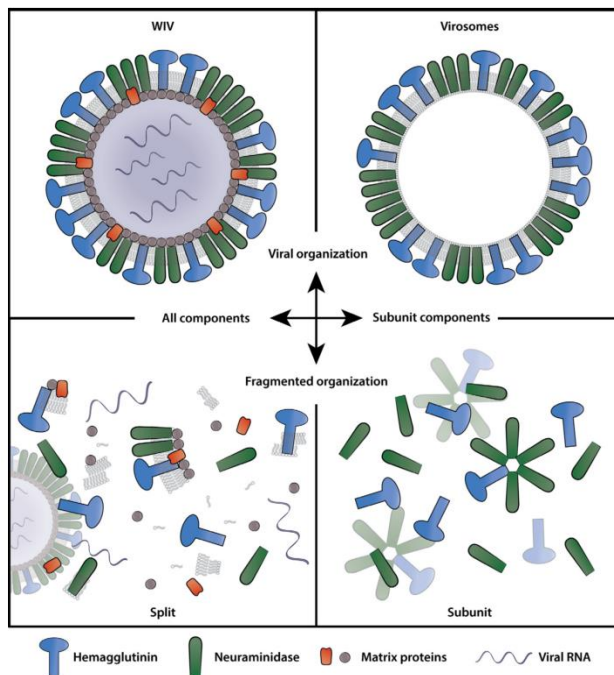


Abbildung 5: Übersicht von inaktivierten Influenza-Impfstoffen. Die vier dargestellten Zusammensetzungen von Influenza-Impfstoffen unterscheiden sich in ihren Antigenkomponenten und ihrer strukturellen Organisation, wodurch die Immunogenität des Impfstoffes beeinflusst wird (Soema *u. a.*, 2015).

Im Gegensatz zu den inaktivierten Influenza-Impfstoffen werden Lebendimpfstoffe intranasal verabreicht, wodurch eine lokale Immunreaktion in der Nasenschleimhaut, dem natürlichen Infektionsort, ausgelöst wird (Barría *u. a.*, 2013). Weitere positive Eigenschaften von Lebendimpfstoffen sind: die Virulenz der Impfung kann mithilfe von standardisierten Testverfahren analysiert werden, schnelle Entwicklung von Reassortanten, genetische Stabilität, reproduzierbare Attenuation und Immunogenität sowie keine sekundäre Übertragung (Maassab und Bryant, 1999). Neben diesen klassischen Antigenen für die Herstellung von Influenza-Impfstoffen, gewinnen neuartige Antigene wie rekombinant hergestellte Proteine, virale Vektoren, Peptide und DNA immer mehr an Bedeutung (Soema *u. a.*, 2015). Ein Nachteil bei einigen dieser Antigene ist die eingeschränkte Immunogenität, wodurch die Zugabe von Adjuvantien benötigt wird (Amorij *u. a.*, 2012). Adjuvantien erhöhen, v. a. bei älteren, ungeimpften und immunsupprimierten Menschen, die Immunogenität, wodurch eine breitere Influenza-spezifische Immunantwort ausgelöst wird und eine niedrigere Dosis an Antigenen eingesetzt werden kann (Soema *u. a.*, 2015).

2.2 DIE INFLUENZA-IMPfstOFFPRODUKTION

Vor Beginn der Impfstoffproduktion erfolgt weltweit und ganzjährig die Sammlung klinischer Patientenproben mit Influenza-Symptomen für die Ermittlung der epidemiologischen Daten der derzeit kursierenden Influenzavirus-Stämme. Anhand dieser Daten spricht die WHO jährlich eine für die nördliche und südliche Hemisphäre getrennte Empfehlung aus, welche Influenzavirus-Stämme am wahrscheinlichsten in der kommenden Saison zirkulieren werden und für die Impfstoffproduktion eingesetzt werden sollen. Anschließend erfolgt die Herstellung der jeweiligen Reassortanten für die Saatvirusproduktion sowie die Herstellung der benötigten standardisierten Reagenzien (WHO, 2007). Die Grundlage für diese Reassortanten bilden Spender-Stämme mit guten Wachstumseigenschaften (*high growth*) im Ei, wie beispielsweise der H1N1 Influenza-Stamm A/PR/8/34 (Kilbourne, 1969; Lee und Hu, 2012). Diese *high growth*-Reassortanten beinhalten sechs A/PR/8/34-eigene und zwei A/PR/8/34-fremde Gene. Bei den zwei fremden Genen handelt es sich um HA und NA, welche durch die HA- und NA-Sequenzen der ausgewählten zirkulierenden Stämme bereitgestellt werden. Die Herstellung der Virus-Reassortanten kann über zwei Wege erfolgen (siehe Abbildung 6): (1) Herstellung über die klassische Reassortierung durch die Infektion embryonierter Hühnereier mit zwei verschiedenen Virusstämmen und der anschließenden Selektion auf die gewünschte Kombination oder (2) Herstellung der Reassortanten über Klonierungen unter Verwendung der Plasmid-basierten reversen Genetik (Lee und Hu, 2012).

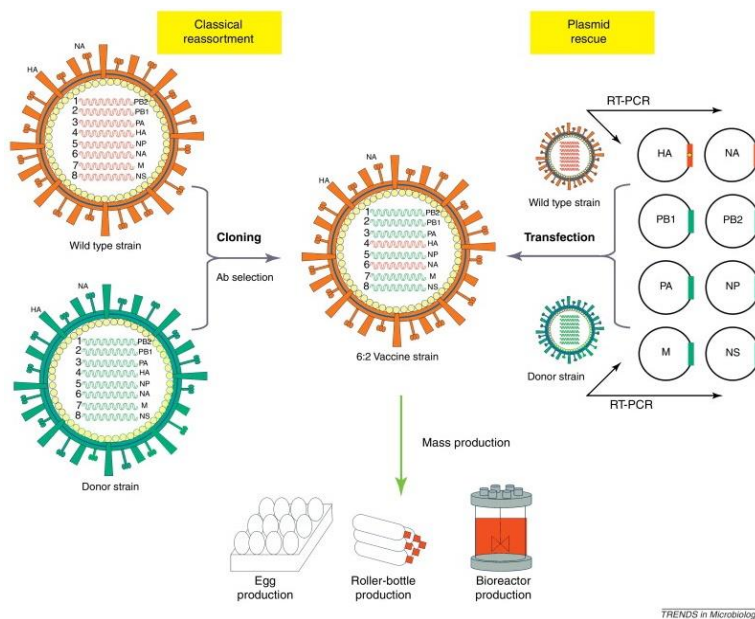


Abbildung 6: Herstellung von Virus-Reassortanten für die Influenza-Impfstoffproduktion.

Derzeit bestehen zwei Verfahren für die Herstellung von Virus-Reassortanten. (links) Klassische Reassortierung. (rechts) Herstellung von Virus-Reassortanten durch die Plasmid-basierte reverse Genetik (Lee und Hu, 2012).

TRENDS in Microbiology

2.2.1 INFLUENZA-IMPfstOFFPRODUKTION IN EMBRYONIERTEN HÜHNEREIERN

Das klassische Produktionsverfahren für Influenza-Impfstoffe ist die Herstellung in embryonierten Hühnereiern, welches bereits 1945 in den USA lizenziert wurde (Francis, 1953; Lee und Hu, 2012). Dafür werden für elf bis zwölf Tage befruchtete Eier verwendet, die Allantois mit den entsprechenden Reassortanten beimpft, die Eier verschlossen und für 48 h inkubiert. Anschließend erfolgt die Abkühlung der Eier auf 4 °C um den Embryo zu töten und die Entnahme der infizierten Allantois-Flüssigkeit. Durch die Zugabe von Diethylether, Formalin oder β -Propiolacton werden die Viren inaktiviert. Die sterile Allantois-Flüssigkeit wird anschließend über mehrere Schritte prozessiert, die einzelnen Produkte gemischt und anschließend verpackt (Kistner *u. a.*, 1998). Durchschnittlich werden ein bis zwei embryonierte Hühnereier für die Produktion von einer Impfdosis für den Menschen benötigt (Hegde, 2015). Aufgrund der guten Etablierung, Optimierung und Automatisierung können mithilfe dieses hochgradig standardisierten Produktionsprozesses heutzutage große Mengen an Impfstoffen produziert werden. Zudem stehen aufgrund der Vielzahl an verabreichten Impfdosen umfangreiche Daten bezüglich der Sicherheit zur Verfügung. Trotz der guten Etablierung besitzt dieser Produktionsprozess jedoch auch einige Nachteile. Hühnereier sind potentiell empfänglich für eine Vielzahl an Pathogenen, wodurch für die Produktion ausschließlich Eier verwendet werden dürfen, die von speziellen Pathogen-freien oder zumindest als „sauber“ zertifizierten Hühnerherden stammen (Hegde, 2015). Neben der enormen Anzahl an benötigten Hühnereiern stellt die mangelnde Flexibilität des Produktionsprozesses auf einen sprunghaften Anstieg der Nachfrage ein Problem dar (Kistner *u. a.*, 1998). Der Ausbruch einer Pandemie mit einem aviären Influenzavirus-Stamm birgt zudem das Risiko eines schnellen Hühnersterbens, wodurch es zu Engpässen bei der Versorgung mit Pathogen-freien Hühnereiern kommen kann (Lee und Hu, 2012). Des Weiteren kann es aufgrund unterschiedlicher Wachstumseigenschaften einiger Influenzavirus-Stämme Probleme bei der Virusproduktion in Eiern geben (Nafziger und Pratt, 2014; Hegde, 2015; Soema *u. a.*, 2015). Abschließend besteht die Gefahr das trotz intensiver Aufreinigungsverfahren enthaltene Ei-Proteine zu allergischen Reaktionen führen können (Hegde, 2015).

2.2.2 DIE ZELLKULTUR-BASIERTE IMPfstOFFPRODUKTION

Eine Alternative zu der Ei-basierten Impfstoffproduktion bilden Zellkultur-basierte Systeme, bei der vollständig charakterisierte und standardisierte, kontinuierliche Zelllinien verwendet werden (Tree *u. a.*, 2001). Bisher wurden die zwei kontinuierlichen Zelllinien MDCK und Vero für die Produktion von Influenza-Impfstoffen zugelassen. MDCK-Zellen erlauben ein effizientes Wachstum der meisten humanen Influenzaviren. Zudem können Ei-adaptierte *high-growth* Reassortanten zu ähnlichen Virustitern wie im Ei heranwachsen (Lee und Hu, 2012). Vero-

Zellen wurden bereits für eine Vielzahl an Impfstoffproduktionsprozessen für den Menschen zugelassen (Poliovirus, Tollwut, Japanische Enzephalitis). Dennoch zeigen nicht alle Influenzavirus-Stämme ein gutes Wachstum in dieser Zelllinie, wodurch Virusadaptationsprozesse für die Erzeugung von sogenannten *high growth* Saatviren erforderlich sind (Lee und Hu, 2012). Zu den neuartigen Produktionszelllinien zählt u. a. die PER.C6-Zelllinie. Diese Zelllinie stammt von humanen Retina-Zellen ab und ist an das Wachstum in Suspension und an serumfreies Medium adaptiert (Pau u. a., 2001). Dies hat den Vorteil, dass das Zellwachstum durch die Zellkonzentration im Medium und nicht durch die zur Verfügung stehende Wachstumsfläche begrenzt ist. Dies könnte eine Hochskalierung der Impfstoffproduktion im Falle einer Pandemie erleichtern (Soema u. a., 2015). Weitere Zellkultur-basierte Produktionsplattformen für Influenzaviren sind die Zelllinien HEK293 und CAP, welche sich jedoch noch in der Entwicklungsphase befinden (Le Ru u. a., 2010; Genzel u. a., 2012). Der Einsatz humaner Zelllinien als Produktionsplattformen wird jedoch kontrovers diskutiert. Es wird vermutet, dass durch den Einsatz eines „korrekten“/„natürlichen“ Zellsystems die produzierten Viren die bestmögliche Immunantwort auslösen können, da sie die wirtsspezifischen Glykosylierungsstrukturen auf den Glykoproteinen tragen. Andererseits besteht die Gefahr, dass humane Pathogene, wie beispielsweise endogene Retroviren, die Zelllinien kontaminieren (Hay, 1996; Genzel, 2015). Neben der Verwendung von Säugetierzellen für die Zellkultur-basierte Influenzavirus-Produktion erlangen auch alternative Zellsysteme wie Vogel-, Insekten- und Pflanzenzelllinien immer mehr an Bedeutung. Neben der Auswahl geeigneter Zelllinien spielt auch die Optimierung des Produktionsprozesses eine entscheidende Rolle. Die Zellkultur-basierte Impfstoffproduktion besteht meist aus zwei Schritten: der Zellkultivierung im Großformat bei hohen Zelldichten und der Infektion der Zellen mit *high-growth* Reassortanten unter dem Einsatz einer niedrigen Virusstartmenge (*multiplicity of infection*, MOI). Manche Prozesse benötigen einen Mediumwechsel vor der Infektion, bei anderen erfolgt die Infektion direkt in dem Zellkulturmedium. Für die Produktion sollten chemisch definierte Medien verwendet werden um eine gleichbleibende Virusvermehrung sowie ein konsistentes Zellwachstum zu erzielen. Zudem sollte auf die Zugabe von Zusatzstoffen mit tierischem Ursprung verzichtet werden um Kontaminationen zu vermeiden (Genzel und Reichl, 2009). Für eine effiziente Influenzavirus-Produktion wird zudem die Zugabe von Trypsin benötigt, da Produktionszelllinien keine spezifischen Wirtszellproteasen zur Verfügung stellen, welche das HA Glykoprotein proteolytisch spalten, um es in seine reaktive Form zu überführen (Klenk u. a., 1975). Die wesentlichen Vorteile der Zellkultur-basierten Impfstoffproduktion bestehen in der Unabhängigkeit von Pathogen-freien Hühnereiern und der hohen Flexibilität der Produktionskapazität (Soema u. a., 2015). Des Weiteren zeigten mehrere Studien, dass es bei der Passagierung von Influenzaviren in Hühnereiern zu Veränderungen des HAs im Vergleich

zu dem Wildtyp kommen kann, wodurch die Gefahr einer verminderten Effektivität der Impfstoffe besteht (Tree *u. a.*, 2001). Im Gegensatz dazu konnte eine Studie von Neuome und Kollegen belegen, dass ausschließlich in Säugetierzellen passagiertes Virus keine Veränderungen aufweist (Nerome *u. a.*, 1999). Studien mithilfe von Tiermodellen zeigten zudem, dass bei der Verwendung von Zellkultur-basierten Influenza-Impfstoffen, ein vergleichbarer bis besserer Schutz erzielt wird (Wood *u. a.*, 1989; Kistner *u. a.*, 1998; Nerome *u. a.*, 1999). Trotz der deutlichen Vorteile gegenüber dem Ei-basierten Herstellungsverfahren, weist auch dieser Prozess einige Nachteile auf. Beispielsweise wird eine Adaption des Virus an die Produktionszelllinie benötigt, um gute Wachstumseigenschaften zu erlangen. Des Weiteren entstehen für die Bereitstellung und Validierung der Produktionsplattformen hohe Kosten, was deren Umstellung für einige Hersteller unattraktiv macht (Perdue *u. a.*, 2011).

2.3 DIE ANGEBORENE IMMUNANTWORT

Das Immunsystem besteht aus der angeborenen, allgemeinen Immunantwort und der erworbenen, spezifischen Immunantwort. Diese eng miteinander verbundenen Systeme wirken dabei zum einen auf der zellulären Ebene und zum anderen durch lösliche Stoffe (z. B. Antikörper, Eiweiße). Da der Fokus dieser Arbeit auf *in vitro* Prozessen bei Influenzavirus-Infektionen liegt, werden im weiteren Verlauf die Mechanismen der zellulären Ebene tiefergehend beschrieben.

Das angeborene Immunsystem besitzt als erste Abwehrstufe eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle von Virusinfektionen. Mithilfe von spezifischen Rezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) erfolgt die Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden (*pathogen-associated marker pattern*, PAMP) Strukturen. Diese PAMPs werden durch die Pathogene in die Zelle gebracht oder während der Infektion gebildet (Iwasaki und Pillai, 2014). Die Erkennung von IAV erfolgt dabei über *Toll-like* Rezeptoren (TLRs), über das *retinoic acid inducible gene-1* (RIG-I) und die *NOD-like receptor family pyrin domain containing 3* (NLRP3) Proteine. Vor allem die TLRs TLR8, TLR7 (Erkennung von ssRNA) und TLR3 (Erkennung von doppelsträngiger RNA (dsRNA)) spielen bei der Erkennung von Influenzaviren eine wichtige Rolle. Des Weiteren ermöglichen RIG-I und NLRP3 die Detektion der Viren im Zytoplasma von infizierten Zellen (Pang und Iwasaki, 2011; Iwasaki und Pillai, 2014). Die Bindung der PAMPs an die entsprechenden PRRs führt anschließend zur Aktivierung verschiedener Signalwege, wodurch es zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Typ-I IFN kommt (Alexopoulou *u. a.*, 2001; Heil *u. a.*, 2004; Lund *u. a.*, 2004).

2.3.1 INDUKTION UND FUNKTION DES INTERFERONSYSTEMS

Neben der Induktion von Zytokinen, stellt die Aktivierung des Typ-I-IFN-Systems den effizientesten Abwehrmechanismus des angeborenen Immunsystems dar, um IAV in ihrer Replikation und Ausbreitung zu inhibieren (Ehrhardt *u. a.*, 2010). IFNs werden anhand ihrer Aminosäuresequenz sowie anhand ihrer Rezeptoren in drei Typen unterteilt; Typ-I-IFN (IFN- α , IFN- β), Typ-II (IFN- γ) und Typ-III (IFN- λ). Typ-I- und Typ-III-IFNs werden direkt nach der Erkennung von IAV hochreguliert und bilden den Hauptbestandteil der exprimierten IFNs *in vivo* und *in vitro*. Im Gegensatz dazu werden Typ-II-IFNs erst im späteren Verlauf in die antivirale Immunantwort eingebunden, wobei sie u. a. die Typ-I-IFN-Abwehr und die Regulation der adaptiven Immunantwort unterstützen (Andreaskos *u. a.*, 2017). Typ-I-IFNs können von fast jedem Zelltyp gebildet werden, wohingegen Typ-II-IFNs nur durch aktivierte T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen (Killip, Fodor und Randall, 2015) und Typ-III-IFNs vorrangig durch Epithelzellen und Dendritische Zellen exprimiert werden (Andreaskos *u. a.*,

2017). Aufgrund der zelltypspezifischen Expression von Typ-II- und Typ-III-IFNs besitzen diese keinen Einfluss auf die Zellkultur-basierte Influenzavirus-Vermehrung und werden daher in diesem Zusammenhang nicht weiter diskutiert.

Eine schematische Übersicht über die Induktion des Typ-I-IFN-Systems durch IAV ist in Abbildung 7 dargestellt. Die IFN-Signalkaskade beginnt mit der Detektion von PAMPs durch die zellulären PRRs (Chen *u. a.*, 2018). Bei IAV-Infektionen wird vorrangig die virale RNA erkannt, welche in dieser Form nicht in der Zelle vorkommt (Killip, Fodor und Randall, 2015). Dabei können dsRNA-Regionen, die Anwesenheit von 5'-Triphosphat (5'ppp)- bzw. 5'-Diphosphat (5'pp)-Gruppen (Killip, Fodor und Randall, 2015) als auch das Vorhandensein von genomischer und antigenomischer ssRNA erkannt werden (Ehrhardt *u. a.*, 2010; Chen *u. a.*, 2018). Abhängig von dem Stimulus und dem dazugehörigen PRR kommt es zur Aktivierung spezifischer Signalkaskaden. So resultiert beispielsweise die Aktivierung von TLR3 durch dsRNA in der Phosphorylierung des *interferon regulatory factor 3* (IRF-3) sowie in der Aktivierung der *IκB kinase 2* (IKK2) und dem *nuclear factor-κB* (NF-κB). Eine Aktivierung von TLR7 durch ssRNA induziert hingegen das Adaptorprotein MyD88, was wiederum in der Phosphorylierung von IRF-7 resultiert (Ehrhardt *u. a.*, 2010). Zusätzlich sind die im Zytoplasma befindlichen PRRs RIG-I und MDA5 in der Lage verschiedene Typen von RNA-Viren zu detektieren. RIG-I erkennt vorrangig kurze 5'ppp- oder 5'pp-dsRNA-Motive (z. B. *mini viral RNAs* (mvRNAs) (Velthuis *u. a.*, 2018)), wohingegen MDA5, unabhängig von 5'-Phosphatstrukturen, durch längere dsRNA-Bereiche aktiviert wird (Killip, Fodor und Randall, 2015). Diese führen zur Aktivierung des mitochondrialen *IFN-β promoter stimulator 1* (IPS-1) Proteins, wodurch IRF-3 und IRF-7 exprimiert werden. Des Weiteren kommt es nach der Stimulation zur Phosphorylierung des konstitutiv exprimierten IRF-3 im Zytoplasma, wodurch es dimerisiert und in den Zellkern wandert. Durch die Interaktion des IRF-3-Dimers mit dem *CREB binding protein* (CBP) und p300 (Servant, Grandvaux und Hiscott, 2002), kann dieses an den IFN-β *Enhancer* binden und die IFN-β-Expression induzieren. Daraufhin wird IFN-β sekretiert und bindet an den Typ-I-IFN-Rezeptor, wodurch es zur Induktion der IRF-7-Expression kommt. Zusammen mit weiteren Transkriptionsfaktoren führt dies durch einen sekundären Rückkopplungs-Mechanismus („*positive feedback loop*“) zur Induktion von IFN-α und weiteren IFN-induzierten Genen (Ludwig *u. a.*, 2006; Ehrhardt *u. a.*, 2010).

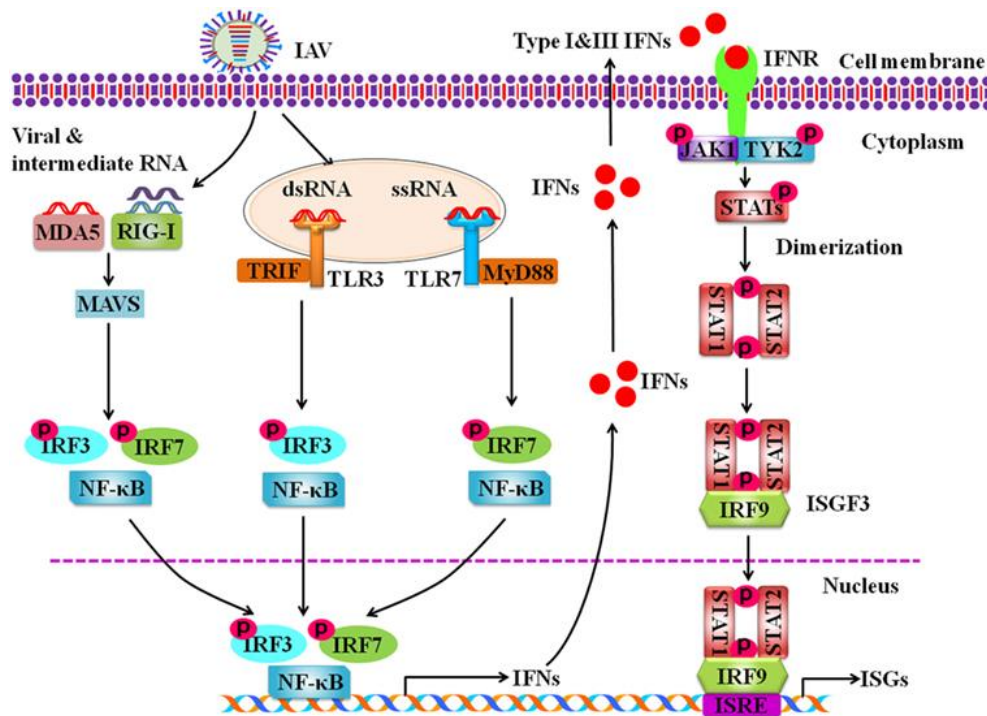


Abbildung 7: Schematischer Überblick über die Aktivierung des IFN-Signalwegs durch IAV. Eine detaillierte Beschreibung der dargestellten Abläufe befindet sich im vorhergegangenen Text. Die Abbildung stammt aus dem Review von Chen und Kollegen (Chen *u. a.*, 2018).

2.3.2 IFN-INDUZIERTE GENPRODUKTE MIT ANTIVIRALER WIRKUNG

Nach der Bindung von IFN- α/β an den IFN- α/β -Rezeptor kommt es zur Aktivierung des *Janus kinase (JAK)/ signal transducers and activators of transcription (STAT)* Signalweges. Dadurch erfolgt die Trimerisierung des Transkriptionsfaktors ISGF3, welcher anschließend die Expression verschiedener IFN-stimulierter Gene, wie beispielsweise MxA, PKR und Viperin, aktiviert (Stark *u. a.*, 1998; Haller, Kochs und Weber, 2006; Ehrhardt *u. a.*, 2010). Diese besitzen im Allgemeinen antivirale Funktionen um die Virusreplikation und Virusausbreitung durch vielfältige Mechanismen zu inhibieren (Randall und Goodbourn, 2008). (Ehrhardt *u. a.*, 2010).

2.3.2.1 Mx-PROTEINE

Die Entdeckung der IFN-regulierten *myxovirus resistance proteins* (Mx-Proteine) erfolgte anhand von genetisch veränderten Mäusen. Dabei zeigten Studien, dass Mäuse mit einem funktionalen Mx1-Protein, resistent gegen Infektionen mit Influenzaviren sind, wohingegen Mx1 defiziente Mäuse eine deutlich stärkere Anfälligkeit für diese Infektionen aufwiesen. Auch das humane Genom kodiert für zwei Mx-Proteine, welche als MxA und MxB bezeichnet und zusammen auf Chromosom 21 kodiert werden. Dabei besitzt das humane MxA, ebenso wie

das murine Mx1, starke antivirale Funktionen. MxB besitzt hingegen keine antiviralen Funktionen, übernimmt jedoch andere zelluläre Funktionen. Die Expression von MxA wird durch Typ-I- und Typ-III-IFNs induziert und streng kontrolliert (Ablauf siehe Abschnitt 2.3.1), wodurch MxA auch als Marker für die Aktivierung des IFN-Systems angesehen werden kann (Haller und Kochs, 2011). Ein Grund für die strenge Kontrolle der MxA-Expression könnte in der erhöhten Sensitivität der Zellen gegenüber apoptotischer Stimuli liegen (Haller *u. a.*, 2015). Im Gegensatz zu der nukleären Lokalisation des murinen Mx1, assoziiert das humane MxA-Protein mit den Membranen des glatten ER. Aufgrund der nukleären Lokalisation von Mx1 besitzt dieses jedoch keine antivirale Funktion gegenüber rein zytoplasmatisch replizierenden Viren. MxA hingegen inhibiert neben einer Vielzahl von zytoplasmatisch replizierenden Viren auch nukleär replizierende Viren, wie beispielsweise Influenzaviren (Haller und Kochs, 2011). Die antivirale Funktionalität von Mx1 bezieht sich auf die Inhibition der mRNA-Synthese. Der genaue Wirkmechanismus von MxA ist hingegen noch nicht vollständig geklärt. Zwar können hereinkommende Viren ihre mRNA-Transkription im Zellkern starten, jedoch erfolgt keine Replikation des viralen Genoms (Haller *u. a.*, 2015). Möglicherweise bindet MxA im Zytoplasma an neu gebildete NP-Komplexe wodurch deren Transport in den Zellkern und die sich anschließende sekundäre Transkription und Genomamplifikation verhindert wird (Haller und Kochs, 2011).

Weitere IFN-induzierte, antiviral-wirkende Proteine bilden die Proteinkinase R (PKR) (García-Sastre und Biron, 2006; Ehrhardt *u. a.*, 2010), die Oligoadenylatsynthetase (OAS) (García-Sastre, 2011) und Viperin (Ehrhardt *u. a.*, 2010; Fitzgerald, 2011).

2.3.3 VIRALE GEGENMAßNAHMEN

Wie in den vorherigen Abschnitten 2.3.1 und 2.3.2 beschrieben wurde, stellt die Aktivierung der IFN-Antwort einen sehr effizienten und wirkungsvollen Abwehrmechanismus der Wirtszelle gegen IVA-Infektionen dar. Dennoch ist die Aktivierung des IFN-Systems nicht in der Lage, Influenzavirus-Infektionen vollständig zu unterbinden. Dies liegt daran, dass Influenzaviren verschiedene Strategien entwickelt haben, die IFN-Antwort abzuschwächen oder sich derer zu entziehen, um weiterhin replizieren und sich im Wirtsorganismus ausbreiten zu können (Ehrhardt *u. a.*, 2010; Garcia-Sastre, 2011).

2.3.3.1 DAS INFLUENZA NS1-PROTEIN

Der bisher am meisten untersuchte virale IFN-Antagonist von Influenzaviren ist das NS1-Protein. Dieses wird, zusammen mit NS2, durch das kürzeste der acht Genomsegmente kodiert und wird sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma von infizierten Zellen hoch

exprimiert (Ehrhardt *u. a.*, 2010). NS1 besitzt eine RNA-Bindedomäne, wodurch es dsRNA binden und die Aktivierung der RNA-Sensoren PKR und OAS abschwächen kann (Garcia-Sastre, 2011). Des Weiteren ist NS1 in der Lage mit RIG-I über das *tripartite motif-containing protein 25* (TRIM25) zu interagieren. Diese Interaktion führt zur Ubiquitinierung von RIG-I, wodurch anschließende Signalkaskaden inhibiert werden. Ein weiterer zellulärer Interaktionspartner ist die *phosphatidylinositol 3 kinase* (PI3K). Neben der Phosphorylierung und Aktivierung von IRF-3, konnten für dieses Protein aber auch pro-virale Funktionen beschrieben werden. Die frühe Aktivierung von PI3K wird für eine effiziente Aufnahme der Influenzaviren benötigt. Die späte Aktivierung erfolgt durch eine direkte Bindung von NS1 an eine regulatorische Untereinheit und ist für die Unterdrückung einer frühzeitigen Apoptose verantwortlich. Eine weitere pro-virale Funktion von NS1 ist die Inhibierung der Genexpression, wodurch es zu einer verminderten IFN- und ISG-Expression kommt. Hierfür bindet NS1 spezifisch an den 30 kDa *cleavage and polyadenylation specific factor* (CPSF-30), wodurch die Polyadenylierung zellulärer, jedoch nicht viraler, mRNAs inhibiert wird (Ehrhardt *u. a.*, 2010).

2.3.3.2 DAS INFLUENZA PB1-F2-PROTEIN

PB1-F2 ist das zweite von IAV exprimierte Nichtstruktur-Protein, welches durch einen alternativen offenen Leserahmen des PB1-Segementes kodiert wird. PB1-F2 lokalisiert an der inneren und äußeren Mitochondrienmembran und führt zu einer erhöhten Empfänglichkeit gegenüber der Induktion von Apoptose (Ehrhardt *u. a.*, 2010).

2.3.3.3 DAS ADENOVIRALE PROTEIN E1A

Ebenso wie Influenzaviren exprimieren auch Adenoviren virale Antagonisten, um sich der zellulären IFN-Antwort zu entziehen. Eines dieser Proteine stellt das *early region 1 A* (E1A)-Protein dar. Dieses ist in der Lage, an den Co-Aktivatoren p300/CBP zu binden und führt somit zu verminderten Leveln an *signal transducer and activator of transcription 1* (STAT1) und *interferon regulatory factor 9* (IRF-9) (Randall und Goodbourn, 2008). Des Weiteren interferiert E1A mit der Histon-2B-Mono-Ubiquitinierung durch die Ubiquitinligase RNF20/hBRE1, wodurch es zu Inhibierung der ISG-Transkription kommt (Hendrickx *u. a.*, 2014). Diese Unterdrückung der ISG-Expression führt zur Inhibierung der antiviralen Immunantwort in den Zellen und ermöglicht somit die Replikation IFN-sensitiver Viren, wie beispielsweise des Vesikular-Stomatitis-Virus (VSV) und der Influenzavirus Deletionsmutante NS1 (delNS1) in IFN-stimulierten Zellen (Anderson und Fennie, 1987; Bachmann *u. a.*, 2016).

2.4 ZELLTRANSFORMATION DURCH ADENOVIRALE PROTEINE

Aufgrund der begrenzten Lebensdauer von primären Zellen sind immortalisierte Zelllinien in der Zellkultur von großer Bedeutung. Die Immortalisierung von Zelllinien kann dabei über verschiedene Methoden ermöglicht werden. Eine dieser Methoden stellt die Transformation von Zellen durch DNA-Viren, wie beispielsweise den Adenovirus Typ-5 (Ad5), dar (Shay, Wright und Werbin, 1991). Mithilfe von Ad5 gelang es 1977 Graham und Kollegen erstmals, durch geschärfte DNA-Fragmente humane embryonale Nierenzellen zu transformieren (Graham *u. a.*, 1977). Für eine erfolgreiche Transformation wird die Expression der frühen adenoviralen Gene E1A und E1B benötigt. E1A interagiert mit zellulären Schlüsselregulatoren für das Zellwachstum und moduliert deren normale Funktionen. Dies führt zu einer veränderten DNA-Synthese sowie zur Zellproliferation, wodurch primäre Zellen in einen immortalisierten Zustand überführt werden können. Trotz dieser generellen Immortalisierung, stimuliert E1A ebenso die Apoptose (induzierter Zelltod) und den Zellwachstumsarrest. Um diesen proapoptotischen Funktionen entgegen zu wirken, wird die Expression von E1B benötigt. E1B besitzt keine transformierenden Eigenschaften, jedoch kooperiert es mit E1A in einer additiven Art und Weise, indem es der durch E1A ausgelösten Apoptose entgegenwirkt (Endter und Dobner, 2004). Neben der weitverbreiteten HEK293-Zelllinie, wurden auch neuartige Produktionszelllinien wie beispielsweise die AGE1.HN-Zelllinie (Niklas *u. a.*, 2011), die PER.C6-Zelllinie (Ledwith *u. a.*, 2006) und die CAP-Zelllinie (Krömmelbein *u. a.*, 2016) durch das Einbringen der adenoviralen Gene E1A und E1B transformiert.

2.5 GENERIERUNG GENETISCH MODIFIZierter ZELLINIEN MITTELS LENTIVIRALER TRANSDUKTION

Lentiviren gehören, ebenso wie das Humane Immundefizienz-Virus (HIV), zur Familie der Retroviren. Lentivirale Vektorsysteme (LV) basieren auf dem Genom von HIV-1. Dadurch sind sie, im Gegensatz zu anderen retroviralen Vektorsystemen, in der Lage nicht-teilungsfähige Zellen, wie beispielsweise Stammzellen und Nervenzellen, zu infizieren. Zudem ermöglichen LV eine stabile Langzeit-Expression (Vigna und Naldini, 2000). Somit können diese Vektoren nicht nur *ex vivo* für die Transduktion von Zellen, sondern auch für den Gentransfer *in vivo* eingesetzt zu werden (Committee for medical products for human use, 2005). Um das Risiko der Entstehung replikationskompetenter Viren zu minimieren, erfolgte die Fragmentierung des HIV-1 Genoms in folgende Kategorien: Transfer- und Integrationsvektor, Struktur- und Verpackung, Hüllplasmid (Park, 2007). Um die Sicherheit von LV zu erhöhen, wurden alle nicht benötigten retroviralen Proteine aus den Vektoren entfernt, sodass nur noch die essentiellen Proteine Gag, Pol, Tat und Rev kodiert werden (Berkhout, 2017). Des Weiteren wurde das HIV-1 Hüllprotein gegen Glykoproteine anderer umhüllter Virustypen ausgetauscht, um ein breiteres Wirtsspektrum zu ermöglichen (Pseudotypisierung). Das derzeit am häufigsten verwendete pseudotypisierte LV-System nutzt die Hüllproteine des VSV (Cronin, Zhang und Reiser, 2005). Um die Sicherheit weiter zu erhöhen, erfolgten zusätzliche Modifikationen und Deletionen der HIV-1 Sequenzen (Berkhout, 2017). Die aktuelle dritte Generation an LV kodiert nur noch für drei der neun HIV-1-Proteine (Gag, Pol, Rev), welche von separaten Plasmiden exprimiert werden, um die Bildung replikationskompetenter Viren durch Rekombination zu verhindern. Des Weiteren werden stark mutierte, Codon-optimierte Versionen von diesen „Verpackungs“-Konstrukten verwendet und der Transfervektor so verändert, dass er sich selbst in seiner Transkription inaktiviert (Vigna und Naldini, 2000; Berkhout, 2017). Kürzlich erfolgte eine Weiterentwicklung der bestehenden dritten Generation, welche sich durch weitere Sicherheitsmaßnahmen auszeichnet, jedoch noch einer Optimierung der Vektortiter bedarf (Berkhout, 2017). Trotz der vielversprechenden Zukunft von LVs für die Transgenese verschiedener Tierspezies, gibt es immer noch Probleme, welche in weiterführenden Studien adressiert werden müssen. So bestehen beispielsweise die Probleme eines genetischen Mosaikismus (genetische Unterschiede zwischen den Zellen), Unterschiede in der Transgenexpression, der limitierten Verpackungsgröße und der Vektortoxizität aufgrund der Pseudotypisierung (Park, 2007).

2.6 IDENTIFIZIERUNG VON ZELLULÄREN SCHLÜSSELFAKTOREN FÜR DIE VIRUSREPLIKATION

Aufgrund der hohen Mutationsrate des viralen Genoms entstehen ständig neue Influenzavirus-Stämme, welche sich der Wirkung präventiver Impfungen und der vorhandenen antiviralen Medikamente entziehen können (Karlsson *u. a.*, 2010). Wie alle Viren, sind auch Influenzaviren aufgrund der begrenzten Kodierungskapazität ihres Genoms für die Replikation von Wirtszellproteinen sowie deren Interaktionen und Wirkmechanismen abhängig. Die Identifikation von zellulären Schlüsselfaktoren stellt somit eine Alternative zur traditionellen Virus-bezogenen Therapie dar und ermöglicht die Entwicklung neuer antiviraler Therapien durch ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen der Virusreplikation (Stertz und Shaw, 2011; Su *u. a.*, 2013). Für die Identifikation zellulärer Schlüsselfaktoren können u. a. Analysen von Protein-Protein-Interaktionen erfolgen. Shapira und Kollegen nutzten beispielsweise ein *yeast two hybrid* System in Kombination mit einer genomweiten Expressionsanalyse für die Identifikation von Virus-Wirtszell-Interaktionen unter der Verwendung von zwei verschiedenen Influenzavirus-Stämmen (Shapira *u. a.*, 2009). Weitere Möglichkeiten zur Identifizierung zellulärer Schlüsselfaktoren sind die Isolation von Proteinkomplexen mithilfe verschiedener Affinitäts-Aufreinigungsverfahren, die Analyse des Wirtszelltranskriptoms nach der Virusinfektion mithilfe von *Microarrays*, der Einsatz spezifischer Inhibitoren sowie der Einsatz von RNAi-Screens (Stertz und Shaw, 2011).

2.6.1 DER RNAI-MECHANISMUS

Bei RNAi handelt es sich um einen natürlichen genspezifischen Signalweg, welcher auf posttranskriptionaler Ebene die Genexpression in den meisten Eukaryoten stilllegen kann. Die an diesem Mechanismus beteiligten Komponenten besitzen vielseitige Funktionen und können zwischen den einzelnen Organismen variieren. Einerseits spielen die Elemente des RNAi-Signalwegs eine Rolle bei der angeborenen Immunantwort indem sie lange dsRNA Elemente, welche meist mit Virusinfektionen in Verbindung stehen, erkennen. Andererseits besitzt dieser Mechanismus auch Funktionen bei der Regulation nicht-kodierender RNAs, den sogenannten *microRNAs* (miRNAs). Neben diesen Funktionen nutzen Forscher heutzutage den RNAi-Signalweg für die Stilllegung spezifischer Genfunktionen. Dafür wird zunächst synthetische dsRNA erzeugt, welche als *small interfering RNA* (siRNA) bezeichnet wird. Nach dem Einbringen der siRNAs in die Zelle, interagieren diese mit den *RNA induced silencing complex* (RISC) und es kommt zur Anlagerung des führenden Stranges an die komplementäre mRNA-Sequenz. Eine weitere Möglichkeit bietet der Einsatz von genspezifischen shRNAs, welche von einem Plasmid oder einem viralen Expressionskonstrukt abgelesen werden können. Diese

shRNAs werden, wie die endogenen miRNAs, im Zellkern exprimiert und binden nach deren Prozessierung durch die Endonukleasen *Drosha* und *Dicer* an den RISC-Komplex (Meliopoulos *u. a.*, 2012). Eine detaillierte Beschreibung des RNAi-Mechanismus kann u. a. in der Publikation von Tijsterman und Plasterk nachgelesen werden (Tijsterman und Plasterk, 2004).

2.6.2 RNAI-SCREENS

Genomweite RNAi-Screens in Kombination mit bioinformatischen Auswertesystemen ermöglichen es, Einblicke in das genetische Netzwerk in Verbindung mit einzelnen Zielgenen zu erlangen (Chou *u. a.*, 2015). Aufgrund der hohen Komplexität von RNAi-Screens zur Untersuchung von Virus-Wirtszell-Interaktionen müssen folgende Punkte in Betracht gezogen werden: die Auswahl der interferierenden Reagenz (siRNA oder shRNA), die Zelllinie, das zu verwendende Virus sowie das Screening-Format (geordnet oder gemischt) (Meliopoulos *u. a.*, 2012). Bei einem geordneten Screen wird jedes RNAi-Reagenz einem einzelnen Well in einer Mikroplatte zugeordnet und anschließend mithilfe verschiedener zellbasierter Methoden im Mikroplatten-Format untersucht. Im Anschluss können mithilfe von Datenbanken beobachtete signifikante Veränderungen auf die eingesetzten RNAi-Reagenzien zurückgeführt werden. Bei dem gemischten Screening-Format werden alle RNAi-Reagenzien gemischt und nach dem Zufallsprinzip zu den Zellen gegeben. Für die Selektion können zwei Strategien angewendet werden. Bei der positiven Selektion werden nur die überlebenden Zellen detektiert und es wird keine unbehandelte Kontrolle benötigt. Für eine negative Selektion wird hingegen eine unbehandelte Kontrolle zum Vergleich benötigt, um die RNAi-Reagenzien zu identifizieren, welche die Zellen resistent oder sensitiv gegen ein Selektionsreagenz machen. Im Anschluss an die Selektion (positive oder negative Selektion) erfolgt die Identifizierung der beteiligten RNAi-Reagenzien mittels *next generation sequencing* (NGS) oder durch *barcode microarrays* (Chou *u. a.*, 2015). Der erste genomweite RNAi-Screen zur Identifikation von Wirtszellfaktoren welche die Influenzavirus-Replikation beeinflussen, wurde von Hao und Kollegen im Jahr 2008 (Hao *u. a.*, 2008) in einer *Drosophila*-Zelllinie durchgeführt. Im darauffolgenden Jahr nutzen Brass und Kollegen (Brass *u. a.*, 2009) die humane U2OS Zelllinie für einen weiteren genomweiten RNAi-Screen. Weitere genomweite RNAi-Screens nach dem geordneten Screening-Format folgten durch Shapira und Kollegen (Shapira *u. a.*, 2009), König und Kollegen (König *u. a.*, 2010) und Karlas und Kollegen (Karlas *u. a.*, 2010). Neuere RNAi-Screens erfolgten in einem gemischten Screening-Format unter Verwendung lentiviraler shRNA-Expressionssysteme. Su und Kollegen (Su *u. a.*, 2013) führten eine Studie unter Verwendung eines positiven Selektionsverfahrens durch um Knockdownzellen zu selektieren, welche eine Resistenz gegenüber dem Influenzavirus-induzierten Zelltod aufwiesen. Im

Anschluss erfolgte die Sequenzierung der Zellen mittels NGS für die Identifizierung der enthaltenen shRNAs (Su *u. a.*, 2013). Ein ähnliche Studie erfolgte von Tran und Kollegen (Tran *u. a.*, 2013).

Insgesamt konnten bisher 1,362 Wirtszellfaktoren mithilfe von sieben RNAi-Screens identifiziert werden, welche in Verbindung mit der Influenzavirus-Replikation stehen. Die Überlappung der einzelnen Genkandidaten ist jedoch sehr gering. Lediglich 113 Gene konnten mithilfe von zwei Screens, 14 Gene mithilfe von drei Screens, sechs Gene mithilfe von vier Screens und kein Gen von allen unabhängigen Screens identifiziert werden. Der daraus resultierende Anteil an Kandidaten, welcher nur in einem Screen identifiziert wurde, beträgt somit ~90 %. Trotz des geringen Anteils überlappender Genkandidaten, konnten diese spezifischen Schritten des Influenzavirus-Replikationszyklus, wie beispielsweise der Endozytose (z. B. RAB5A), dem COPI Vesikeltransport (z. B. ARCN1, COPA, COPB2 und COPG), dem V-Typ ATPase Protonentransport (z. B. ATP6AP1, ATP6V0B, ATP6V0C, ATP6V0D1, ATP6V1B2), dem nukleären Import (z. B. NUP98), dem prä-mRNA-Spleißing (z. B. PRPF8), dem nukleären Export (z. B. NXF1) und der Proteintranslation (z. B. RPS10 und RPS16) zugeordnet werden. Dies zeigt, dass genomweite RNAi-Screens trotz der geringen Überlappung, essentielle Wirtszellfaktoren für die Influenzavirus-Replikation identifizieren können. Gründe für die geringe Anzahl an überlappenden Genkandidaten liegen dabei u. a. in der Verwendung unterschiedlicher Influenzaviren (Virusstamm, Virusqualität, Virussubtyp etc.), den verwendeten Wirtszellsystemen (Zelltyp, Zellqualität, genetisches Profil), den eingesetzten RNAi-Reagenzien (RNAi-Bibliothek, RNAi-Ressource, Qualität der RNAi-Bibliothek), der Screening-Methode, den Analysezeitpunkten, der Selektionskriterien und der Auswertung der geeigneten Kontrollen (mindestens zwei siRNAs/shRNAs mit gleichem Zielgen zeigen einen ähnlichen Effekt, Z-Faktor des RNAi-Screens) (Chou *u. a.*, 2015). Des weiteren muss bei RNAi-Screens beachtet werden, dass dieses Verfahren nicht die Erfassung aller beteiligten Wirtszellfaktoren erlaubt, da mit ihm keine Wirtszellfaktoren identifiziert werden können, welche für das Zellwachstum und das Überleben der Zelle essentiell sind. Des weiteren besitzen manche Wirtszellfaktoren redundante Funktionen, wodurch der Knockdown eines Faktors zu keinem Effekt führt. Zudem wird die bioinformatische Datenanalyse durch die Qualität und Quantität der zur Verfügung stehenden Daten für Protein-Interaktionen, korrekte Gennotierung, etc. limitiert (Stertz und Shaw, 2011).

3 MATERIAL UND METHODEN

In diesem Abschnitt sind die in dieser Arbeit verwendeten Materialien und Methoden aufgeführt. Bei Standardmethoden aus der Arbeitsgruppe Bioprozesstechnik am MPI Magdeburg bzw. kommerziell erhältlichen Kit-Systemen wird auf die zugehörigen sich im Anhang befindlichen Arbeitsanweisungen verwiesen. Die Durchführung neu etablierter Methoden ist im Detail erläutert. Ebenso ist eine vollständige Auflistung der verwendeten Materialien im Anhang zu finden.

3.1 ZELLKULTIVIERUNG

3.1.1 MEDIEN UND LÖSUNGEN FÜR DIE ZELLKULTIVIERUNG

Für die Kultivierung der Zellen, wurden die in Tabelle 2 und Tabelle 3 aufgelisteten Medien und Lösungen verwendet.

Tabelle 2: Auflistung und Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien

Zelllinie	Komponenten	Zusammensetzung
A549	DMEM ([+] 4,5 g/L D-Glucose, [+] NEAA, [-] L-Glutamin, [-] Pyruvat) (Kat.#: 10938-025)	
	fetales Kälberserum (FKS)	10 % (v/v)
	L-Glutamin-Lösung (200 mM)	2 mM (v/v)
	Pyruvat-Lösung (200 mM)	1 mM (v/v)
	100X Penicillin-Streptomycin-Mix	1 % (v/v)
HEK293	DMEM ([+] 4,5 g/L D-Glucose, [-] L-Glutamin, [-] Pyruvat) (Kat.#: 11960-044)	
	FKS	10 % (v/v)
HEK293SF	FreeStyle™ 293 Expression Medium (Kat.#: 12338-018)	
AGE1.HN	Adenovirus Expression Medium (AEM) (Kat.#: 12582-011)	
	L-Glutamin-Lösung (200 mM)	2 mM (v/v)
Einfriermedium	Jeweiliges Zellkulturmedium	
	DMSO	10 %

Tabelle 3: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

Komponente	Zusammensetzung
1X Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	
Natriumchlorid (NaCl)	8,0 g/L
Kaliumchlorid (KCl)	0,2 g/L
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	0,2 g/L
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	1,15 g/L
Destilliertes Wasser	
10X Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung	
Trypsin	0,05 g/L
EDTA	0,02 g/L
PBS	

3.1.2 ZELLINIEN

In dieser Arbeit wurden die vier humanen Zelllinien A549 (adhärent), HEK293 (adhärent), HEK293SF (Suspension) und AGE1.HN (Suspension) untersucht.

3.1.2.1 A549-ZELLEN

A549-Zellen sind adhärent wachsende Epithelzellen, die 1972 aus einem Lungenkarzinom eines 58-jährigen Patienten gewonnen wurden (Giard *u. a.*, 1973). Da diese Zellen ähnliche Eigenschaften wie Lungenzellen aufweisen (Dove *u. a.*, 2012), eignen sie sich besonders als Modellzelllinie für Studien mit Influenzaviren. Des Weiteren wurde diese Zelllinie für den RNAi-Screen von Karlas und Kollegen, auf dem dieses Projekt basiert, verwendet (Karlas *u. a.*, 2010). Um den Einfluss potentieller Zielgene auf die IAV-Vermehrung in humanen Zellen zu analysieren, erfolgte die Überexpression ausgewählter Wirtszellfaktoren bzw. eine Inhibition der Genexpression durch die Expression von shRNAs in lentiviral transduzierten Zellen (Auswahl der Kandidatengene siehe Abschnitt 4.3).

3.1.2.2 HEK293- UND HEK293SF-ZELLEN

HEK293-Zellen wurden in den frühen 70er Jahren durch die Transformation von menschlichen embryonalen Nierengewebszellen mithilfe von DNA-Fragmenten des Ad5 erzeugt (Graham *u. a.*, 1977) und werden heutzutage häufig als Modellsystem für die Grundlagenforschung verwendet. Die HEK293SF-Zelllinie stammt von der HEK293-Zelllinie ab und wurde an das

Wachstum in serumfreiem Medium und an die Proliferation in Suspension adaptiert (Cote *u. a.*, 1998).

3.1.2.3 AGE1.HN-ZELLEN

Bei den AGE1.HN-Zellen handelt es sich um eine sogenannte „Designer-Zelllinie“, die von der Firma ProBioGen AG aus humanen neuronalen Vorläuferzellen entwickelt wurde (Niklas *u. a.*, 2011). Mithilfe der Plasmid-vermittelten Integration der Ad5-Gene E1A und E1B in das Zellgenom wurde diese Zelllinie, ähnlich wie HEK293-Zellen, immortalisiert und stellt ein alternatives Zellsubstrat für die Produktion von Impfstoffen und therapeutischen Proteinen mit komplexen Glykosylierungsmustern dar (Niklas *u. a.*, 2011).

3.1.3 KULTIVIERUNG UND PASSAGIERUNG VON ADHÄRENTEN ZELLINIEN

Die Kultivierung der adhärennten Zelllinien erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchte von 95 % im Inkubator bis zum Erreichen einer Konfluenz von 80 % bis 90 %. Die eingesetzten Volumina für PBS (V_{PBS}), 1X Trypsin/EDTA ($V_{1X \text{ Trypsin/EDTA}}$), Stoppmedium ($V_{\text{Medium Stopp}}$) und das Kultivierungsmedium ($V_{\text{ges. Kultivierung}}$) für den jeweiligen Kulturgefäß-Typ können der Tabelle 4 entnommen werden. In dieser Zeit wurde das Kultivierungsmedium zweimal die Woche gewechselt. Für das Passagieren der adhärennten Zelllinien wurde das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA benetzt und für 3 min (HEK293) bzw. 5 min (A549) bei 37 °C inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen vom Flaschenboden wurde die Zellsuspension resuspendiert und ein Zehntel des Volumens in ein neues Kulturgefäß überführt.

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Zellkultivierungssysteme

Kulturgefäße	V_{PBS} [mL]	$V_{1X \text{ Trypsin/EDTA}}$ [mL]	$V_{\text{Medium Stopp}}$ [mL]	$V_{\text{ges. Kultivierung}}$ [mL]
96-Well-Platte	0,1	0,05	0,05	0,2
24-Well-Platte	0,5	0,15	0,85	1
12-Well-Platte	1	0,25	0,75	1
6-Well-Platte	2	0,5	1,5	2
T25-Kulturgefäß	5	0,5	1,5	8
T75-Kulturgefäß	10	1	3	13
T175-Kulturgefäß	25	3	9	32

Die Zellaussaat erfolgte 15-20 h vor dem Experimentstart.

3.1.4 KULTIVIERUNG UND PASSAGIERUNG VON SUSPENSIONSZELLINIEN

Die Kultivierung der Suspensionszelllinien erfolgte in 125 mL bzw. 250 mL Schikane-freien Schüttelkolben aus Kunststoff mit Filter in einem Volumen von 20 mL (125 mL Schüttelkolben) bzw. 40 mL (250 mL Schüttelkolben) bei 37 °C, 185 *rounds per minute* (rpm) und 5 % CO₂. Nach dem Erreichen einer Zellkonzentration von 1,2x10⁶ (HEK293SF) bzw. 2,0x10⁶ (AGE1.HN) Zellen/mL erfolgte die Zellpassagierung, um ein exponentielles Zellwachstum gewährleisten zu können. Für die Zellpassagierung wurden zunächst die Lebendzellzahl mittels *ViCell™ XR* ermittelt, das benötigte Volumen zur Herstellung einer Zellsuspension mit einer Konzentration von 0,2x10⁶ (HEK293SF) bzw. 0,5x10⁶ (AGE1.HN) Zellen/mL entnommen und in einen frischen Schüttelkolben überführt. Das restliche Volumen wurde mit frischem Medium aufgefüllt. Die Zellaussaat erfolgte direkt vor dem Experimentstart.

3.1.5 AUFTAUEN VON KRYOKONSERVIERTEN ZELLINIEN

Zum Auftauen von Kryokulturen wurden diese im Wasserbad bei 37 °C erwärmt, in ein 15 mL Falcon überführt, mit 13 mL Zellkulturmedium (Raumtemperatur - RT) versetzt und durch sanftes Invertieren gemischt. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei RT und 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin dekantiert, das Pellet in 1 mL Medium resuspendiert und in ein T25- bzw. T75-Kulturgefäß überführt (Volumina siehe Tabelle 4).

3.1.6 EINFRIEREN VON ZELLEN

Für die Kryokonservierung der Zellen wurde zunächst das Einfriermedium (siehe Tabelle 2) hergestellt und bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert. Anschließend wurden die Zellen geerntet (siehe 3.1.3 und 3.1.4), in ein 15 mL Falcon überführt, 5 min bei 300 x g und RT zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Danach wurden die Zellen mit Einfriermedium auf eine Zellkonzentration von 1-2x10⁶ Zellen/mL eingestellt, zu je 2 mL in Kryoröhrchen überführt und bei -80 °C eingefroren. Nach 24 h erfolgte die Überführung der Kryoröhrchen zur Langzeitlagerung in den flüssigen Stickstoff.

3.1.7 ZELLZAHLBESTIMMUNG MIT HILFE DES *VICELL™ XR*

Die Bestimmung der Lebend- und Gesamtzellzahl sowie der sich daraus ergebenden Zellvitalität erfolgte mittels des *ViCell™ XR*. Dafür wurden 500 bis 1000 µL der Zellsuspension in ein *ViCell™ XR* Probengefäß überführt und zur Vermessung in das Gerät gestellt. Das Grundprinzip der Zell-Vitalitätsbestimmung beruht auf einer Trypanblau-Färbung. Der validierte Bereich dieses Messgerätes liegt zwischen 9,6x10³ und 10x10⁶ Zellen/mL. Für alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurde ein speziell auf die Zellparameter angepasstes

Messprotokoll erstellt, um eine möglichst genaue Differenzierung zwischen Zellen und Zelltrümmern während der Kultivierung sowie unter Infektionsbedingungen zu gewährleisten (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: ViCell™ XR Messprotokolle

Zelllinie	HEK293/HEK293SF	A549	AGE1.HN
Threshold (%)	85,0	85,0	85
Center threshold (%)	80,0	90,0	65
Minimum diameter (microns)	11,0	5,0	7
Maximum diameter (microns)	35,0	28,0	50
Minimum center size	5,0	4,0	5
Minimum circularity	0,3	0,0	0
Frames	100,0	50,0	100
Dilution	1,0	1,0	1
Focus parameter	100,0	80,0	100
Sample flush cycles	1,0	3,0	3
Trypan blue mixing cycles	3,0	3,0	4
Internal Dilution	2,4	2,4	2,38
Decluster degree	8,0	8,0	10
Number of bins	120,0	115,0	140
Field of view (microns)	831 x 611	832 x 611	833 x 611
Sample depth (microns)	87,4	87,4	87,4
Probe volume (ml x 10 ⁻⁶)	44,4	44,4	44,4
Image size	1280 x 960	1281 x 960	1282 x 960

3.1.8 BESTIMMUNG DER SPEZIFISCHEN ZELLWACHSTUMSRATE

Aufgrund der unterschiedlichen Integrationsstellen der lentiviralen Konstrukte in das Wirtszellgenom kann es zu Unterschieden im Zellwachstum kommen. Daher wurden für einige Kandidaten (siehe Abschnitt 4.4.2) Zellwachstumsanalysen durchgeführt, wobei überprüft wurde, ob die genetische Veränderung einen Effekt auf die Verdopplungszeit sowie die Vitalität der Zellen hat. Dafür wurden $0,2 \times 10^6$ Zellen/Well in 12-Well-Platten in 2 mL Zellkulturmedium ausgesät und die Zellzahl über einen Zeitraum von 0 bis 96 h zweimal täglich mittels des ViCell™ XR bestimmt (siehe Abschnitt 3.1.7). Die Berechnung der spezifischen Zellwachstumsrate ist durch Formel 1 beschrieben. Nach Trennung der Variablen und Integration erhält man Formel 2.

Formel 1: Gleichung der spezifischen Zellwachstumsrate

$$\mu * c_{Vit} = \frac{d_{c_{Vit}}}{dt}$$

μ	spezifische Zellwachstumsrate	[h ⁻¹]
c_{Vit}	Konzentration Lebendzellzahl	[Zellen/mL]
t	Zeit	[h]

Formel 2: Gleichung nach Trennung der Variablen und Integration

$$c_{Vit}(t) = c_{Vit(0)} * e^{\mu * t}$$

Da im Bereich des exponentiellen Wachstums alle Milieufaktoren im Optimum gehalten werden, kann vereinfacht angenommen werden, dass die Zellen mit ihrer maximalen spezifischen Zellwachstumsrate wachsen ($\mu = \mu_{max}$). Um im Anschluss μ_{max} mittels einer linearen Regressionsanalyse ermitteln zu können, erfolgte eine Linearisierung der Gleichung (Formel 3).

Formel 3: Linearisierung der Differentialgleichung

$$\ln c_{Vit} = \mu * t + \ln c_{Vit(0)}$$

Die Gleichung ergibt einen logarithmischen Zusammenhang zwischen der Konzentration der Lebendzellzahl und der spezifischen Zellwachstumsrate. Somit wurde der natürliche Logarithmus der erzielten Lebendzellkonzentrationen gebildet, in ein Diagramm über die Zeit aufgetragen und eine Trendlinie durch die Punkte gelegt. Der Anstieg der erzeugten Trendlinie entspricht einem Näherungswert für die maximale spezifische Zellwachstumsrate.

3.2 VIRUSKULTIVIERUNG

3.2.1 MEDIEN FÜR DIE VIRUSINFEKTION

Für die Infektionsversuche wurde das Zellkultivierungsmedium entfernt und gegen Infektionsmedium (entsprechendes Zellkultivierungsmedium ohne Zusatz von FKS) ausgetauscht.

3.2.2 SAATVIRUSPRODUKTION

Die Saatvirusproduktion erfolgte in A549, MDCK und Vero-Zellen. Da MDCK-Zellen und Vero-Zellen im Rahmen dieser Arbeit nur für die Saatvirusproduktion eingesetzt wurden, wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit nicht weiter auf deren Kultivierung eingegangen. Das Verfahren zur Saatvirusproduktion ist Zelllinienabhängig. Um die Bildung von defekten interferierenden Viruspartikeln (DIPs) zu vermeiden, erfolgten für die Saatvirusproduktion in A549-Zellen Infektionen mit einer MOI von 10^{-5} . Anschließend wurden Proben in einem Zeitraum von 28 *hours post infection* (hpi) bis 32 hpi entnommen und der infektiöse Virustiter sowie der Gesamtvirustiter bestimmt. Als Saatvirus wurden anschließend Proben mit einem hohen Infektios- zu Gesamtvirustiter-Verhältnis verwendet.

3.2.3 VERWENDETE VIRUSSTÄMME

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 6 aufgelisteten Virusstämme verwendet.

Tabelle 6: Verwendete Virusstämme

Bezeichnung	Produziert in	Herkunft	Titer
A/Puerto Rico/8/34 (A/PR/8/34)	A549	Robert-Koch-Institut	$1,08 \times 10^8$ Viren/mL
A/Wisconsin/33 (A/WSN/33)	MDCK	Universitätsklinikum Freiburg	$1,07 \times 10^7$ Viren/mL
A/Wisconsin/33 (A/WSN/33)	Hühnereier	MPI-IB	$1,06 \times 10^7$ pfu/mL
A/Puerto Rico/8/34-deINS1 (deINS1)	Vero	AVIR Green Hills Biotechnology	$8,34 \times 10^7$ Viren/mL

3.2.4 VIRUSINFEKTION

3.2.4.1 ZELLAUSSAAT

Die Zellaussaat erfolgte wie unter 3.1.3 und 3.1.4 beschrieben. Folgende Zellzahlen wurden für die Versuche eingesetzt (siehe Tabelle 7):

Tabelle 7: Eingesetzte Zellzahlen für Infektionen

Kultivierungsgefäß	Zellzahl
6-Well-Platte	1x10 ⁶
12-Well-Platte	0,5x10 ⁶
24-Well-Platte	0,2x10 ⁶
T25-Kulturgefäß	2,5x10 ⁶
T75-Kulturgefäß	5x10 ⁶

3.2.4.2 INFEKTION

Vor Beginn der Virusinfektion wurde zunächst für jede adhärente Zelllinie die Lebendzellkonzentration aus einem Kulturgefäß bzw. aus einem Well mithilfe des *Vi-CELL™ XR* bestimmt. Das Ablösen der Zellen erfolgte wie unter 3.1.3 und Tabelle 8 beschrieben. Bei Suspensionszelllinien erfolgte eine direkte Auszählung aus dem Schüttelkolben.

Tabelle 8: Eingesetzte Volumina für die Zellzahlbestimmung

Kultivierungsgefäß	V _{1X Trypsin/EDTA} [mL]	V _{Medium Stopp} [mL]
6-Well-Platte	1	1
12-Well-Platte	0,5	0,5
24-Well-Platte	0,5	0,5

Die somit ermittelte Konzentration der Lebendzellzahl wurde anschließend für die Berechnung des benötigten Virusvolumens verwendet (Formel 4).

Formel 4: Berechnung des Saatvirusvolumens

$$V_{\text{Saatvirus (SV)}} = \frac{N_{\text{Zellen}} * \text{MOI}}{\text{TCID}_{50(\text{SV})}}$$

$V_{\text{Saatvirus}}$	Volumen Saatvirus	[mL]
N_{Zellen}	Lebendzellzahl im Kulturgefäß	[Zellen]
MOI	Multiplizität der Infektion	[Viren/Zelle]
$\text{TCID}_{50(\text{SV})}$	Konzentration infektiöser Viruspartikel im Saatvirus	[Viren/mL]

Für eine erfolgreiche Infektion der Zelle muss das HA-Protein des Influenzavirus in seine zwei Untereinheiten gespaltet werden. Da unter Zellkulturbedingungen jedoch keine natürlichen Proteasen zur Spaltung des HA-Proteins zur Verfügung stehen, wurde dem Infektionsansatz Trypsin zugegeben, um optimale Infektionsbedingungen zu schaffen (Klenk *u. a.*, 1975; Seitz *u. a.*, 2012). Die eingesetzte Trypsinkonzentration variiert dabei zwischen den verwendeten Zelltypen (Tabelle 9).

Tabelle 9: Verwendete Trypsinaktivität für die Infektion

Zelllinie	Trypsin (Units/Zelle)
A549	1×10^{-4}
HEK293	1×10^{-5}
HEK293SF	5×10^{-7}
AGE1.HN	1×10^{-6}

Die Berechnung der Trypsinmenge erfolgt nach Formel 5.

Formel 5: Berechnung der benötigten Trypsinmenge

$$V_{\text{Trypsin}} = \frac{N_{\text{Zellen}} * \text{CT}_1}{\text{CT}_2}$$

V_{Trypsin}	Volumen Trypsin	[mL]
N_{Zellen}	Lebendzellzahl im Kulturgefäß	[Zellen]
CT_1	Trypsinaktivität in der Lösung	[U/Zelle]
CT_2	Ausgangsaktivität der Trypsinlösung	[U/mL]

Um eine mögliche inhibitorische Wirkung des im Zellkulturmedium enthaltenen FKS auszuschließen, wurden die A549- und HEK293-Zellen vor Beginn der Infektion zweimal mit PBS gewaschen. Für die Infektion von HEK293SF und AGE1.HN konnte aufgrund der Verwendung von serumfreien Zellkulturmedium auf diesen Schritt verzichtet werden.

3.2.4.3 PROBENAHME

Je nach Versuchsaufbau wurden zu definierten Zeitpunkten der Infektion Proben für die Zellzahlbestimmung (siehe Abschnitt 3.1.7), den HA (siehe Abschnitt 3.5.1)- sowie den 50 % *tissue culture infective dose* (TCID₅₀) (siehe Abschnitt 3.5.2)-Assay genommen. Ein Ablösen der adhärennten Zellen war unter Infektionsbedingungen nicht notwendig, da die Trypsinkonzentration im Infektionsmedium bereits nach wenigen Minuten zum Ablösen der Zellen führt. Für die Probenahme wurden die Zellen resuspendiert, die Zellzahl bestimmt (siehe Abschnitt 3.1.7) und der restliche Ansatz zum Pelletieren der Zellen in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und bei RT für 5 min und 300 x g zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.3 UNTERSUCHUNG DER ANTIVIRALEN IMMUNANTWORT

3.3.1 STIMULATION DER ZELLEN MIT IFN- β

Für die Untersuchung der Interferon-induzierten Immunantwort in Zellen, wurde dem Zellkultur- bzw. Infektionsmedium humanes rekombinantes IFN- β (1000 U/mL) zugesetzt. Im Falle einer sich anschließenden Infektion der Zellen erfolgte die Zugabe des Infektionsmediums direkt zu dem Stimulationsansatz.

3.3.2 KNOCKDOWN ADENOVIRALER GENE MITHILFE VON siRNAs

Um den Einfluss der E1A- und E1B-Expression auf die antivirale Immunantwort in adenoviral transformierten Zellen zu untersuchen, erfolgten Knockdown-Studien mithilfe von siRNAs gegen E1A und E1B.

3.3.2.1 siRNA-DESIGN

Für das siRNA-Design wurde die Software „Invitrogen Block-iT RNAi“ verwendet, welche die Sequenzen gegen das menschliche Genom (*homo sapiens*) abgleicht, um unspezifische Bindungspartner auszuschließen. Des Weiteren wurden ein GC-Gehalt von 40-55 % und ein Mindestabstand von 100 Basenpaaren zu den Sequenzenden für die siRNAs festgelegt. Das siRNA-Design erfolgte zum Teil anhand des „Tuschl's motif“ (AA[NN19]TT) und zum anderen Teil nach dem „default motif pattern“ von ThermoFisher Scientific. Die Überhänge wurden an die Ziel-Sequenz angepasst und eine Kontroll-siRNA (weist keine Bindungsstelle im menschlichen Genom auf) wurde mit einem Fluoreszein (FLU)-Marker am 5'-Überhang versehen, um mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie die Transfektionseffizienz bestimmen zu können. Es wurden insgesamt drei siRNAs gegen E1A, sechs gegen E1B, eine gegen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und zwei Kontroll-siRNAs designet (siehe Tabelle 10). Nach Überprüfung der Knockdown-Effizienz sowie nach der Beurteilung des zytotoxischen Einflusses auf die Zellen (bestimmt anhand der Zellvitalität), wurden die grün markierten siRNAs für die Knockdown-Studien verwendet (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Liste der verwendeten siRNA-Sequenzen

siRNA	siRNA-Sequenz (Vorwärtsstrang)	siRNA-Sequenz (Rückwärtsstrang)	Knockdown- Effizienz [%]
E1A-1	5'- [UCUUCCACCUCCUAGCCAU] RNA [TT] DNA -3'	5'- [AUGGCUAGGAGGUGGAAGA] RNA [TT] DNA -3'	39,50
E1A-2	5'- [GGUCCGGUUUCUAUGCCAA] RNA [AC] DNA -3'	5'- [UUGGCAUAGAAACCGGACC] RNA [CA] DNA -3'	77,47
E1A-3	5'- [GGUGAUAGAGUGGGUU] RNA [TG] DNA -3'	5'- [AACCCACCACUCUAUCACC] RNA [CA] DNA -3'	0
E1B-1	5'- [AACCCACCACUCUAUCACC] RNA [CA] DNA -3'	5'- [UUCCACUUGUAAUCCUCC] RNA [TT] DNA -3'	56,92
E1B-2	5'- [GAGAAGGUCAUCAAGACUU] RNA [TG] DNA -3'	5'- [AAGUCUUGAUGACCUUCUC] RNA [TT] DNA -3'	40,75
E1B-3	5'- [GGUCAUCAAGACUUUGGAU] RNA [TT] DNA -3'	5'- [AUCCAAAGUCUUGAUGACC] RNA [TT] DNA -3'	40,13
E1B-4	5'- [GGAGAUAGAUACGGAGGAU] RNA [AG] DNA -3'	5'- [AUCCUCCGUAUCUAUCUCC] RNA [AC] DNA -3'	47,70
E1B-5	5'- [CCGACUGUGGUUGCUUCAU] RNA [GC] DNA -3'	5'- [AUGAAGCAACCACAGUCGG] RNA [AG] DNA -3'	71,58
E1B-6	5'- [GGAGGCUAUUAGGGUAUUAU] RNA [TG] DNA -3'	5'- [AUAUACCCUAAUAGCCUCC] RNA [TC] DNA -3'	60,63
GAPDH	5' - [AUUCCAUGGCACCGUCAAG] RNA [GC] DNA	5' - [CUUGACGGUGCCAUGGAU] RNA [TT] DNA	

siRNA	siRNA-Sequenz (Vorwärtsstrang)	siRNA-Sequenz (Rückwärtsstrang)	Knockdown- Effizienz [%]
Kontrolle 1	5' - [GUGCAGAGUAUGGUUAUAGU] RNA [TT] DNA FLU	5' - [ACUAUACCAUACUCUGCAC] RNA [TT] DNA FLU	
Kontrolle 2	5' - [GGGUAGGUGGAGUGUAGUU] RNA [TT] DNA	5' - [AACUACACUCCACCUACCC] RNA [TT] DNA	

(grün) ausgewählte siRNAs

3.3.2.2 TRANSFEKTION VON siRNAs

Für die Transfektion der siRNAs wurde das *Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent* von ThermoFisher und Opti-MEM®-Medium nach Herstellerangaben verwendet. Für die IFN-β-Stimulationsversuche kam das „Rückwärts-Transfektionsverfahren“ und für die Infektionsstudien das „Vorwärts-Transfektionsverfahren“ zum Einsatz (siehe Herstellerangaben). Bei dem „Vorwärts-Transfektionsverfahren“, werden die Zellen 15-20 h vor der Zugabe des Transfektionsmixes ausgesät. Beim „Rückwärts-Transfektionsverfahren“ werden die Komplexe direkt in den Wells gebildet und anschließend erfolgt die Zugabe der Zellsuspension. Die Versuche erfolgten in 12- bzw. 24-Well-Platten. Mit den ausgewählten siRNAs konnte eine Knockdown-Effizienz von mindestens 70 % nach 48 h erzielt werden, wobei die Zellvitalität über den Versuchszeitraum mit > 90 % stabil blieb.

3.4 UNTERSUCHUNG DER ÜBEREXPRESSIONS- UND KNOCKDOWNZELLINIEN

Für die Erzeugung der Überexpressions- und Knockdownzelllinien kam das lentivirale Transduktionsverfahren zum Einsatz. Dieses stellt ein sehr effizientes und schnelles System dar, um Zellen genetisch zu verändern, indem die gewünschten Gensequenzen stabil in das Wirtszellgenom integriert werden. Zudem kann durch eine Co-Expression von Fluoreszenz- (z. B. grün-fluoreszierende Protein (GFP))- und Resistenzmarkern (z. B. Neomycinresistenz (Neo)) eine Selektion auf erfolgreich transduzierte Zellen erfolgen. Für die Knockdownzelllinien wurde ein Konstrukt gewählt, welches sowohl die Expression der gewünschten shRNA unter Kontrolle des H1-Promotors erlaubt als auch die GFP-Expression durch den *human elongation factor-1 alpha* (EF1-alpha)-Promotor (siehe Abbildung 8). Für die Herstellung der Überexpressionszellen wurden die benötigten komplementären DNA (cDNA)-Sequenzen über das I.M.A.G.E Konsortium bezogen, mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und in den lentiviralen Vektor pLV-X-GFPneo kloniert, welcher auf dem

pLVtTRKRAB-Red Konstrukt (Wiznerowicz und Trono, 2003) basiert (siehe Abbildung 9). Der Einbau der gewünschten cDNA Sequenz erfolgte durch die Öffnung des Vektors mithilfe von BamHI und MluI in das erste Cistron. Durch die Verbindung des zweiten Cistrons mit dem ersten Cistron über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES), wird eine gekoppelte Expression des Zielgens (GOIs) und des *enhanced GFP* (eGFP)/Neo-Fusionsproteins über den EF1-alpha-Promotor ermöglicht. Das Vektordesign und die Herstellung der lentiviral transduzierten Zelllinien erfolgten am HZI in Braunschweig unter der Leitung von Prof. Dr. Dagmar Wirth (Überexpressionszelllinien) und die Herstellung der Knockdownzelllinien am MPI-IB in Berlin unter der Leitung von Dr. Alexander Karlas.

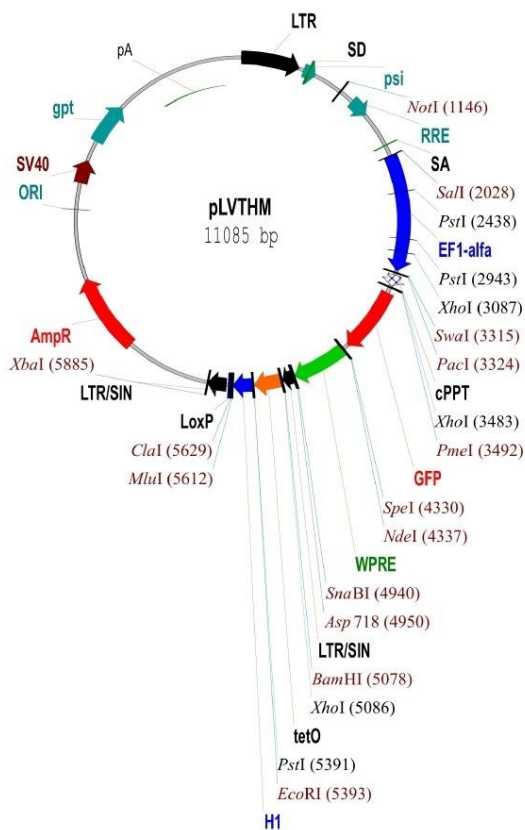


Abbildung 8: Vektorkarte für die Herstellung der Knockdownzelllinien. Für die Generierung der Knockdownzelllinien wurde der Vektor pLVTHM verwendet. Für die GFP-Expression kam der EF1-alpha-Promotor und für die shRNA-Expression der H1-Promotor zum Einsatz.

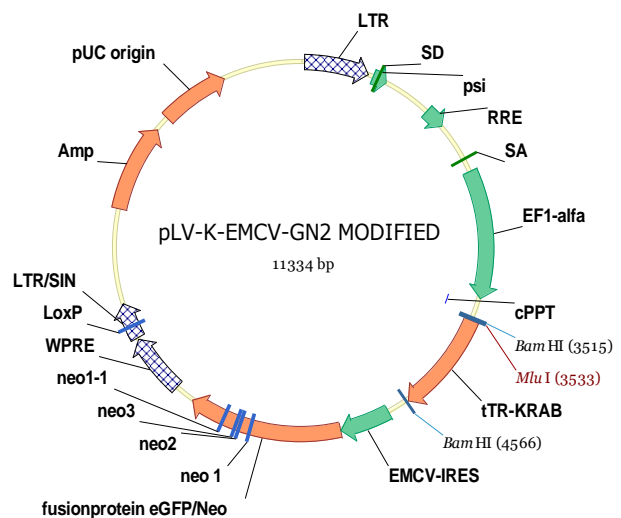


Abbildung 9: Vektorkarte für die Herstellung der Überexpressionszelllinien. Für die Generierung der Überexpressionszelllinien wurde eine modifizierte Variante des pLVtTRKRAB-Red-Vektors verwendet. Die gekoppelte Expression des GOIs und des eGFP/Neo-Fusionsproteins erfolgte über den EF1-alpha-Promotor. Die Verbindung der zwei Cistrons erfolgte über ein IRES Element. Dargestellt ist ein Beispielvektor, welcher die Encephalomyocarditis-Virus (EMCV)-Sequenz im ersten und das eGFP/Neo-Fusionsprotein im zweiten Cistron besitzt.

3.4.1 VIRUSTITER-SCREENING VON ZELLINIEN

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 39 Überexpressionszelllinien inklusive Kontrollen (kodierend für 22 Gene) und 19 Knockdownzelllinien inklusive Kontrolle (kodierend für 19 Gene) untersucht (siehe Tabelle 29). Zur Beurteilung der Virusproduktionseigenschaften erfolgten Infektionen mit Probenahmen zu frühen und zu späten Zeitpunkten sowie mit verschiedenen Influenzavirus-Stämmen. Die Bestimmung der optimalen Zeitpunkte für die Probenahmen erfolgte in Vorversuchen. Dabei wurden die frühen Probenahmezeitpunkte so gewählt (wenn nicht anders angegeben), dass sie im dynamischen Bereich der Virusproduktion liegen und zudem gut bestimmbare Werte für die Gesamtvirustiter im validierten Bereich des Hämagglutinationshemmtests (HA-Assay) liefern (A/PR/8/34: 36 hpi und 42 hpi, A/WSN/33: 60 hpi und 66 hpi). Die späten Probenahmezeitpunkte erfolgten (wenn nicht anders angegeben), zu Zeitpunkten außerhalb der dynamischen Phase des Gesamtvirustiteranstieges (A/PR/8/34: 72 hpi, A/WSN/33: 96 hpi) sowie nach dem Erreichen des finalen Gesamtvirustiters (A/PR/8/34: 96 hpi, A/WSN/33: 120 hpi). Das Screening der Zelllinien erfolgte im 12-Well-Plattenformat und umfasste jeweils mindestens drei biologische Replikate und zwei technische Replikate.

3.4.2 KLONALE EXPANSION

Ein Nachteil des lentiviralen Transduktionsverfahrens besteht in dem zufälligen Integrationsort der einzubauenden Sequenzen, sodass die selektierten Zellpopulationen eine Vielzahl verschiedenster Integrationsorte und Genomkopien aufweisen. Dies wiederum kann hinsichtlich der Virusproduktion zu sehr starken Zell-zu-Zell-Variabilitäten innerhalb der Population führen. Um diese Variabilität zu verringern, erfolgte für einige der vielversprechendsten Kandidaten eine Expansion von Einzelzellen. Dabei wurden Einzelzellen aus einer heterogenen Zellpopulation isoliert und separat vermehrt. Um ausschließlich die Vermehrung transduzierter Einzelzellen sicherzustellen, erfolgten alle Schritte unter Verwendung von Geneticin (G418). Für die klonale Expansion wurde wie folgt vorgegangen: Am ersten Tag wurden die Zellen geerntet (siehe Abschnitt 3.1.3) und die Zellzahl bestimmt (siehe Abschnitt 3.1.7). Im Anschluss erfolgte eine schrittweise Verdünnung der Zellsuspension bis zu einer Gesamtzellkonzentration von 20 Zellen/mL. Daraufhin wurden 50 µL dieser Zellsuspension in die Wells einer 384-Well-Platte überführt. Nach fünf bis sechs Tagen wurden die Wells mit mikroskopisch identifizierten Einzelzellen erneut überprüft. Dabei wurde darauf geachtet, ob die räumliche Anordnung aller adhärent wachsenden Zellen die Abstammung von einer Ursprungszelle nahelegte. War dies nicht der Fall, wurden diese Zellen verworfen. Im Anschluss wurden die Zellen mit 100 µL PBS gewaschen, mit 50 µL vorgewärmten Trypsin (37 °C) benetzt und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach dem Abstoppen

des Trypsins mit 50 μ L Zellkulturmedium, erfolgte das Auffüllen der Suspension auf ein Gesamtvolumen von 200 μ L und die Überführung in eine 96-Well-Platte. Aufgrund des geringen Arbeitsvolumens und der damit verbunden schwachen Trypsinverdünnung wurde am darauffolgenden Tag ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach drei Tagen konnten die Zellen in eine 24-Well-Platte sowie nach weiteren sechs bis acht Tagen in eine 6-Well-Platte übertragen werden. In Tabelle 11 sind die verwendeten Volumina für die klonale Expansion aufgelistet.

Tabelle 11: Eingesetzte Volumina für die klonale Expansion

Kultivierungsgefäß	V_{1X Trypsin/EDTA} [mL]	V_{Medium Stopp} [mL]	V_{ges. Kultivierung} [mL]
96- in 24-Well-Platte	0,15	0,85	1
24- in 6-Well-Platte	0,5	0,5	3

Für die Herstellung der Einzelzell-basierten Zellpopulationen wurden die Zelllinien CEACAM6 high, NXF1 pop, PLD2 low und XAB2 pop verwendet. Die Auswahl dieser Zelllinien erfolgte anhand der erzielten Ergebnisse bei den Virustiter-Screenings (siehe Abschnitt 4.4.3). Je Zelllinie wurden acht bis zehn Einzelzell-basierte Populationen erzeugt, nach dem Erreichen der Konfluenz kryokonserviert (siehe Abschnitt 3.1.6) und die mRNA-Expression des GOI mittels *real time* PCR (siehe Abschnitt 3.5.3) sowie die GFP-Fluoreszenzintensität mittels Durchflusszytometrie (siehe Abschnitt 3.5.7) bestimmt.

3.5 ANALYTIK

3.5.1 BESTIMMUNG DER GESAMTVIRUSTITER (HA-ASSAY)

Für die Bestimmung des Gesamtvirustiters (infektiöser und nicht-infektiöser Titer) wurde der HA-Assay angewendet. Dabei binden die HA-Oberflächenproteine auf den Viren an die Sialinsäure-Rezeptoren auf der Plasmamembran von Erythrozyten und vernetzen diese (Kalbfuss *u. a.*, 2008). Dieser Prozess wird als Hämagglutination bezeichnet. Sind in der Probe keine oder nur wenige HA-haltige Partikel enthalten, kommt es zur Sedimentation der Erythrozyten. Durch Titration der Virusproben kann somit die kritische Konzentration an Viruspartikeln bestimmt werden, die diese Sedimentation gerade noch unterbindet. Der negative Logarithmus dieser Verdünnungsstufe wird als logarithmischer HA-Titer definiert [\log HAU/100 μ L] und dient als Maß für die Konzentration der Viruspartikel in der Probe. Das Detektionslimit des HA-Assays liegt bei 0,15 \log HAU/100 μ L. Unter der Annahme, dass die Anzahl der Erythrozyten proportional zur Anzahl der Viruspartikel ist, entspricht dies einer Anzahl von 2×10^7 Viruspartikel pro Milliliter (Kalbfuss *u. a.*, 2008). Die Standardabweichung dieses Testsystems liegt bei $\pm 0,03 \log$ HAU/100 μ L. Mithilfe der Formel 6 kann die absolute Partikelanzahl anhand des gemessenen HA-Titers berechnet werden.

Formel 6: Berechnung der Viruspartikel-Konzentration

$$C_{VP} = C_{ER} * 10^{HA}$$

C_{VP}	Konzentration Gesamtviruspartikel	[Viren/100 μ L]
C_{ER}	Konzentration Erythrozyten	[Zellen/mL]
HA	Gesamtvirustiter	[\log HAU/100 μ L]

Die Durchführung kann der Arbeitsanweisung im Abschnitt 0 entnommen werden.

3.5.2 BESTIMMUNG DER KONZENTRATION INFEKTIÖSER VIRUSPARTIKEL (TCID₅₀-ASSAY)

Die Konzentrationsbestimmung der infektiösen Viruspartikel erfolgte durch einen Immunotitrations-Assay, welcher auch als TCID₅₀-Assay bezeichnet wird. Eine detaillierte Beschreibung der Durchführung kann der Arbeitsanweisung im Abschnitt 0 entnommen werden. Das Detektionslimit für dieses Testverfahren liegt bei $3,2 \times 10^2$ infektiösen Viren/mL.

3.5.3 RELATIVE RNA-QUANTIFIZIERUNG MITTELS REV-T-PCR

3.5.3.1 PROBENAHME

Zur Gewinnung zellulärer RNA-Proben wurden 500-1000 µL der Zellsuspension (maximal 5×10^6 Zellen) in ein Nuklease-freies Reaktionsgefäß überführt, 5 min bei 300 x g und RT zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet durch Zugabe des RA1-Lysepuffers (RA1-Puffer, 1 % β -Mercaptoethanol) aus dem *NucleoSpin® RNA Kit* von Macherey-Nagel lysiert. Die Gewinnung intrazellulärer viraler RNA-Proben erfolgte wie für die zellulären RNA-Proben, jedoch war hierbei essentiell, dass die gleiche Anzahl an Zellen je Probe aliquotiert wurde. Im Anschluss erfolgte die Lagerung dieser Proben bei -80 °C bis zur Aufreinigung.

3.5.3.2 RNA-ISOLATION

Die RNA-Isolation erfolgte mithilfe des *NucleoSpin® RNA Mini Kits* von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben unter Verwendung des Protokolls „*RNA purification from cultured cells and tissue*“. Nach der erfolgreichen Aufreinigung der RNA wurde diese in 60 µL Nuklease-freiem Wasser eluiert und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

3.5.3.3 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN

Für die Berechnung der Nukleinsäure-Konzentration wurde die optische Dichte bei einer Absorption von 260 nm mithilfe des *Infinite 200 PRO NanoQuant* (Tecan) und unter Verwendung der *NanoQuant*-Platte gemessen. Dabei entspricht eine OD von 1 bei 260 nm 50 µg/mL dsDNA bzw. 40 µg/mL ssRNA (Mülhardt, 2013). Um eine mögliche Kontamination der Proben mit Proteinen auszuschließen, wurde zudem die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen und das Verhältnis von $A_{260 \text{ nm}}$ zu $A_{280 \text{ nm}}$ berechnet (Mülhardt, 2009). Ein Verhältnis von $\sim 1,8$ wird generell für kontaminationsfreie DNA und ein Verhältnis von $\sim 2,0$ für kontaminationsfreie RNA angenommen.

3.5.3.4 RELATIVE QUANTIFIZIERUNG ZELLULÄRER RNAS

Für die Untersuchung der zellulären mRNA-Expression erfolgte eine relative Quantifizierung zu den Expressionsleveln ausgewählter Referenzgene. Dabei kam (wenn nicht anders angegeben), unter nicht-Infektionsbedingungen GAPDH und bei Infektionsexperimenten 18S RNA zum Einsatz. GAPDH wird sehr häufig als Referenzgen aufgrund seiner konstanten Expression innerhalb der Zelle verwendet (Kozera und Rapacz, 2013). Während einer Infektion kommt es jedoch aufgrund der Virusreplikation zu starken Schwankungen bei der zellulären Genexpression. Im Gegensatz dazu wird die Expression der 18S RNA nur sehr

schwach durch die Virusreplikation beeinflusst, sodass diese im Fall einer Infektion ein geeigneteres Referenzgen darstellt (Kuchipudi *u. a.*, 2012). In der nachfolgenden Tabelle 12 sind alle verwendeten Vorwärts (*for*)- und Rückwärts (*rev*)-Primersequenzen aufgelistet.

Tabelle 12: Verwendete Primersequenzen

Primer	Primersequenz
18S RNA <i>for</i>	5'-CGGACAGGATTGACAGATTG-3'
18S RNA <i>rev</i>	5'-CAAATCGCTCCACCAACTAA-3'
GAPDH <i>for</i>	Hs_GAPDH_1_SG QuantiTect Primer Assay
GAPDH <i>rev</i>	Hs_GAPDH_1_SG QuantiTect Primer Assay
IFN- β <i>for</i>	5'-CAGCAATTTTCAGTGTGACAAGC-3'
IFN- β <i>rev</i>	5'-TCATCCTGTCCTTGAGGCAGT-3'
IRF7 <i>for</i>	5'-CAACCAAGGCTCCTGGAGAG-3'
IRF7 <i>rev</i>	5'-CGGCCCTTGTACATGATGGT-3'
ISG15 <i>for</i>	5'-ACAGCCATGGGCTGGGA-3'
ISG15 <i>rev</i>	5'-CAGGGACACCTGGAATTCGT-3'
MxA <i>for</i>	5'-AGGTCAGTTACCAGGACATC-3'
MxA <i>rev</i>	5'-ATGGCATTCTGGGCTTTATT-3'
E1A <i>for</i>	5'-ATAGCTGTGACTCCGGTCCT-3'
E1A <i>rev</i>	5'-ACTCTCACGGCAACTGGTTT-3'
E1B <i>for</i>	5'-GTAGTGCTGGATGTGACCGA-3'
E1B <i>rev</i>	5'-TCGCTAGAGCCAAACTCAGC-3'
FANCG <i>for</i>	5'-GGTGCCCAAAAAGTGGCAAT-3'
FANCG <i>rev</i>	5'-GCTCACAGTTGAAAGCTGCC-3'
CEACAM6 <i>for</i>	5'-GCTCTTTATCCCCAACATCACTGT-3'
CEACAM6 <i>rev</i>	5'-GAGAGGACAGGAGCACTTCCAG-3'
XAB2 <i>for</i>	5'-TCCGACATCTGGAGCACCTA-3'
XAB2 <i>rev</i>	5'-AGCAGGTACAAGGTCTTGGC-3'
PLD2 <i>for</i>	5'-TCAATGACCGGAGCTTGCTG-3'
PLD2 <i>rev</i>	5'-AGTGCTTCCGCAGACTCAAG-3'
NXF1 <i>for</i>	5'-TCAAAGGCCTCCGTTTCAGAC-3'
NXF1 <i>rev</i>	5'-TGCGATTCAGGACAACGTCA-3'
PACSIN1 <i>for</i>	5'-AACGACCTGATGAACTGCGT-3'
PACSIN1 <i>rev</i>	5'-GCCATACTGTGGGCCTTTCT-3'
PI4KB <i>for</i>	5'-TACATTGGCAACCGGCTCTT-3'
PI4KB <i>rev</i>	5'-ACGGTGGACTATGTAGGGCT-3'
MAGI2 <i>for</i>	5'-GATGGGAGTCCTGCAGATCG-3'
MAGI2 <i>rev</i>	5'-AGCGTGAGGCATGTTTCATGA-3'
ROR2 <i>for</i>	5'-ACGTACGATGGAAGTGTGT-3'

Primer	Primersequenz
ROR2 <i>rev</i>	5'-CGGCACATGCAAACCAAGAA-3'

3.5.3.4.1 Reverse Transkription der zellulären RNA

Die reverse Transkription (RevT) der zellulären mRNA in cDNA erfolgte mit der *RevertAid H Minus Reverse Transcriptase* von ThermoFisher. In dieser Arbeit wurden Oligo(dT)-Primer (5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTT-3') für die cDNA-Synthese verwendet. Die Durchführung erfolgte wie in Tabelle 13 und Tabelle 14 beschrieben.

Tabelle 13: Zusammensetzung RevT-Ansatz Teil 1

Komponente	Menge
RNA	300-500 ng
Oligo(dT)-Primer	0,5 µg
Nuklease-freies Wasser	auf 12,5 µL

Der Ansatz Teil 1 wurde gründlich gemischt, kurz zentrifugiert, für 5 min bei 65 °C im Thermocycler inkubiert und danach auf 4 °C gekühlt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe folgender Substanzen:

Tabelle 14: Zusammensetzung RevT-Ansatz Teil 2

Komponente	Menge
<i>5X Reaction Buffer</i>	4 µL
Thermo Scientific™ RiboLock™ RNase Inhibitor	0,5 µL (20 U)
10 mM Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP)- Mix	2 µL (finale Konzentration 1 mM)
<i>RevertAid H Minus Reverse Transcriptase</i>	0,5 µL (100 U)
Nuklease-freies Wasser	0,5 µL

Der Ansatz wurde erneut gut gemischt, kurz zentrifugiert und anschließend 60 min bei 42 °C im Thermocycler inkubiert. Zum Schluss wurde die Reaktion für 10 min bei 70 °C terminiert und die Proben 1:5 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20 °C. Um Kontaminationen mit zellulärer DNA ausschließen zu können, wurde neben dem cDNA-Ansatz eine *no-reverse transcriptase* (NRT)-Kontrolle mitgeführt, welche anstelle der *RevertAid H Minus Reverse Transcriptase* Nuklease-freies Wasser enthielt. Des weiteren

erfolgte der Ansatz einer *no template*-Kontrolle (NTC), welche anstelle der cDNA Wasser enthielt um eventuelle Kontaminationen der eingesetzten Reagenzien ausschließen zu können.

3.5.3.4.2 *Real-time* PCR zellulärer RNA-Proben

Für die Durchführung der RevT *real-time* PCR (*real-time* PCR) wurde das *Rotor-Gene SYBR® Green PCR Kit* und der *Rotorgene Q* von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet. Das verwendete Pipettierschema sowie das Temperaturprofil können der Tabelle 15 und der Tabelle 16 entnommen werden.

Tabelle 15: Zusammensetzung des *real-time* PCR-Ansatzes

Komponente	Menge
cDNA	4 µL
Primermix (Vorwärts-und Rückwärtsprimer)	1 µL (jeweils 10 µM)
<i>SYBR® Green PCR Master Mix (2X)</i>	

Tabelle 16: Temperaturprofil der *real-time* PCR

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
Denaturierung	95 °C	5 min
Amplifikation 40 Zyklen	Denaturierung	5 sek
	Anlagerung	15 sek
	Elongation	10 sek
Denaturierung	95 °C	15 sek
Schmelzvorgang	60 °C - 95 °C	140 sek

Alle weiteren Pipettierarbeiten erfolgten durch den Pipettierroboter *QIAgility* von Qiagen und unter Verwendung von „*Rotor-Disc 100*“ Ringen. Neben den zu untersuchenden Proben und Kontrollen wurden zwei Wasserproben mit dem *real-time* PCR-Ansatz versetzt, um mögliche Kontaminationen in diesem Ansatz zu detektieren. Alle Proben wurden als Doppelbestimmung gemessen. Zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green wurde eine Wellenlänge von 470 nm genutzt und das Signal bei einer Wellenlänge von 510 nm detektiert. Für die Auswertung der Daten wurde ein *cycle of treshold* (CT)-Wert von 0,05 verwendet.

3.5.3.4.3 Berechnung der relativen Genexpression

Zur Berechnung der relativen Genexpression wurde die $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode entsprechend Formel 7 verwendet (Livak und Schmittgen, 2001).

Formel 7: Berechnung der relativen Genexpression

$$\text{Relative Genexpression} = 2^{-(CT_{GOI} - CT_{REF}) - (CT_{GOI, Kal} - CT_{REF, Kal})}$$

CT_{GOI}	CT-Wert des Zielgens in behandelter Probe
CT_{REF}	CT-Wert des Referenzgens in behandelter Probe
$CT_{GOI, Kal}$	CT-Wert des Zielgens in Kalibratorprobe
$CT_{REF, Kal}$	CT-Wert des Referenzgens in Kalibratorprobe

3.5.4 ABSOLUTE QUANTIFIZIERUNG INTRAZELLULÄRER VIRALER RNAS

3.5.4.1 HERSTELLUNG DES RNA-STANDARDS

Um eine absolute Quantifizierung der RNA-Moleküle innerhalb der Proben zu ermöglichen, wurde mithilfe von RNA-Standards mit bekannter Konzentration eine Verdünnungsreihe hergestellt, diese in cDNA umgeschrieben und anschließend zur Erstellung einer Standardgeraden genutzt. Die Herstellung des RNA-Standards erfolgte wie in der Arbeitsanweisung „*Preparation of RNA Standards*“ beschrieben (siehe Anhang 0). Nach erfolgreicher Herstellung und Überprüfung der Standardqualität, wurden die RNA-Standards auf eine Konzentration von 5 ng/μL eingestellt, zu jeweils 15 μL aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.5.4.2 REVERSE TRANSKRIPTION INTRAZELLULÄRER VIRALER RNAS

Um die Differenzierung der drei RNA-Spezies (v/c/mRNA) der acht IAV-Segmente zu ermöglichen, kamen sequenz- und polaritätsspezifische Primer zum Einsatz. Für die weiteren Analysen wurde das Segment 5 ausgewählt. Um zudem eine absolute Quantifizierung der RNA-Molekülanzahl durchführen zu können, wurden für jede virale RNA-Spezies und jedes Segment spezifische, synthetische Standards (siehe Abschnitt 3.5.4.1) verwendet. Die verwendeten Primersequenzen können Tabelle 17 entnommen werden.

Tabelle 17: Verwendete Primersequenzen

	Primer	Sequenz	Bindestelle
Standards	Segment 5 Uni <i>for</i>	AGCAAAAGCAGGGTAGATAATC	1 - 22
	Segment 5 Uni <i>rev</i>	AGTAGAAACAAGGGTATTTTTTC	1543 - 1565
	Segment 5 Uni T7 <i>for</i>	TAATACGACTCACTATAGGGAGC AAAAGCAGGGTAGATAATC	1 - 22
	Segment 5 Uni T7 <i>rev</i>	TAATACGACTCACTATAGGGAGT AGAAACAAGGGTATTTTTTC	1543 - 1565
	A/PR/8/34 Segment 5 dT <i>rev</i>	TTTTTTTTTTTTTTTTCTTTAATTGT C	1533 - 1549
RevT	A/PR/8/34 Segment 5 tagRT N <i>rev</i>	GCTAGCTTCAGCTAGGCATC AGTAGAAACAAGGGTATTTTTTCTT	1541 - 1565
	Oligo tagdTRT <i>rev</i>	GTA AACGACG GCCAGTTTTTTTTT TTTTTTTTT	
	A/PR/8/34 Segment 5 tagRT SP6 <i>for</i>	ATTTAGGTGACACTATAGAAGCG AGTGATTATGAGGGACGGTTGAT	192 - 215
real-time PCR	A/PR/8/34 Segment 5 Realtime <i>for</i>	GGAAAGTGCAAGACCAGAAGAT	1388 - 1410
	A/PR/8/34 Segment 5 Realtime <i>rev</i>	CGCACTGGGATGTTCTTC	282 – 300

Um mögliche Fehlamplifikationen durch einen Primerüberschuss zu verhindern, wurde für den RevT-Ansatz der vRNA und cRNA nur 1 µL einer 1 µM Primerlösung verwendet. Aufgrund des Primerdesigns des mRNA RevT-Primers werden alle in der Probe enthaltenen polyadenylierten RNAs umgeschrieben, was zu einer Primerlimitierung führen könnte. Aufgrund dessen erfolgte in diesem Fall der Einsatz einer 10-fach höheren Primerkonzentration. Des Weiteren wurde den synthetischen RNA-Standard-Proben zelluläre RNA aus A549-Zellen zugesetzt um „zelluläre“ Bedingungen wie in den zu untersuchenden Proben nachzuahmen. Details zur Zusammensetzung des RevT-Ansatzes für die Proben sowie für die Standardreihe sind in Tabelle 18 und Tabelle 19 aufgeführt.

Tabelle 18: Zusammensetzung des RevT-Ansatzes für Proben Teil 1

Komponente	Menge
RNA	1 µL
Primer (1 µM bzw. 10 µM)	1 µL
dNTP-Mix (10 mM)	1 µL
Nuklease-freies Wasser	11,5 µL

Tabelle 19: Zusammensetzung des RevT-Ansatzes für die Standardreihe Teil 1

Komponente	Menge
RNA-Standard	1 µL
Primer (1 µM)	1 µL
Totale RNA aus A549 Zellen (350 ng/µL)	1 µL
dNTP-Mix (10 mM)	1 µL
Nuklease-freies Wasser	10,5 µL

Die Ansätze wurden gründlich gemischt, kurz zentrifugiert, für 5 min bei 65 °C im Thermocycler inkubiert und anschließend auf 55 °C (v/cRNA) bzw. 40 °C (mRNA) abgekühlt. Um mögliche Fehlbindungen der eingesetzten Primer zu verhindern, wurde der Teil 2 (siehe Tabelle 20) des RevT-Ansatzes vor der Zugabe ebenfalls auf 55 °C bzw. 40 °C erwärmt.

Tabelle 20: Zusammensetzung des RevT-Ansatzes für Proben und Standardreihe Teil 2

Komponente	Menge
5X Reaktions-Puffer	4 µL
<i>Maxima H Minus Reverse Transcriptase</i> (200 U/µL)	0,5 µL
RiboLock™ RNase Inhibitor (40 U/µL)	0,5 µL
Nuklease-freies Wasser	0,5 µL

Die Ansätze 1 und 2 wurden durch dreimaliges Auf- und Abpipettieren gründlich vermischt und 30 min bei 60 °C inkubiert. Das Abstoppen der RT-Reaktion erfolgte für 5 min bei 85 °C.

3.5.4.3 REAL-TIME PCR INTRAZELLULÄRER VIRALER RNAs

Der Ansatz der *real-time* PCR erfolgte wie unter Abschnitt 3.5.3.4.2 beschrieben unter Verwendung des in Tabelle 21 beschriebenen Temperaturprofils.

Tabelle 21: Temperaturprofil der qPCR von viralen RNAs

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
Denaturierung	95 °C	5 min
Amplifikation 40 Zyklen	Denaturierung	95 °C
	Elongation	62 °C
Denaturierung	95 °C	15 sek
Schmelzvorgang	60 °C - 95 °C	140 sek

3.5.4.4 BERECHNUNG DER VIRALEN RNA-MOLEKÜLANZAHL

Zur absoluten Quantifizierung der viralen RNA-Moleküle wurden die CT-Werte der Standard-Verdünnungsstufen gegen den dekadischen Logarithmus der in der *real-time* PCR eingesetzten Menge an Standard-Molekülen aufgetragen und über eine lineare Regression eine Trendlinie erzeugt. Anschließend erfolgte die Berechnung der viralen RNA-Moleküle mit Formel 8.

Formel 8: Berechnung der Molekülanzahl

$$n_{\text{Moleküle}} = \frac{m_{\text{Standard}}}{k * N_{\text{Basen}} * N_A^{-1} * 10^9}$$

$n_{\text{Moleküle}}$	Anzahl viraler RNA-Moleküle	[-]
m_{Standard}	eingesetzte Standard-Menge	[ng]
k	Molekulargewicht einer ssRNA-Base 1 Da entspricht 1 g/mol	[Da/bp]
N_{Basen}	Fragmentlänge	[bp]
N_A	Avogadro Konstante	[mol ⁻¹]

Anschließend erfolgte die Berechnung der Molekülanzahl pro Zelle mithilfe der Formel 9.

Formel 9: Berechnung der Molekülanzahl pro Zelle

$$SQ_{\text{Probe}} = \frac{10^{\frac{CT-b}{m}} * F_{\text{RT}} * F_{\text{Eluat}}}{n_{\text{Zellen}}}$$

SQ_{Probe}	Anzahl der Moleküle pro Zelle	[Moleküle/Zelle]
$10^{\frac{CT-b}{m}}$	Moleküle in der <i>real-time</i> PCR b = y-Achsenabschnitt m = Anstieg der Gerade CT = Schwellenwert	[Moleküle]
F_{RT}	Verdünnungskoeffizient der RevT	[-]
F_{Eluat}	Verdünnungskoeffizient des RNA-Eluats	[-]
n_{Zellen}	Anzahl der Zellen	[Zellen]

3.5.5 UNTERSUCHUNG DER VIRALEN PROTEINEXPRESSION

3.5.5.1 PROBENGEWINNUNG

Für die Untersuchung der viralen NP, M1 und PA Proteinexpression wurden am Vortag 1×10^6 Zellen/Well in 6-Well-Platten ausgesät. Dabei wurden Wells für die Bestimmung der Zellzahl vor der Infektion sowie Proben für 4 hpi, 6 hpi und 8 hpi angesetzt. Für die Infektion wurden die Zellen gewaschen und mit 3 mL Infektionsmedium mit einer MOI 50 infiziert. Für die Probengewinnung wurde die Zellsuspension gut durchmischt und 1,5 mL in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Daraufhin erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 300 x g, das Verwerfen des Überstandes und die Zugabe des restlichen Zellsuspensionsvolumens. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 1 mL PBS gewaschen und die Probe erneut für 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 200 μ L *radioimmunoprecipitation assay* (RIPA)-Puffer (siehe Tabelle 22 und Tabelle 23) aufgenommen und mit einer Spritze (Querschnitt der Nadel 0,2 μ m) durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren auf Eis homogenisiert. Anschließend erfolgte eine Pelletierung der Zelltrümmer durch Zentrifugation für 10 min bei 17.000 x g bei 4 °C, die Aliquotierung des Überstandes und das Einfrieren bei -80 °C.

Tabelle 22: Zusammensetzung des RIPA-Stocks

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

Tabelle 23: Zusammensetzung RIPA-Lysepuffer

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

3.5.5.2 BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem *Pierce BCA Protein Assay Kit* von ThermoFisher Scientific gemäß den Herstellerangaben. Als Standard wurde Rinderserumalbumin (BSA) verwendet.

3.5.5.3 SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE UND WESTERN BLOT

Die Durchführung der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgte wie in der Arbeitsanweisung im Abschnitt 0 beschrieben. Je Probe wurden 18 µg Protein aufgetragen. Als Marker kam der *MagicMarker® Protein Ladder* von ThermoFisher Scientific zum Einsatz. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 24 aufgeführt. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. Die Detektion durch Chemolumineszenz erfolgte unter Verwendung des *SuperSignal West Dura Extended Duration Substrats* (Thermo Scientific) mithilfe des Chemocam HR 16 3200 (INTAS).

Tabelle 24: List der verwendeten Antikörper

Protein	1. Antikörper	Verdünnung	2. Antikörper	Verdünnung
Influenza NP	Anti-Influenza Abcam (ab128193)	1:2.000 in Magermilch	Anti-Maus	1:10.000 in Magermilch
Influenza M1	Anti-Influenza AbD Serotec (MCA401)	1:1.000 in Magermilch	Anti-Maus	1:10.000 in Magermilch
Influenza PA	Anti-Influenza Genetex (GTX125932)	1:10.000 in Magermilch	Anti-Kaninchen	1:10.000 in Magermilch
GAPDH	Anti-Human CalbioChem (CB1001)	1:5.000 in Magermilch	Anti-Maus	1:10.000 in Magermilch

3.5.5.4 QUANTITATIVE AUSWERTUNG VON WESTERN BLOTS

Die quantitative Auswertung der Western-Blot-Signale erfolgte mit der Software ImageJ und anhand des Protokolls *Quantifications of Western Blots with ImageJ* (Davarinejad, ohne Datum). Für die Analyse der Banden wurde das Bild invertiert und ein Rahmen definiert („*region of interest*“ – ROI), welcher den zu analysierenden Bereich festlegte. Die ROIs wurden so definiert, dass diese die gesamte Fläche der größten Bande des zu untersuchenden Proteins umfasste. So wurde beispielsweise eine ROI für das NP-Signal definiert und diese für alle zu untersuchenden Blots aus einem Versuch angewendet. Die gemessenen mittleren Grauwerte wurden anschließend in eine Excel-Tabelle überführt und dort weiterbearbeitet. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung des Hintergrundsignals, indem der mittlere Grauwert direkt über bzw. unter der zu untersuchenden Bande unter Verwendung der gleichen ROI bestimmt wurde. Die Bestimmung der mittleren Grauwerte erfolgte sowohl für die zu untersuchenden Proteinproben als auch für die Ladekontrolle (hier GAPDH). Nach der Bestimmung aller Werte, wurde die Pixelintensität für alle Datenpunkte invertiert ($255-X$, X = ermittelter mittlerer Grauwert). Im Anschluss wurde der invertierte mittlere Grauwert vom Hintergrundwert der Probe abgezogen (mittlerer Grauwert_{net}). Abschließend wurde das Verhältnis von dem mittleren Grauwert_{net Probe} zu dem mittleren Grauwert_{net Ladekontrolle} gebildet und mit den Werten der parentalen A549-Zelllinie verglichen.

3.5.6 UNTERSUCHUNG DES vRNP-IMPORTS UND -EXPORTS

3.5.6.1 vRNP-IMPORT

Für die Untersuchung des vRNP-Imports wurde das Fluoreszenzsignal der primären vRNPs nach der Infektion analysiert. Dafür musste sichergestellt werden, dass die Infektion der Zellen möglichst synchron stattfindet, um ähnliche Infektionsstadien bei den Einzelzellen zu analysieren. Des Weiteren musste ausgeschlossen werden, dass neue vRNPs innerhalb der Zelle synthetisiert werden. Aufgrund dessen erfolgten diese Infektionen bei einer MOI von 50 und unter Zuhilfenahme des Translationshemmers Cycloheximid (CHX). Ein negativer Effekt auf den vRNP-Import und die Zellvitalität durch die CHX-Zugabe konnte in Vorexperimenten für das experimentelle Zeitfenster ausgeschlossen werden. Für die Infektionsversuche wurde wie folgt vorgegangen. Nach der Zellaussaat zu $0,4 \times 10^6$ Zellen pro Well in 12-Well-Platten (15-20 h vor Experimentstart, siehe Abschnitt 3.1.3) wurde vor der Infektion das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 1 mL DMEM mit CHX (Endkonzentration CHX: 100 µg/mL) benetzt und eine Stunde bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % inkubiert. Im Anschluss wurde das Medium abgesaugt und durch 0,3 mL CHX-haltiges Infektionsmedium ersetzt. Das verringerte Volumen unterstützt die synchrone Infektion der Zellen. Für die Mock-Proben erfolgte die Zugabe von 0,3 mL CHX-haltigem Infektionsmedium ohne Virus. Um ein Austrocknen der Proben über den Versuchszeitraum zu verhindern, erfolgte nach 30 min die Zugabe von 0,7 mL CHX-haltigem DMEM. Zu folgenden Zeitpunkten wurden die Proben genommen: 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 75 min, 90 min, 105 min, 120 min, Mock 4 h. In diesem Zeitfenster fand ein kontinuierlicher Anstieg der Fluoreszenzintensität statt, sodass eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt werden konnte. Der bestimmte Anstieg kann als Näherungswert für die vRNP-Importrate (prozentuale Zunahme der Fluoreszenzintensität (FI)/min) angenommen werden.

3.5.6.2 vRNP-EXPORT

Bei der Untersuchung des vRNP-Exports wurde ebenfalls eine MOI 50 gewählt, um eine synchrone Infektion der Zellen zu gewährleisten. Im Gegensatz zu den experimentellen Bedingungen der vRNP-Importstudien erfolgte in diesem Fall keine Zugabe von CHX, um die Virusreplikation zu ermöglichen. Da somit keine Vorinkubation notwendig war, wurden die Zellen direkt vor der Infektion mit PBS gewaschen. Die Infektion erfolgte ebenfalls zunächst in einem reduzierten Volumen von 0,3 mL pro Well. Nach 30 min wurden 0,7 mL Medium ohne FKS zugesetzt.

Die Probenahmen erfolgten zu folgenden Zeitpunkten nach Infektion: 90 min, 105 min, 120 min, 135 min, 150 min, 165 min, 180 min, 195 min, 210 min, 225 min, 240 min, Mock 4 h.

3.5.7 BILDGEBENDE DURCHFLUSSZYTOMETRIE (IMAGESTREAM® MARK II)

Für die Analysen der GFP-Expression zur Kontrolle der Überexpressionszelllinien sowie der Untersuchung der vRNPs innerhalb der Zelle wurde das *ImageStream® Mark II* von Merck verwendet. Dieses vereint die klassische Durchflusszytometrie mit der Fluoreszenzmikroskopie und ermöglicht somit von jeder Einzelzelle aus einer Population hochauflösende fluoreszenzmikroskopische Bilder zu generieren.

3.5.7.1 UNTERSUCHUNG DER GFP-EXPRESSION

3.5.7.1.1 Probengewinnung für die GFP-Expressionsmessung

Zur Kontrolle der Überexpressionszelllinien wurden vor jedem Experiment Zellproben entnommen und diese auf deren GFP-Expression untersucht. Dies ermöglicht Rückschlüsse auf die GOI-Genexpression zu ziehen und hilft dabei sicherzustellen, dass die bestehende Zellpopulation immer noch die genetische Veränderung trägt (siehe Abschnitt 3.4). Dafür wurde 1 mL der Zellsuspension nach der Zellernte (siehe Abschnitt 3.1.3) entnommen und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Durch die Zugabe von 2 % Paraformaldehyd im Verhältnis 1:1 wurden die Zellen über Nacht bei 4 °C fixiert.

3.5.7.1.2 Messung der GFP-Expression

Vor der Messung der GFP-Expression wurden die Proben mit Waschpuffer (siehe Tabelle 25) gewaschen, in 40 µL Waschpuffer aufgenommen und in eine 96-Well-Platte mit V-Boden überführt. Unter Verwendung der *INSPIRE™* Software von Merck erfolgte anschließend die Messung des Fluoreszenzsignals mit dem *ImageStream® Mark II* unter Verwendung folgender Einstellungen: Laser 488 nm (200 mW), Flussgeschwindigkeit minimal, 40-fache Vergrößerung. Um eine Signalsättigung zu vermeiden, welche zu verfälschten Ergebnissen führen könnte, wurde die Laserpower mit einer Vergleichsprobe so eingestellt, dass der Wert für *raw max pixel* (entspricht den Intensitätswert des hellsten Pixels innerhalb eines Bildes) zwischen 200 und 1500 lag. Zudem wurde ein Hellfeldbild von allen Zellen aufgenommen. Jede Messung umfasste die Daten von ca. 5000 Zellen.

Tabelle 25: Zusammensetzung Waschpuffer

Komponente	Zusammensetzung
Glycin	20 g/L
BSA	1 g/L
PBS	

3.5.7.1.3 Auswertung der GFP-Expression

Für die Auswertung der Messdaten wurde das Analyseprogramm *IDEAS Application v6.0* von Merck verwendet. Zu Beginn der Analyse erfolgte zunächst die Begrenzung der gemessenen Zellpopulation auf Einzelzellen mithilfe eines Dotblots, wobei das Verhältnis der morphologischen Eigenschaften Zellfläche (*Area*) und der Zellform (wie rund oder länglich die Zelle ist) gebildet wird (*Area vs. Aspect ratio*). Diese Auswertung erfolgte anhand des Hellfeldbildes. Des weiteren erfolgte eine Begrenzung auf fokussierte Zellen. Als Kontrolle diente die parentale A549-Zelllinie, welche keine lentiviralen Konstrukte exprimierte. Anschließend wurde ein Histogramm erzeugt, welches für die Definition von GFP-positiven (1 % falsch-positiv) und GFP-negativen (99 %) Zellen genutzt wurde. Für die Auswertung der Daten wurde der mittlere Fluoreszenzwert (*mean pixel*) von Kanal 2 (GFP-Signalmaximum) verwendet. Abschließend wurden die erzielten Fluoreszenzwerte in das Verhältnis zu dem Hintergrundsignal der A549-Zellen gesetzt und miteinander verglichen.

3.5.7.2 PROBENGEWINNUNG FÜR DAPI- UND ANTIKÖRPERFÄRBUNGEN

Für die Anfärbung des Zellkerns mittels DAPI sowie die Färbung der vRNPs mithilfe von Antikörpern innerhalb der Zelle, war neben der Zellfixierung auch eine Permeabilisierung der Zellwand notwendig. Dafür erfolgte zum Zeitpunkt der Probenahme die direkte Zugabe von 4 °C kalten Paraformaldehyd (PFA) zu den Zellen in die Wells. Dieser vereinfachte Schritt war möglich, da sich alle infizierten und Mock-infizierten Zellen aufgrund des im Infektionsmedium enthaltenen Trypsins in Suspension befanden. Nach der PFA-Zugabe und einer gründlichen Durchmischung der Zellsuspension wurde die Platte für mindestens 30 min auf Eis oder in den Kühlschrank gestellt. Im Anschluss erfolgte die Überführung der Proben in ein 2 mL Reaktionsgefäß und ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 300 x g und RT. Im Anschluss wurden 1,6 mL des Überstandes verworfen und das Zellpellet durch gründliches Durchmischen im Restvolumen resuspendiert. Darauf erfolgten die Zugabe von 1,6 mL 70 % Ethanol, ein gründliches Durchmischen und die Lagerung der Proben bei -20 °C.

3.5.7.2.1 Immunologische Färbungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die vRNPs angefärbt, um Aufschluss über deren Lokalisation innerhalb der Zelle zu erlangen. Dafür wurden die Proben der vRNP-Import- und Exportstudien für 8 min bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert und anschließend 1,5 mL des Überstandes entfernt. Nach der Zugabe von 1,5 mL Waschpuffer (siehe Tabelle 25) erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (8 min, 300 x g, 4 °C), die Abnahme des Überstandes und das Resuspendieren des Zellpellets in 150 µL Waschpuffer. Danach wurden die Proben in eine 96-Well-Platte überführt, zentrifugiert (8 min, 300 x g, 4 °C) und der Überstand unter Zuhilfenahme einer Mehrkanalpipette abgenommen. Nach der Zugabe von 25 µL Blockierungspuffer (siehe Tabelle 26), einer gründlichen Durchmischung der Zellen und der anschließenden Inkubation für 30 min bei 37 °C im Brutschrank erfolgte erneut die Zugabe von 200 µL Waschpuffer, ein Zentrifugationsschritt (8 min, 300 x g, 4 °C) und die Abnahme des Überstandes. Für die Färbung der vRNPs kamen 25 µL der vorbereiteten anti-NP Antikörperlösung (siehe Tabelle 24) zum Einsatz. Der verwendete NP-Antikörper bindet bevorzugt an das in vRNPs verpackte NP und wurde freundlicherweise von Herrn Momose zur Verfügung gestellt (Momose *u. a.*, 2007). Nach dem Durchmischen der Proben mit der Antikörperlösung wurden die Platten für eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Proben zweimal mit 200 µL Waschpuffer gewaschen, der sekundäre Antikörper zu 25 µL zugegeben und die Proben für eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Proben dreimal mit jeweils 200 µL Waschpuffer gewaschen und abschließend in 30 µL 2 % DAPI-haltigem Waschpuffer (v/v) aufgenommen und durchmischt. Nach 5-minütiger Inkubation der Proben im Dunkeln und bei RT wurden die Proben vermessen.

Tabelle 26: Zusammensetzung Blockierungspuffer

Komponente	Zusammensetzung
BSA	10 g/L
Waschpuffer	

Tabelle 27: Verwendete Antikörper

Protein	1. Antikörper	Verdünnung	2. Antikörper	Verdünnung
Influenza NP	monoklonal, Maus anti-NP, mAb61A5	1:500 in Waschpuffer	polyklonal, Alexa Fluor 647- konjugiert, Ziege anti-Maus	1:500 in Waschpuffer

3.5.7.2.2 Messung der gefärbten Proben

Die Messungen erfolgte mit dem Image Stream® Mark II unter Verwendung der INSPIRE™ Software. Zur Anregung von DAPI wurde ein 375 nm Laser und eine Laserstärker von 1 mW verwendet. Für die Anregung des Alexa Fluor 647 Signales kam ein 642 nm Laser mit einer Laserstärke von 150 mW zum Einsatz. Die Messungen erfolgten unter Verwendung der minimalen Flussgeschwindigkeit und bei 60-facher Vergrößerung. Die Einstellung der Laserpower erfolgte wie unter Abschnitt 3.5.7.1.2 beschrieben. Zudem wurden ein Hellfeldbild von allen Zellen aufgenommen, ca. 1000 Zellen analysiert und eine Kompensation mithilfe von Positivproben (A549 mit A/PR/8/34 infiziert, 24 hpi) durchgeführt. Für die Kompensation wurden alle benötigten Laser angeschaltet und die Einstrahlung des Fluoreszenzsignals von einzeln-gefärbten Proben in die anderen Fluoreszenzkanäle bestimmt. Nach Abschluss dieser Messungen wurde mithilfe der INSPIRE™ Software eine Kompensationsmatrix erstellt, welche anschließend für die weiteren Auswertungen verwendet wurde.

3.5.7.2.3 Auswertung der gefärbten Proben

Für die Auswertung der Proben wurden Kanal 1 (DAPI-Signal), Kanal 5 (Alexa Fluor 647) und Kanal 4 (Hellfeld) verwendet. Die Vorgehensweise zur Eingrenzung auf Einzelzellen kann Abschnitt 3.5.7.1.3 entnommen werden. Zudem erfolgte eine Eingrenzung auf doppelt-positive Zellen mithilfe des Signals aus Kanal 1 und Kanal 5. Anhand dieser Zellpopulationen erfolgte im Anschluss unter Verwendung einer Kern- (siehe Abbildung 10) und einer Gesamtzellmaske (siehe Abbildung 11) die Analyse der räumlichen Verteilung des vRNP-Signals.

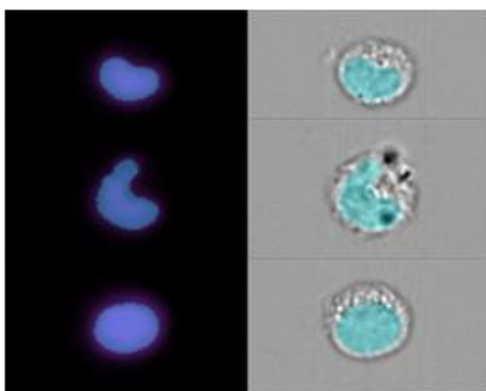


Abbildung 10: Darstellung der „Kernmaske“. Die „Kernmaske“ wurde anhand des DAPI-Signals und durch folgende Parameter über die Maskenfunktion von INSPIRE definiert: *Object (M01, Ch01, tight)*. Die Abbildung zeigt die definierte „Kernmaske“ exemplarisch anhand ausgewählter Beispielizehen.

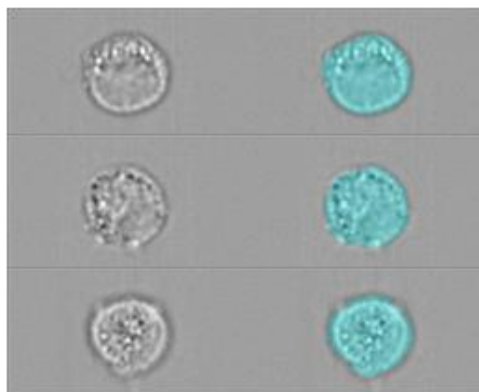


Abbildung 11: Darstellung der „Gesamtzellmaske“. Die „Gesamtzellmaske“ beruht auf dem Hellfeldbild und wurde als *Object (M04, Ch04, tight)* definiert. Die Abbildung zeigt die definierte „Gesamtzellmaske“ exemplarisch anhand ausgewählter Beispielizehen.

Nach der Definition der Masken zur Unterscheidung zwischen dem Zellkern und der Gesamtzelle erfolgte die Berechnung des Verhältnisses der Fluoreszenzintensität aus Kanal 5 von der „Kernmaske“ zur „Gesamtzellmaske“. Dieses Verhältnis wurde anschließend über die Zeit aufgetragen und im Bereich des linearen Anstiegs bzw. Abfalls eine Regressionsanalyse durchgeführt. Dabei entspricht der Anstieg oder Abfall der Trendlinie einem Näherungswert für die Import- bzw. Exportrate der vRNPs.

3.6 STATISTIK

3.6.1 SHAPIRO-WILK-TEST

Bei dem Shapiro-Wilk-Test handelt es sich um ein statistisches Testverfahren um zu überprüfen, ob die erzielten Daten einer Normalverteilung unterliegen. Die Nullhypothese nimmt an, dass eine Normalverteilung der Grundgesamtheit der erzielten Daten vorliegt. Demgegenüber steht die Alternativhypothese, welche annimmt, dass keine Normalverteilung gegeben ist (Shapiro und Wilk, 1965; Ghasemi und Zahediasl, 2012). Eine Normalverteilung von Daten ist beispielsweise eine Grundvoraussetzung für die Durchführung des t -Tests. Liegt keine Normalverteilung der Daten vor, können nicht parametrische Testverfahren, wie beispielsweise der Wilcoxon-Rang-Test bei zwei gepaarten Stichproben oder der Mann-Whitney-U-Test bei zwei unabhängigen Stichproben, verwendet werden (Keller, 2012). Die Durchführung des Shapiro-Wilk-Tests erfolgte mit dem Programm XLSTAT unter Annahme eines Signifikanzniveaus von $\alpha = 0.05$.

Formel 10: Berechnung der Teststatistik W

$$W_{\text{Probe}} = \frac{b^2}{(n-1)s_x^2}$$

W_{Probe}	W-Wert der Grundgesamtheit	[-]
b^2	Varianz der Stichprobe unter Normalverteilung	[-]
s_x^2	nicht korrigierte Stichprobenvarianz	[-]

3.6.2 MANN-WHITNEY-U-TEST

Der Mann-Whitney-U-Test, auch als Wilcoxon-Rangsummentest bezeichnet, ermöglicht die Analyse zweier unabhängiger Stichproben, deren Daten keiner Normalverteilung unterliegen. Er bildet somit das nichtparametrische Äquivalent zum t -Test für unabhängige Stichproben. Des weiteren erfordert dieses Testverfahren nur ordinalskalierte Variablen. Der Mann-Whitney-U-Test basiert auf der Bildung von Rangsummen, bei dem die Berechnung der Teststatistik auf dem Vergleich von zwei Rangreihen basiert. Liegt eine gleiche zentrale Tendenz der Daten vor, so sollten sich die Daten der zwei unabhängigen Gruppen in einer gemeinsamen Rangreihe gleichmäßig verteilen. Die Nullhypothese nimmt somit an, dass die beiden untersuchten Gruppen keine Unterschiede in ihrer Tendenz aufweisen. Demgegenüber steht die Alternativhypothese, welche annimmt, dass ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen gegeben ist (Stichprobe 1 – Stichprobe 2 \neq D). Die getesteten Gruppen müssen dabei nicht den gleichen Umfang aufweisen (Universität Zürich, 2018; Hochschule Luzern,

2019). Die Durchführung des Mann-Whitney-U-Tests erfolgte mit dem Programm XLSTAT unter Annahme eines Signifikanzniveaus von $\alpha = 0.05$. Der p-Wert (zweiseitig) wurde nach der exakten Methode ermittelt.

Formel 11: Berechnung der Prüfgröße U_1

$$U_1 = n_1 * n_2 + \frac{n_1 * (n_1 + 1)}{2} - R_1$$

Formel 12: Berechnung der Prüfgröße U_2

$$U_2 = n_1 * n_2 + \frac{n_2 * (n_2 + 1)}{2} - R_2$$

$U_{1,2}$	Prüfgröße U	[-]
$n_{1,2}$	Anzahlen der Werte pro Stichprobe	[-]
$R_{1,2}$	jeweilige Summe aller Rangzahlen pro Stichprobe	[-]

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 STATISTISCHE AUSWERTUNG DER DATEN

Um Aussagen über die statistische Signifikanz von beobachteten Unterschieden bei den erzielten Daten zu treffen, erfolgte zunächst die Überprüfung der Daten auf ihre Normalverteilung mithilfe des Shapiro-Wilk-Testverfahrens (siehe Abschnitt 3.6.1). Hierbei wurden alle Datenreihen mit einem Stichprobenumfang von ≥ 3 untersucht. Dabei wurde deutlich, dass bei einer Vielzahl der untersuchten Stichproben keine Normalverteilung der Daten vorlag. Des Weiteren entstammen die erzielten Daten aus unabhängigen Stichproben. Zur Auswahl eines geeigneten statistischen Testverfahrens wurde u. a. Tabelle 43 (siehe Anhang) verwendet. Aufgrund der vorliegenden Gegebenheiten erfolgte die Anwendung des Mann-Whitney-U-Testverfahrens zur statistischen Signifikanzprüfung der beobachteten Unterschiede (siehe Abschnitt 3.6.2). Da im Rahmen dieser Arbeit ein Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ vorausgesetzt wurde, musste ein gewisser Stichprobenumfang vorhanden sein (siehe Tabelle 41 und Tabelle 42 im Anhang). Wurde dieser nicht erreicht, konnte kein Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ erreicht werden.

4.2 EINFLUSS DES IFN-SYSTEMS AUF DIE INFLUENZAVIRUS-VERMEHRUNG IN HUMANEN ZELLINIEN

Virale Infektionen werden in humanen Zelllinien bereits frühzeitig durch das angeborene Immunsystem erkannt. Dabei spielt die Aktivierung des Typ-I-IFN-Systems und der daraus resultierenden Expression antiviraler Gene (z. B. MxA) eine essentielle Rolle, um die Ausbreitung der Viren einzudämmen (Haller, Kochs und Weber, 2006; Kreijtz, Fouchier und Rimmelzwaan, 2011; Tripathi, White und Hartshorn, 2015). Da diese Mechanismen möglicherweise einen negativen Einfluss auf die Virusausbeute bei der Influenza-Impfstoffproduktion haben könnten, sollte zunächst überprüft werden, wie stark der Einfluss der antiviralen IFN-Antwort auf den Virustiter ist. Dafür wurden zwei häufig in der Grundlagenforschung verwendete adhärente Zelllinien (A549, HEK293) sowie zwei für die Influenza-Impfstoffproduktion relevante Suspensionszelllinien (HEK293SF, AGE1.HN) untersucht.

4.2.1 IFN-VERMITTELTE STIMULATION DER ANGEBORENEN IMMUNANTWORT

Zunächst sollte die antivirale Immunantwort stimuliert werden, um zu untersuchen wie stark sie die Virusvermehrung beeinträchtigen kann. Die Stimulation der Zellen erfolgte durch die

Zugabe von humanen rekombinanten IFN- β (im weiteren Verlauf als IFN- β bezeichnet). Wie bereits im Abschnitt 2.3.2 beschrieben, führt die Bindung von Typ-I-IFN (IFN- α und IFN- β) an den IFN- α -Rezeptor zur Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges und somit zur Expression von MxA und weiteren IFN-stimulierten Genen wie z. B. PKR, IRF7 und ISG15 (Haller, Kochs und Weber, 2006; Ehrhardt *u. a.*, 2010; Haller und Kochs, 2011). Für diese Arbeit wurde die MxA-Genexpression als Marker für die Aktivierung der IFN-stimulierten Gene angenommen und mittels *real-time* PCR (siehe Abschnitt 3.5.3) bestimmt. Dafür wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen pro Well in 12-Well-Platten in 0,5 mL Medium ausgesät (siehe Abschnitt 3.1.1; 3.1.3; 3.1.4) und anschließend mit 100 bzw. 1000 U/mL IFN- β für 2, 4 bzw. 6 h stimuliert. Als Berechnungsbasis dienten unstimulierte Proben der jeweiligen Zelllinien. Die Ergebnisse dieses Experimentes sind in Abbildung 12 dargestellt.

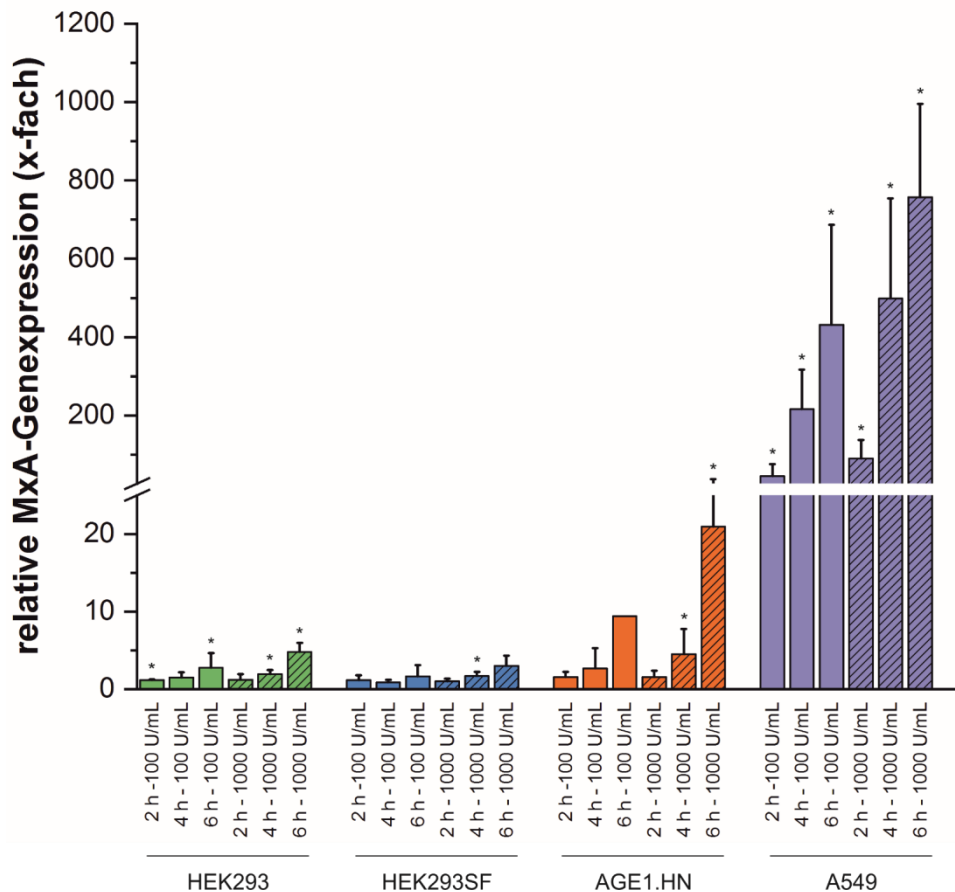


Abbildung 12: Aktivierung der antiviralen IFN-Antwort nach IFN- β -Stimulation. HEK293-, HEK293SF-, AGE1.HN- und A549-Zellen wurden mit 100 (ungemusterte Balken) bzw. 1000 U/mL (schraffierte Balken) IFN- β für 2, 4 bzw. 6 h stimuliert und anschließend die MxA-Genexpression mittels *real-time* PCR bestimmt. Die Berechnung der relativen Genexpression erfolgte auf Basis unstimulierter Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei biologischen Replikaten sowie die dazugehörigen Standardabweichungen (Fehlerbalken). Die statistische Auswertung der Beobachtungen erfolgte zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests (*, $p \leq 0,05$; kein Stern $p > 0,05$).

Die antivirale Genexpression in HEK293-, HEK293SF- und AGE1.HN-Zellen konnte, im Vergleich zu A549-Zellen, nur geringfügig durch eine zweistündige Stimulation mit 100 U/mL IFN- β gesteigert werden. Auch eine Verlängerung der Stimulationsdauer (4 h, 6 h) sowie eine Steigerung der IFN- β -Konzentration (1000 U/mL) veränderte diese MxA-Genexpressionswerte kaum. Im Gegensatz dazu zeigten die A549-Zellen eine deutliche Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der antiviralen Genexpression. Um auszuschließen, dass es sich hierbei um einen MxA-spezifischen Effekt handelt, wurde zusätzlich die ISG15- und IRF7-Genexpression für ausgewählte A549- und HEK293-Zellproben bestimmt (siehe Abbildung 13).

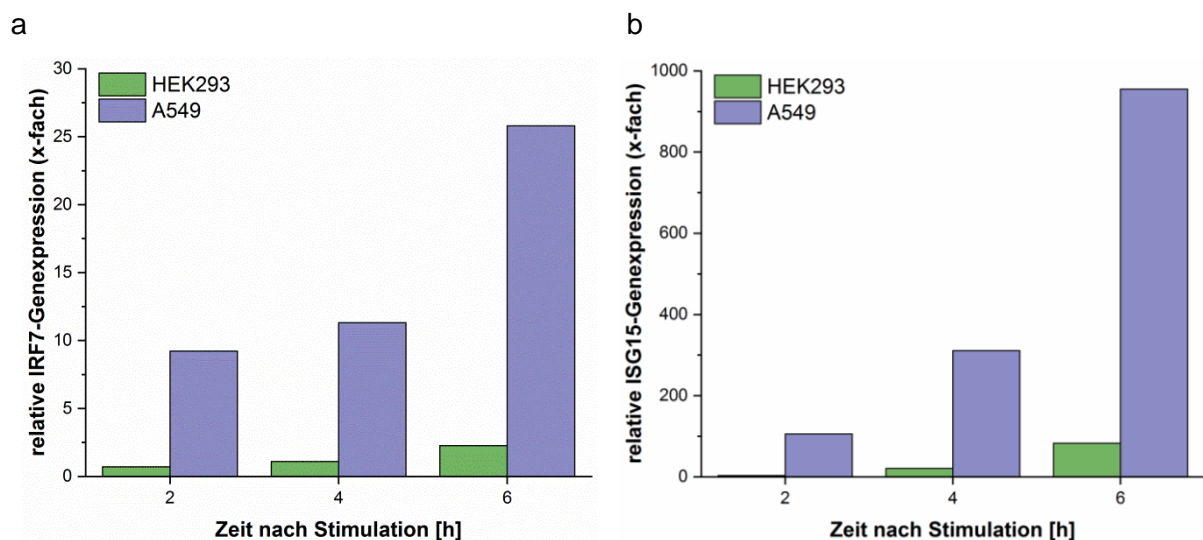


Abbildung 13: Aktivierung der IRF7- und ISG15-Genexpression nach IFN- β -Stimulation. HEK293- und A549-Zellen wurden mit 1000 U/mL IFN- β für 2, 4 bzw. 6 h stimuliert und anschließend die (a) IRF7- und (b) ISG15-Genexpression mittels *real-time* PCR bestimmt. Die Berechnung der relativen Genexpression erfolgte auf Basis unstimulierter Zellen. Dargestellt ist das Ergebnis von einem Einzelexperiment.

Wie bei der Bestimmung der MxA-Genexpression, konnte für die HEK293-Zellen nur eine geringfügige Steigerung der IRF7- und ISG15-Genexpression durch die Stimulation mit IFN- β erzielt werden. Die A549-Zelllinie zeigte hingegen erwartungsgemäß eine starke Aktivierung der antiviralen Genexpression als Folge der Stimulation. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse eine deutliche Störung der antiviralen Genexpression in HEK293-Zellen und AGE1.HN-Zellen, welche vorteilhaft für die Virusproduktion in diesen Zellsystemen sein könnte.

4.2.2 INFLUENZAVIRUS-REPLIKATION IN DEN VERWENDETEN HUMANEN ZELLINIEN

Basierend auf den beobachteten Unterschieden bei der MxA-, IRF7- und ISG15-Genexpression nach der Stimulation von HEK293-, HEK293SF- und AGE1.HN-Zellen mit IFN- β im Vergleich zu A549-Zellen, sollte im nächsten Schritt überprüft werden, wie sich dieser

Phänotyp auf die Virusvermehrung auswirkt. Hierfür wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen pro Well in 12-Well-Platten in 0,5 mL des entsprechenden Mediums ausgesät, für 6 h mit 1000 U/mL IFN- β stimuliert bzw. nicht stimuliert und anschließend durch die Zugabe von 1 mL Infektionsmedium (MOI 0,01) mit Influenzavirus A/PR/8/34 infiziert. Die zellspezifischen Medien und Trypsinkonzentrationen können dem Abschnitt 3.1.1 und der Tabelle 9 entnommen werden. Als erstes erfolgte die Bestimmung der MxA-Genexpression nach 72 hpi mittels *real-time* PCR um Aufschluss darüber zu erlangen, wie sich die Virusinfektion auf die Aktivierung der antiviralen Immunantwort in den getesteten Zelllinien auswirkt (siehe Abbildung 14).

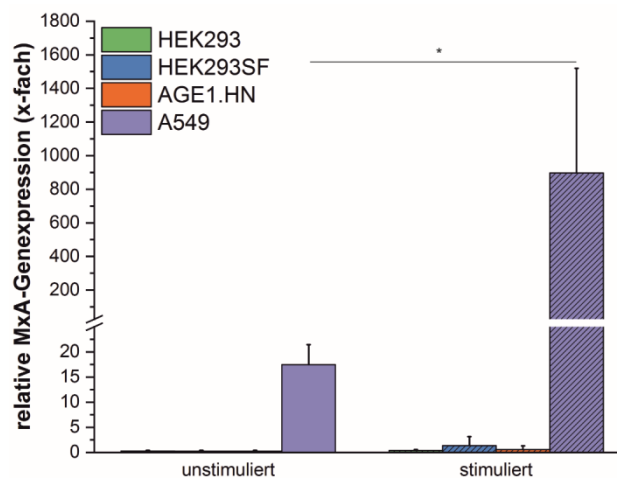


Abbildung 14: Aktivierung der antiviralen Genexpression durch die Infektion mit Influenzavirus A/PR/8/34. HEK293-, HEK293SF-, AGE1.HN- und A549-Zellen wurden mit 1000 U/mL IFN- β für 6 h stimuliert (schraffierte Balken) bzw. unstimuliert belassen (ungemusterte Balken) und anschließend mit Influenzavirus A/PR/8/34 und einer MOI von 0,01 infiziert. Zu 72 hpi erfolgte die Bestimmung der MxA-Genexpression mittels *real-time* PCR. Die Berechnung der relativen Genexpression erfolgte auf Basis nicht-infizierter, unstimulierter Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei biologischen Replikaten sowie die dazugehörigen Standardabweichungen (Fehlerbalken). Die statistische Auswertung der Beobachtungen erfolgte zwischen stimulierten, infizierten und unstimulierten, infizierten Zellen mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests (*, $p \leq 0,05$; kein Stern $p > 0,05$)

Im Kontext einer Virusinfektion ohne vorherige IFN- β -Stimulation (ungemusterte Balken) waren die Zelllinien HEK293, HEK293SF und AGE1.HN nicht in der Lage ihre antivirale Genexpression bis zum Zeitpunkt 72 hpi zu aktivieren. A549-Zellen hingegen zeigten eine deutlich gesteigerte MxA-Genexpression. Eine zusätzliche IFN- β -Stimulation der Zellen vor der Infektion (schraffierte Balken) zeigte bei HEK293-, HEK293SF- und AGE1.HN-Zellen nur geringfügige Effekte. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse für die A549-Zellen, bei denen die MxA-Genexpression noch einmal deutlich signifikant werden konnte. Diese weitere Steigerung der MxA-Genexpression in stimulierten A549-Zellen im Vergleich zu dem unstimulierten Zustand wurde durch den sekundären Rückkopplungs-Mechanismus bei der Aktivierung des IFN-Signalweges durch die vorhergegangene IFN-Stimulation bewirkt (siehe Abschnitt 2.3.1).

Anschließend erfolgte die Bestimmung der Gesamtvirustiter (Durchführung siehe Abschnitt 3.5.1) nach 24, 48 und 72 hpi mittels des HA-Assays. Erneut wurden dabei stimulierte und unstimulierte Zellen miteinander verglichen (siehe Abbildung 15).

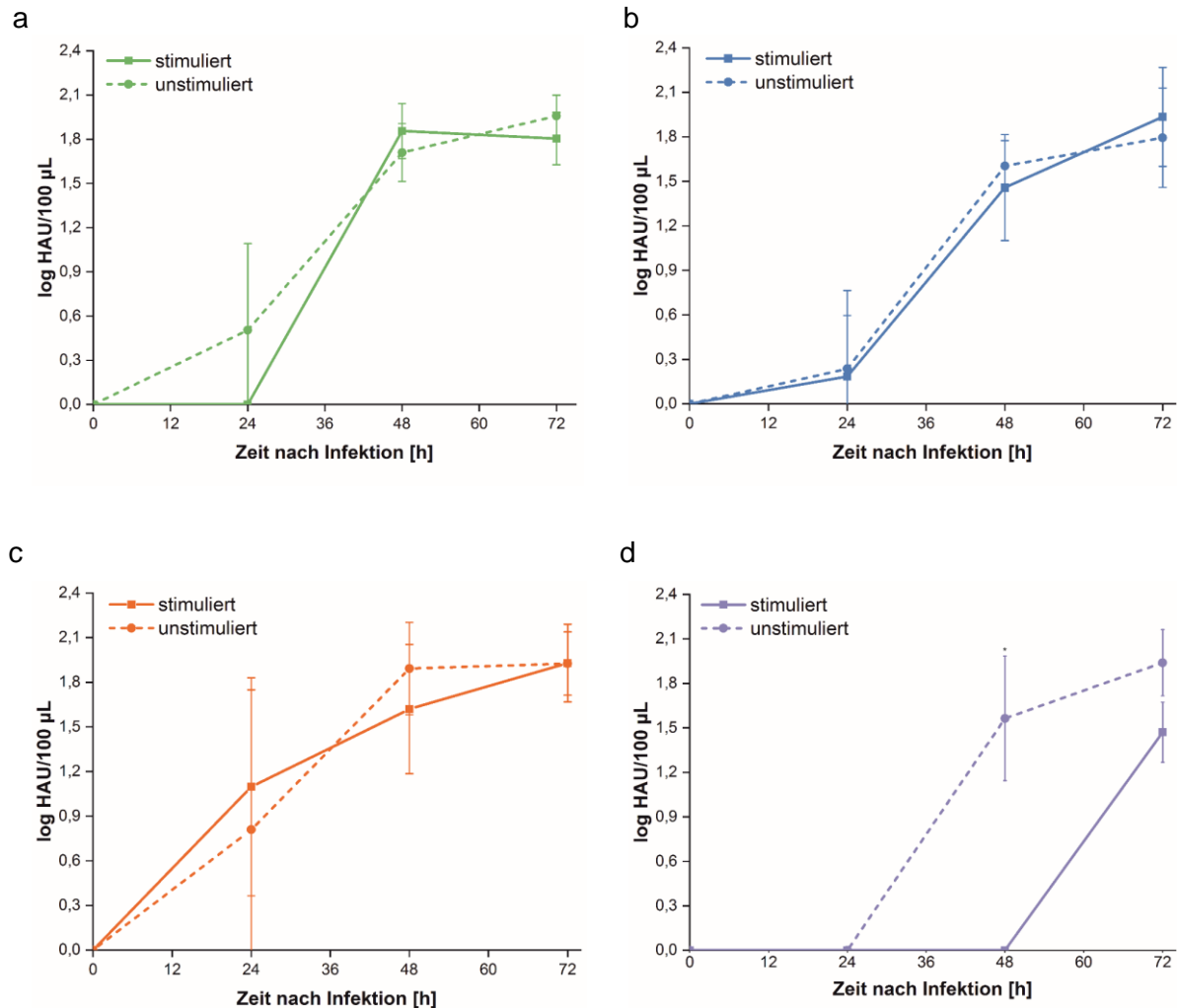


Abbildung 15: Replikation von Influenzavirus A/PR/8/34 in den verwendeten Zelllinien. (a) HEK293-, (b) HEK293SF-, (c) AGE1.HN- und (d) A549-Zellen wurden mit 1000 U/mL IFN- β für 6 h stimuliert (durchgängige Linie) bzw. unstimuliert (gestrichelte Linie) belassen und anschließend mit Influenzavirus A/PR/8/34 und einer MOI von 0,01 infiziert. Die Bestimmung der Gesamtvirustiter erfolgte mittels des HA-Assays zu 24, 48 und 72 hpi. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei biologischen Replikaten sowie die dazugehörigen Standardabweichungen (Fehlerbalken). Die statistische Auswertung der Beobachtungen erfolgte zwischen stimulierten, infizierten und unstimulierten, infizierten Zellen mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests (*, $p \leq 0,05$; kein Stern $p > 0,05$).

Für die Zelllinien HEK293, HEK293SF und AGE.HN konnte bereits nach 24 hpi die Freisetzung von Viren mittels des HA-Assays bestimmt werden (siehe Abbildung 15a-c), wohingegen dies bei A549-Zellen erst nach 48 h der Fall war (siehe Abbildung 15d). Erfolgte vor der Infektion eine Stimulation der antiviralen Immunantwort mit IFN- β (durchgängige Linie) führte diese bei den HEK293-Zellen (siehe Abbildung 15a) zu einer leichten und bei den A549-Zellen (siehe Abbildung 15d) zu einer starken Verzögerung der Gesamtvirusproduktion. Eine

vollständige Blockade der Virusproduktion konnte bei keiner der verwendeten Zelllinien beobachtet werden. Ähnliche Ergebnisse erzielte bereits eine Studie von Seitz und Kollegen mit MDCK-Zellen (Seitz *u. a.*, 2010). In dieser Studie erfolgte die Stimulation der Mx1-Genexpression durch die Zugabe von konditioniertem Medium (virusfreier Überstand von infizierten Zellen) und die anschließende Untersuchung der Mx1-Genexpression sowie deren Auswirkung auf die Virusreplikation. Die Ergebnisse zeigten, dass durch eine zusätzliche Aktivierung der antiviralen Genexpression die Gesamtvirustiter nur zeitweilig gesenkt werden konnten. Des Weiteren zeigte diese Studie, dass das Influenzavirus A/PR/8/34 vom RKI nur zu einer schwachen Induktion der Mx1-Genexpression führt (Seitz *u. a.*, 2010). Dies erklärt, warum durch die IFN- β -Stimulation vor der Virusinfektion die MxA-Genexpression in A549-Zellen stärker aktiviert wurde als durch die bloße Infektion (siehe Abbildung 14).

Die beobachteten Unterschiede bei der Aktivierung der antiviralen Genexpression und der Virusproduktion bei HEK293-, HEK293SF-, AGE1.HN- im Vergleich zu den A549-Zellen sind vermutlich auf das Verfahren zur Zellimmortalisierung zurückzuführen. Bei A549-Zellen handelt es sich um eine Krebszelllinie, welche aufgrund natürlicher Mutationen einen immortalisierten Zustand erlangte (Giard *u. a.*, 1973; Lieber *u. a.*, 1976). Im Gegensatz dazu erfolgte die Immortalisierung der anderen drei Zelllinien durch das Einbringen adenoviraler Gensequenzen, welche *u. a.* für die adenoviralen Gene E1A und E1B kodieren (Cote *u. a.*, 1998; Niklas *u. a.*, 2011). E1A und E1B wirken dabei synergetisch und führen zu einer effizienten Immortalisierung von primären Zellen (Endter und Dobner, 2004). Aufgrund dessen werden diese Zelllinien im Folgenden als „adenoviral transformierte“ (Ad_t) Zelllinien und A549-Zellen als „nicht-adenoviral transformierte“ (nicht-Ad_t) Zelllinie bezeichnet. Zusätzlich zu ihren transformierenden Eigenschaften besitzen E1A und E1B das Potential, sich auf die Aktivierung der antiviralen Immunantwort auszuwirken (Anderson und Fennie, 1987; Reich *u. a.*, 1988; Ackrill *u. a.*, 1991; Gutch und Reich, 1991). Um zu überprüfen, ob die Expression von E1A und E1B der Grund für die beobachteten Unterschiede bei der antiviralen MxA-Genexpression und der erzielten Gesamtvirustiter nach IFN- β -Stimulation ist, erfolgten Genexpressionsuntersuchungen und siRNA-vermittelte Knockdownstudien.

4.2.3 UNTERSUCHUNG DER E1A- UND E1B-GENEXPRESSION

Zunächst erfolgte die Bestimmung der E1A- und E1B-Genexpression in HEK293-, AGE1.HN- und A549-Zellen mittels *real-time* PCR (siehe Tabelle 28). Aufgrund der gleichen zellulären Abstammung wurde die HEK293SF-Zelllinie nicht untersucht. Die Analyse erfolgte unter Verwendung gleicher zellulärer RNA-Mengen (500 ng).

Tabelle 28: Bestimmung der E1A- und E1B-Genexpression in Ad- und nicht-Ad-Zelllinien (Einzelexperiment).

Zelllinie	CT-Wert für E1A	CT-Wert für E1B
HEK293	13,2	11,4
AGE1.HN	13,0	11,0
A549	29,8	30,7

Da A549-Zellen weder E1A noch E1B in ihrem Genom tragen, kann keine Berechnung der Genexpressionsverhältnisse, sondern nur ein Vergleich der ermittelten CT-Werte, erfolgen. Trotz der nicht vorhandenen E1A- und E1B-Genexpression in A549-Zellen konnten für beide Gene CT-Werte von ~30 ermittelt werden. Um diese Werte eindeutig als falsch-positive Ergebnisse zu definieren, wurden Negativkontrollen (NRT und NTC, Definition siehe 0) mitgeführt, bei denen ebenfalls CT-Werte von ≥ 30 erzielt wurden. Zudem erfolgte die Analyse der Schmelzkurve, wobei bei den Negativkontrollen sowie bei den A549-Zellen keine produktspezifischen Peaks detektiert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Gründe für die Entstehung falsch-positiver CT-Werte liegen u. a. in Verunreinigungen mit Staubpartikeln und der Detektion von Primerdimeren. Im Fall der Genexpressionsbestimmung von E1A und E1B in HEK293- und AGE1.HN-Zellen konnten hingegen deutlich niedrigere CT-Werte (E1A ~13 und E1B ~11) bestimmt und eindeutige Peaks bei der Schmelzkurve (Daten nicht gezeigt) beobachtet werden. Diese Ergebnisse bestätigen die Expression der adenoviralen Gene in HEK293- und AGE1.HN-Zellen und weisen auf ähnliche Expressionsniveaus in beiden Zelllinien hin.

4.2.4 siRNA-VERMITTELTEN KNOCKDOWN VON E1A UND E1B

Nach der Bestätigung der E1A- und E1B-Genexpression in HEK293- und AGE1.HN-Zellen sollte weiterhin geklärt werden, inwieweit die antivirale Genexpression durch diese Proteine beeinflusst wird. Hierfür erfolgten spezifische, siRNA-vermittelte Knockdownversuche von E1A und/oder E1B. Kann durch diese Knockdownstudien die antivirale Genexpression wiederhergestellt werden, lässt dies den Rückschluss zu, dass die adenovirale Transformation der Zellen der Grund für den beobachteten Phänotyp ist. Die Knockdownstudien erfolgten mit drei verschiedenen siRNAs gegen E1A und sechs verschiedenen siRNAs gegen E1B. Als Kontrolle wurden zwei Kontroll-siRNAs getestet. In Vorversuchen wurden zunächst die Transfektionsparameter optimiert und eine Auswahl geeigneter siRNAs in Hinblick auf die Knockdowneffizienz, Zytotoxizität und die *off-target* Effekte getroffen (Daten nicht gezeigt). Es erfolgten sowohl Einzelknockdownversuche (E1A oder E1B) als auch Doppelknockdownversuche (E1A und E1B) in HEK293-Zellen. Für die Einzelknockdownversuche wurden Knockdowneffizienzen von $\geq 70\%$ und für die

Doppelknockdownversuche Effizienzen von ~60 % 24 h nach der Transfektion erzielt. Ein Grund für die verringerte Knockdowneffizienz beim Doppelknockdown könnte in der Halbierung der eingesetzten siRNA-Menge pro Gen liegen. Diese war jedoch notwendig, um konstante Transfektionsbedingungen, welche u. a. von dem Nukleinsäure-zu-Transfektionsreagenz-Verhältnis abhängen, beizubehalten. Des weiteren zeigte der Doppelknockdown von E1A und E1B bei HEK293-Zellen starke zytotoxische Effekte. Aufgrund dessen wurde dieser Ansatz nicht weiterverfolgt. Möglicherweise kam es aufgrund leichter Unterschiede bei den Knockdowneffizienzen von E1A und E1B zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes dieser zwei synergetischen Proteine, wodurch eventuell verstärkt Apoptose induziert wurde. Nach der erfolgreichen Etablierung des Knockdownsystems in HEK293-Zellen erfolgten zusätzliche Untersuchungen mit AGE1.HN-Zellen. Dafür wurden HEK293- und AGE1.HN-Zellen mit E1A- oder E1B-siRNA transfiziert, nach 48 h mit 500 U/mL IFN- β für 6 h stimuliert und anschließend hinsichtlich ihrer MxA-Genexpression mittels *real-time* PCR analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 16 dargestellt.

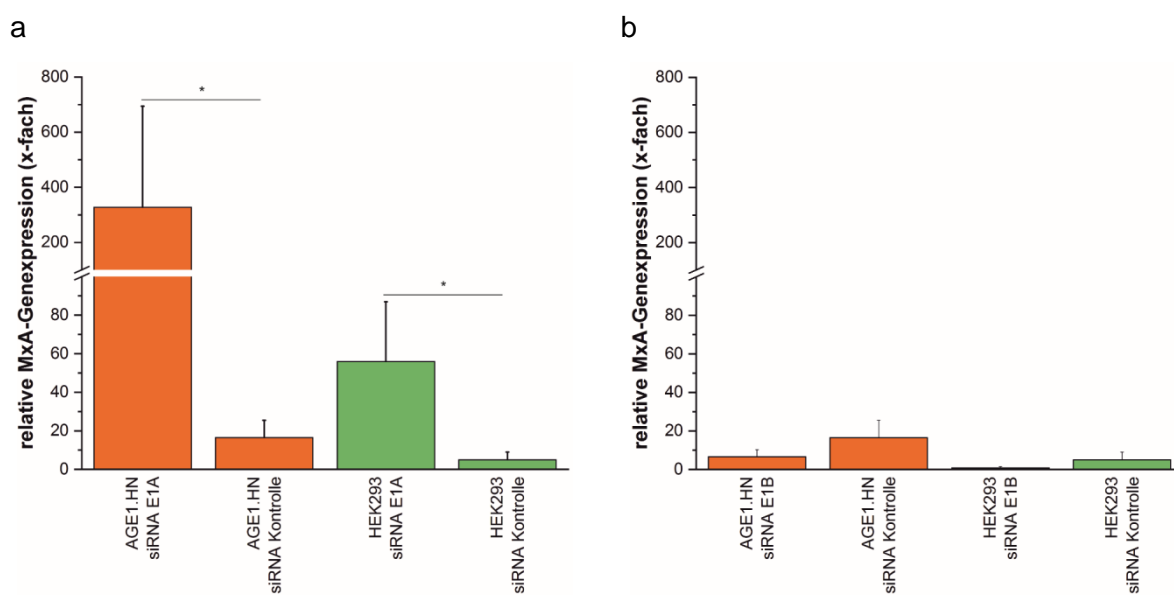


Abbildung 16: MxA-Genexpression in E1A- und E1B-Knockdownzelllinien nach IFN-Stimulation. (grün) HEK293- und (orange) AGE1.HN-Zellen wurden mit siRNAs gegen (a) E1A, (b) E1B bzw. mit einer Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit 500 U/mL IFN- β für 6 h stimuliert und anschließend die MxA-Genexpression mittels *real-time* PCR bestimmt. Die Berechnung der relativen Genexpression erfolgte auf Basis Kontroll-siRNA transfizierter, unstimulierter Zellen. Als Referenzgen wurde 18S RNA verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei biologischen Replikaten sowie die dazugehörigen Standardabweichungen (Fehlerbalken). Die statistische Auswertung der Beobachtungen erfolgte zwischen den E1A- bzw. E1B-siRNA und Kontroll-siRNA transfizierten Zellen mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests (*, $p \leq 0,05$; kein Stern $p > 0,05$),

Die Ergebnisse des E1A-Knockdowns in AGE1.HN- und HEK293-Zellen zeigen, dass durch die Herunterregulation der E1A-Expression die antivirale Genexpression teilweise wiederhergestellt werden kann. Wird hingegen die E1B-Genexpression herunter reguliert, bleibt die MxA-Genexpression nach IFN- β -Stimulation weitestgehend unverändert. Es kann

sogar ein eher gegenläufiger Effekt vermutet werden, welcher jedoch nicht signifikant ist. Die Ergebnisse deuten zudem darauf hin, dass AGE1.HN-Zellen generell eine etwas stärkere MxA-Genexpression erlauben als HEK293-Zellen und stehen somit im Einklang mit den Beobachtungen aus Abbildung 12 und Abbildung 14. Eine unterschiedliche Knockdowneffizienz (siehe Seite 72) sowie Unterschiede in der Genexpression (siehe Tabelle 28) können jedoch ausgeschlossen werden. Gleiches gilt für die Ergebnisse der E1B-Knockdownversuche. Generell ist jedoch bei diesen Ergebnissen zu beachten, dass zum einen die Bestimmung der E1A- und E1B-Genexpression (siehe Tabelle 28) auf einem Einzelexperiment basiert und die erzielten E1A- und E1B-Genexpressionsdaten keinen Aufschluss über die Proteinexpression und deren Funktionalität liefern. Des Weiteren wurde die AGE1.HN-Zelllinie durch das gezielte Einbringen der adenoviralen Gene E1A, E1B und pIX generiert (Niklas *u. a.*, 2011), wohingegen HEK293-Zellen durch die unspezifische Zugabe von Ad5-Genomfragmenten erfolgte (Graham *u. a.*, 1977). Daraus resultierende Unterschiede bei der antiviralen Genexpression können daher nicht ausgeschlossen werden.

4.2.5 INFEKTION VON E1A KNOCKDOWNZELLEN MIT INFLUENZA DELNS1 VIRUS

Nachdem die ersten Experimente erfolgreich E1A als starken Inhibitor der antiviralen IFN-Antwort identifizieren konnten, sollten abschließende Untersuchungen klären, ob diese Zellen zum einen die Replikation von IFN-sensitiven Viren erlauben und zum anderen ob ein Knockdown von E1A den Virustiter beeinflussen kann. Dafür erfolgte zunächst die Transfektion der adhärenenten HEK293-Zelllinie mit E1A-siRNA bzw. Kontroll-siRNA für 24 h und anschließend die Infektion mit Influenzavirus delNS1. Hierbei handelt es sich um einen Mutationsstamm, der eine Deletion in dem viralen IFN-Antagonisten NS1 aufweist. Diese Deletion macht Influenzavirus delNS1 zu einem starken IFN-Induzierer und schränkt somit seine Replikation in IFN-kompetenten Zellen erheblich ein. Dies macht Influenzavirus delNS1 zu einem interessanten Kandidaten für die Herstellung eines lebend-attenuierten Influenza-Impfstoffes (Garcia-Sastre *u. a.*, 1998; Kochs *u. a.*, 2009; Seitz *u. a.*, 2010). Die Infektion von HEK293-Zellen erfolgte mit einer MOI von 0,01. Zu 0, 48 und 72 hpi erfolgte die Bestimmung der MxA-Genexpression (siehe Abbildung 17a) sowie die Bestimmung des infektiösen Virustiters zu 48 und 72 hpi (siehe Abbildung 17b).

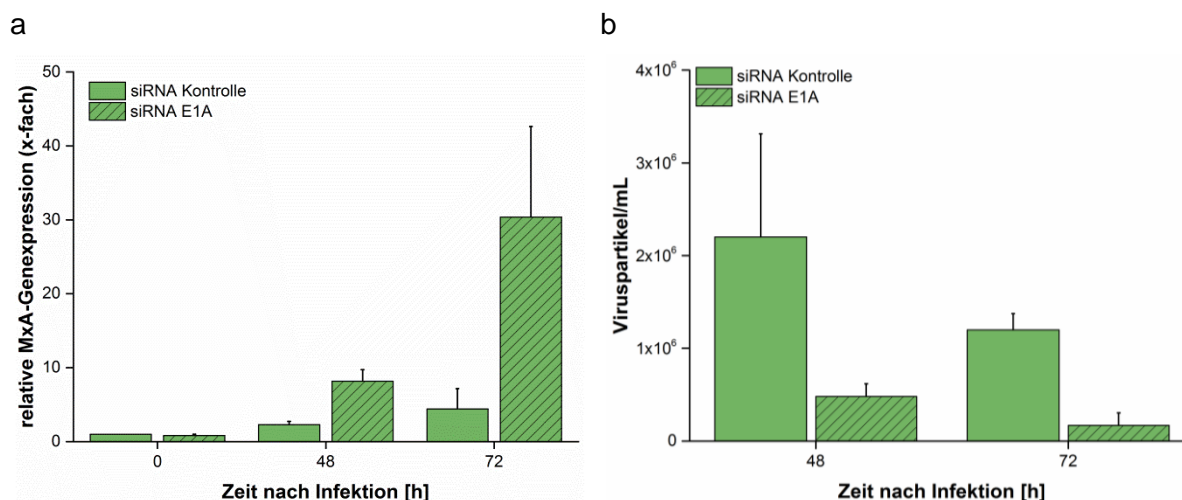


Abbildung 17: Infektion von E1A-Knockdownzellen mit Influenzavirus delNS1. HEK293-Zellen wurden mit siRNAs gegen E1A (schraffierte Balken) bzw. Kontroll-siRNA (ungemusterte Balken) für 24 h transfiziert und anschließend mit Influenzavirus delNS1 und einer MOI von 0,01 infiziert. Die Probenahme erfolgte zu 0, 48 und 72 hpi. (a) Die Bestimmung der MxA-Genexpression erfolgte mittels *real-time* PCR basierend auf Kontroll-siRNA transfizierten, nicht-infizierten Zellen. (b) Der infektiöse Virustiter wurde mithilfe des TCID₅₀-Assays bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei biologischen Replikaten sowie die dazugehörigen Standardabweichungen (Fehlerbalken). Die statistische Auswertung der Beobachtungen erfolgte zwischen E1A-siRNA und Kontroll-siRNA transfizierten, infizierten Zellen mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests (*, $p \leq 0,05$; kein Stern $p > 0,05$).

Die Ergebnisse aus Abbildung 17a zeigen, dass durch den Knockdown von E1A (schraffierte Balken) die Infektion mit Influenzavirus delNS1 zu einer deutlichen Steigerung der MxA-Genexpression führt. Im Gegensatz dazu wird die antivirale Genexpression in den Kontrollzellen (ungemusterte Balken) trotz der stark IFN-induzierenden Wirkung von Influenzavirus delNS1 nur geringfügig aktiviert. Betrachtet man zudem die erzielten infektiösen Virustiter (siehe Abbildung 17b), wird die Auswirkung der aktivierten antiviralen Immunantwort auf die Virusreplikation deutlich. Aufgrund der gesteigerten MxA-Genexpression durch den Knockdown von E1A (schraffierte Balken), kommt es zu einer deutlichen Reduktion der infektiösen Virustiter im Vergleich zu den Kontroll-siRNA transfizierten Zellen (ungemusterte Balken), bei denen die antivirale Genexpression weiterhin geblockt wird. Ähnliche Resultate wurden von van Wielink und Kollegen gezeigt, bei der durch die Expression von NS1 die Aktivierung der antiviralen Immunantwort soweit unterdrückt wird, dass Influenzavirus delNS1 zu hohen Titern in MDCK-Zellen replizieren kann (van Wielink *u. a.*, 2011). Aufgrund dieser Datenlage sollte abschließend geklärt werden, ob Ad_T-Zellen auch die Vermehrung von weiteren IFN-sensitiven Viren erlauben.

4.2.6 REPLIKATION IFN-SENSITIVER VIREN IN AD_T- UND NICHT-AD_T-ZELLINIEN

Wie bereits in den vorherigen Abschnitten 3.1.4 und 3.1.5 erfolgreich gezeigt werden konnte, sind Ad_T-Zelllinien nicht bzw. kaum in der Lage ihre antivirale Genexpression zu aktivieren. Dieser Abschnitt befasst sich daher weiterführend mit der Fragestellung, ob sich im

Allgemeinen Ad_t-Zelllinien für die Produktion von IFN-sensitiven Viren eignen. Dafür wurde das IFN-sensitive VSV (Basu *u. a.*, 2006) sowie das Influenzavirus delNS1 (Garcia-Sastre *u. a.*, 1998) verwendet. Für die VSV-Experimente wurden 0,5x10⁶ Zellen pro Well in 12-Well-Platten ausgesät, für 24 h mit 1000 U/mL IFN-β stimuliert bzw. ohne Zugabe von IFN-β kultiviert, und anschließend mit einem *enhanced* GFP-exprimierenden VSV-Stamm (VSV-eGFP) und einer MOI von 0,01 infiziert. Durch die eGFP-Markierung von VSV konnte dessen Ausbreitung 17 h nach Infektion mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden. Die Durchführung dieser Experimente sowie deren Analysen erfolgten durch Herrn Dr. Lipps am HZI in Braunschweig (siehe Abbildung 18a). Zudem erfolgten Infektionsversuche mit Influenzavirus delNS1 (MOI 0,01, Infektionsparameter siehe Abschnitt 3.2.4.2) und die anschließende Analyse des Gesamtvirustiters zu 72 hpi mit dem HA-Assay (siehe Abbildung 18b).

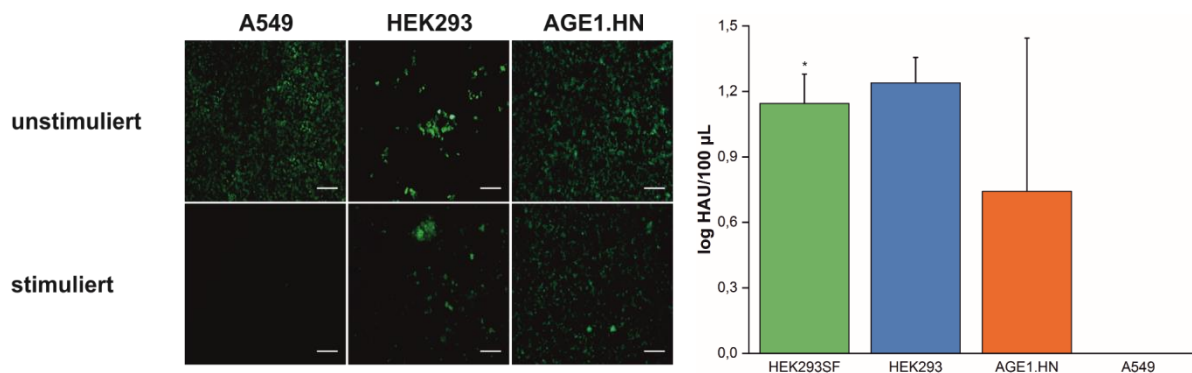


Abbildung 18: Vermehrung von IFN-sensitiven Viren in Ad_t- und nicht-Ad_t Zelllinien. (a) Ad_t (HEK293, AGE1.HN)- und nicht-Ad_t (A549)-Zellen wurden für 24 h mit 1000 U/mL IFN-β stimuliert bzw. ohne die Zugabe von IFN-β kultiviert und anschließend mit VSV-eGFP und einer MOI von 0.01 infiziert. Die Analyse der Zellen erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie 17 h nach Infektion. Skalierungsbalken = 200 µm. (b) Ad_t (HEK293, AGE1.HN)- und nicht-Ad_t (A549)-Zellen wurden mit Influenzavirus delNS1 und einer MOI von 0.01 für 72 h infiziert und anschließend der Gesamtvirustiter mittels HA-Assay bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei biologischen Replikaten sowie die dazugehörigen Standardabweichungen (Fehlerbalken). Die statistische Auswertung der Beobachtungen erfolgte zwischen Ad_t (HEK293, AGE1.HN)- und nicht-Ad_t (A549)-Zellen mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests (*, $p \leq 0,05$; kein Stern $p > 0,05$).

Die Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen aus Abbildung 18a zeigen, dass VSV unter unbehandelten Bedingungen sowohl in Ad_t- als auch nicht-Ad_t-Zelllinien replizieren kann. Wird jedoch die antivirale IFN-Antwort vor der Virusinfektion durch die Zugabe von IFN-β angeregt, führt dies zu einer starken Inhibierung der Virusausbreitung in A549-Zellen. Im Gegensatz dazu steht die nur leicht verminderte Virusausbreitung in den untersuchten Ad_t-Zelllinien HEK293 und AGE1.HN. Diese Beobachtungen werden durch Messungen des GFP-Fluoreszenzsignals unterstützt, welche eine ähnliche Tendenz zeigten (Daten nicht gezeigt). Die leichte Unterdrückung der VSV-Replikation in den untersuchten Ad_t-Zelllinien weist darauf hin, dass die Stimulation mit IFN-β trotz der gestörten antiviralen IFN-Antwort einen Einfluss

auf die Virusreplikation besitzt. Auf das Vorhandensein alternativer antiviraler Signalwege, welche die Virusreplikation inhibieren können, wurde bereits in einigen Studien hingewiesen. Studien mit PKR, Mx und RNaseL dreifach-Knockoutzellen zeigten beispielsweise, dass eine Stimulation mit IFN- α die VSV-Replikation auch in Abwesenheit dieser drei IFN-induzierten Proteine unterdrücken kann (Zhou *u. a.*, 1999). Des Weiteren konnten Basu und Kollegen demonstrieren, dass IFN- α -induzierte lösliche Faktoren mit antiviraler Funktion in der Lage sind, VSV-Infektionen beim Viruseintritt, unabhängig von dem klassischen STAT1-vermittelten JAK/STAT-Signalweg, zu verhindern. Ebenfalls bestätigen die Untersuchungen dieser Studie das Ergebnis für die A549-Zellen aus Abbildung 18a, dass VSV trotz seiner IFN-Sensitivität in der Lage ist in A549-Zellen zu replizieren (Basu *u. a.*, 2006). Ergänzt wurden die VSV-Studien durch Infektionsexperimente von Ad₅- und nicht-Ad₅-Zelllinien mit Influenzavirus delNS1 (siehe Abbildung 18b). Hierbei konnte für alle untersuchten Ad₅-Zelllinien ein Gesamtvirustiter bestimmt werden, jedoch nicht für A549-Zellen. Um sicherzustellen, dass diesem Ergebnis nicht das Detektionslimit des HA-Assay zugrunde liegt, erfolgte in einem Nebenexperiment die Infektion von A549-Zellen mit Influenzavirus delNS1 und die anschließende Bestimmung des vRNA-Levels von Segment 5 zu 5 hpi und 10 hpi (Daten nicht gezeigt). Für beide Zeitpunkte konnte jedoch kein signifikanter Anstieg zum Ausgangslevel festgestellt werden.

Die in dieser Arbeit erzielten Daten zeigen, dass das Replikationsvermögen von IFN-sensitiven Viren sehr stark von der antiviralen Immunantwort der Wirtszelle abhängig ist. Neben dem Einsatz als lebend-attenuierte Impfstoffe besitzen IFN-sensitive Viren auch eine wichtige Bedeutung in der Grundlagenforschung, der Isolation neu entstehender Virusstämme sowie der Virusdiagnostik (Young *u. a.*, 2003; Stewart, Randall und Adamson, 2014; McSharry *u. a.*, 2015). Daher befassten sich bereits mehrere Studien mit der Herstellung von Zellsystemen, welche eine gestörte antivirale IFN-Antwort aufweisen. In einer Arbeit von McSharry und Kollegen wurden beispielsweise IFN-insensitive humane Fibroblasten-Zelllinien durch das Einbringen der viralen Antagonisten nPro vom *Bovine Virusdiarrhoe*-Virus oder das V-Protein vom Parainfluenzavirus Typ 5 generiert. Mithilfe dieser Zellsysteme gelang es anschließend, die Replikation des IFN-sensitiven humanen Cytomegalievirus zu untersuchen, welches vor allem bei immunsupprimierten Menschen zu schwerwiegenden Erkrankungen und Todesfällen führen kann (McSharry *u. a.*, 2015). Ein ähnliches Konzept wurde in einer Studie von Young und Kollegen verfolgt (Young *u. a.*, 2003). Des Weiteren entwickelten van Wieland und Kollegen eine MDCK-Zelllinie, welche das Allel B des Influenzavirus NS1-Proteins induzierbar exprimiert. Bei dem Allel B NS1 handelt es sich um eine Untergruppe des NS1-Proteins, welches fast ausschließlich in aviären Influenzavirus-Stämmen gefunden wird (van Wielink *u. a.*, 2011). Ziel dieser Studie war es eine Zelllinie zu erzeugen, welche die Produktion von Influenzavirus delNS1 zu hohen Titern erlaubt. Wie bereits im Abschnitt 4.2.5 beschrieben,

handelt es sich hierbei um einen Mutationsstamm, welcher aufgrund eines nicht-funktionalen NS1-Proteins in Tieren und Menschen stark attenuiert ist. Aufgrund dessen wird Influenzavirus delNS1 für die Herstellung von lebend-attenuierten Impfstoffen in Betracht gezogen (Wressnigg *u. a.*, 2009). Zudem kann er als Geflügelimpfstoff verwendet werden, um zwischen natürlich infizierten und geimpften Tieren zu unterscheiden (Capua und Cattoli, 2007; Wang *u. a.*, 2008; van Wielink *u. a.*, 2011). Neben der Expression viraler Antagonisten zur Unterdrückung der antiviralen IFN-Antwort kamen bereits auch chemische Inhibitoren zum Einsatz. Für diesen Ansatz werden keine genetisch-veränderten Zelllinien benötigt, deren Herstellung zum Teil zeitaufwendig ist und ebenfalls zu regulatorischen Problemen bei Impfstoffherstellern führen können. Nachteile bei dieser Herangehensweise bestehen jedoch zum einen in den Kosten für die benötigten Inhibitoren sowie in der Verunreinigung der Viruslösung mit den eingesetzten Substanzen (Stewart, Randall und Adamson, 2014).

Neben den bereits genannten IFN-sensitiven Viren könnte auch die Vermehrung von Influenzavirus-Stämmen, die eine starke antivirale Immunantwort auslösen, von IFN-insensitiven Zelllinien profitieren. Eine Studie von Velthuis und Kollegen konnte beispielsweise zeigen, dass manche Influenzavirus-Stämme mvRNAs während der Virusreplikation bilden. Diese mvRNAs können anschließend an RIG-I binden und führen zu einer starken Zytokin-Expression (z. B. IFN) und Apoptose-Induktion. Grund für die Bildung dieser mvRNAs scheint eine anormale vRNA-Replikation zu sein, welche durch eine geringe Lesegenauigkeit der viralen RNA-Polymerase oder wirtsspezifische Aminosäuren hervorgerufen werden kann. Eine vermehrte Bildung von mvRNAs konnte beispielsweise für die Polymerase des hoch-virulenten IAV-Stammes A/Brevig Mission/1/18 (H1N1) und den pandemischen IAV-Stamm A/Ente/Fujian/01/02 (H5N1) beobachtet werden (Velthuis *u. a.*, 2018). Eine gestörte IFN-Antwort könnte somit das Überleben der Zelle während der Virusreplikation und die damit verbundene Virusvermehrung unterstützen.

Die Expression von E1A und E1B, wie sie bereits zur Immortalisierung neuartiger Produktionszelllinien verwendet wird, ermöglicht somit neben einer kontinuierlichen Zellteilung auch die erfolgreiche Unterdrückung der antiviralen IFN-Antwort in humanen Zelllinien ohne zusätzliche Maßnahmen. Inwieweit die Unterdrückung der antiviralen IFN-Antwort in nicht-humanen Zellsystemen eine Rolle bei der Vermehrung von IFN-sensitiven Viren spielt, konnte im Rahmen dieses Forschungsprojektes nicht vollständig geklärt werden. Einen Aufklärungsansatz bildete die Masterarbeit von Theresa Breitwieser (Breitwieser, 2015), in der Infektionsexperimente mit Influenzavirus delNS1 in MDCK-Zelllinien, welche unterschiedliche Expressionslevel von E1A und E1B (Fernandes *u. a.*, 2013) aufwiesen, erfolgten. Die Untersuchungen der antiviralen Genexpression mittels *real-time* PCR (bestimmt anhand von

Mx1), zeigte eine deutliche Reduktion der Mx1-Genexpression in den E1A- und E1B-exprimierenden MDCK-Zelllinien. In Hinblick auf die Gesamtvirustiter konnte nach 32 hpi ein leicht erhöhter Wert für die MDCK-Zelllinie mit hoher E1A-Expression verzeichnet werden. Der erzielte finale Gesamtvirustiter blieb jedoch verglichen zu der MDCK-Kontrollzelllinie unverändert (Breitwieser, 2015). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen der humanen Zelllinien aus dieser Arbeit. Ad_r-Zelllinien stellen somit, neben Vero-Zellen, eine vielversprechende Zellkultur-basierte Produktionsplattform für die Herstellung von IFN-sensitiven Viren dar.

Die Ergebnisse dieser Arbeit waren z. T. Gegenstand der Studienabschlussarbeit von Theresa Breitwieser und wurden in der Publikation „*Impaired antiviral response of adenovirus-transformed cell lines supports virus replication*“ (Bachmann u. a., 2016) veröffentlicht.

4.3 AUSWAHL DER GENKANDIDATEN

Für die Identifikation von Schlüsselfaktoren der Influenzavirus-Replikation wurden im Rahmen des Verbundprojektes *CellSys* genetisch modifizierte Zelllinien mittels lentiviraler Transduktion hergestellt, mit IAV infiziert und anschließend die erzielten Virustiter analysiert. Die Auswahl der Genkandidaten basierte auf einer Liste von Wirtszellfaktoren, welche im Rahmen des genomweiten RNAi-Screens von Karlas und Kollegen im Jahr 2010 erstellt wurde. In diesem Screen wurden insgesamt 22.843 Gene hinsichtlich ihres Einflusses auf die Influenzavirus-Vermehrung in A549-Zellen untersucht (Karlas *u. a.*, 2010). Dabei konnten 287 Gene identifiziert werden, welche eine provirale Funktion zeigten. Zudem gelang es 25 Gene mit antiviralen Eigenschaften zu identifizieren. Nach weiteren Validierungen (z. B. Zytotoxizität der siRNAs) der 287 proviralen Genkandidaten, konnte eine Liste mit 93 proviralen Genkandidaten erstellt werden, welche die Grundlage für die Auswahl der Überexpressionskandidaten darstellte. Diese Liste umfasste zudem vier Kandidaten (SIAT1 (Matrosovich *u. a.*, 2003), FANCG (Tafforeau *u. a.*, 2011), FMR1 (Zhou *u. a.*, 2014) und CEACAM6 (Gaur *u. a.*, 2012) für die in der Literatur bereits ein Bezug zur IAV-Replikation beschrieben wurde. Um die Liste der Überexpressionskandidaten einzugrenzen, erfolgte eine weitere Selektion nach folgenden Kriterien: Kein Bestandteil von Proteinkomplexen, bestenfalls bereits beschriebene Funktion bei viralen Infektionen und Abdeckung verschiedener Schritte während der Virusreplikation. Für die 25 Knockdownkandidaten erfolgten keine weiteren Validierungsschritte. Diese Liste wurde ebenfalls durch zwei Positivkontrollen aus der Literatur (RIG-I (Loo *u. a.*, 2008), Interferon- α/β -Rezeptor (IFNAR1) (Iwasaki und Pillai, 2014)) ergänzt. Folgende Gene wurden für die Herstellung der Überexpressions- und Knockdownzelllinien ausgewählt (siehe Tabelle 29).

Tabelle 29: Liste der Überexpressions- und Knockdownkandidaten.

Überexpressionskandidaten	Knockdownkandidaten
BRSK2	ABCA1
CEACAM6 ^a	ATP10A
EEF1a1	C12orf45
FANCG ^a	C1orf216
FLT4	C1orf216
FMR1 ^a	C6orf1
KCNJ12	CASP8AP2 ^b
KPNB1	CELF6
MAGI2	CHAF1A
NME3	CYC1

Überexpressionskandidaten	Knockdownkandidaten
NME7	RIG-I ^a
NUP98	GRAMD4
NXF1	ICAM2
PACSIN1	IFNAR1 ^a
PI4KB	KATNAL1
PIN1	KIF23
PKLR	LAMTOR1
PLD2	MKL1
ROR2	MRPS12
SIAT1 ^a	MYEF2
TNK2	NECAP2
TRIM21	PCGF3
TSSK3	PIK3R6
XAB2	POLDIP2
XPO1	PRR12
	RAI14
	SCAF1
	SERPINE2
	WBP5

^a selbstgewählte Positivkontrollen, ^b kontaminierte Zelllinie, (Rot) Zelllinienherstellung nicht möglich, (Grün) hergestellte Zelllinien

Die unterschiedlichen Markierungen der Felder zeigen, welche Zelllinien erfolgreich hergestellt werden konnten (grün markiert) und welche Zelllinien im Rahmen dieser Arbeit nicht standardmäßig generiert werden konnten (rot markiert). Gründe für das Scheitern bei der Erzeugung einiger Zelllinien lagen u. a. in fehlerhaften Sequenzen der bestellten cDNAs für die Überexpressionskonstrukte, Zytotoxizität der Überexpressionskonstrukte und zu niedriger Knockdowneffizienzen durch die eingebrachten shRNAs (Knockdowneffizienz <70 %).

Die Grundlage für die Herstellung der Überexpressions- und Knockdownzelllinien bildete die Modellzelllinie A549. Aufgrund ihres alveolären Ursprungs und ihres kontinuierlichen Zellwachstums wird diese Krebszelllinie häufig für Influenzavirus-Studien verwendet. Zudem erfolgte der RNAi-Screen von Karlas und Kollegen in dieser Zelllinie. Zu Beginn der Arbeiten erfolgte zunächst die Herstellung von Zelllinien mit der Überexpression bzw. des Knockdowns jeweils eines Gens. Die hergestellte Knockdownzelllinie CASP8AP2 zeigte im Verlauf der Infektionsexperimente eine persistente Kontamination mit IAV. Aufgrund dessen erfolgte der Ausschluss dieser Zelllinie für die weiteren Analysen. Zusätzlich zu den Überexpressions- und Knockdownzelllinien erfolgte die Herstellung geeigneter Kontrollzelllinien. Für die Überexpressionszelllinien stellte das HZI Braunschweig, neben den anderen

Überexpressionszelllinien, eine Zelllinie her, welche anstelle des GOIs ein irrelevantes Gen (Element aus dem EMCV) exprimiert (im Folgenden als „Kontrolle ÜE“ bezeichnet). Des Weiteren wurde eine Zelllinie hergestellt, welche im ersten Cistron des Überexpressionskonstruktes GFP und im zweiten Cistron ein rot fluoreszierendes Protein (RFP) kodiert („GFP-RFP Kontrolle“). Die erste Kontrolle diente als Transduktionskontrolle und die zweite zur Überprüfung ob beide Cistrons erfolgreich exprimiert werden (siehe Abschnitt 3.4). Als Kontrolle für die Knockdownzelllinien wurde vom MPI-IB zusätzlich eine Zelllinie generiert, welche eine shRNA gegen das Luciferase-Gen aus *Photinus pyralis* exprimiert (im weiteren Verlauf als „Kontrolle KD“ bezeichnet). Da dieses Gen nicht im humanen Genom vorkommt, stellt diese Kontrolle eine *non-traget* Kontrolle dar.

Zusätzlich zu den unsortierten Überexpressionspopulationen (im Folgenden durch „*pop*“ gekennzeichnet), erfolgte die Sortierung einiger Zelllinien anhand ihrer Genexpression. Dafür wurde mittels Durchflusszytometrie das GFP-Signal der Zellen (Korrelation zur Expressionsstärke der Überexpressionskonstrukte) bestimmt und Populationen mit Niedrig (durch „*low*“ gekennzeichnet)- und Starkexprimierern (durch „*high*“ gekennzeichnet) sortiert. Auch für die Transduktionskontrolle der Überexpressionszelllinien wurde die Population sortiert (unsortiert – „Kontrolle *pop*“, sortiert auf schwache Expression – „Kontrolle *low*“, sortiert auf hohe Expression – „Kontrolle *high*“). Zur Überprüfung der unterschiedlichen Genexpressionsstärken erfolgte am HZI Braunschweig die Bestimmung des mRNA-Levels für ausgewählte Zelllinien mittels *real-time* PCR (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse bestätigten die Korrelation zwischen der GFP- und der GOI-Expression.

Insgesamt wurden 39 Überexpressionszelllinien inklusive Kontrollen (kodierend für 22 Gene) und 19 Knockdownzelllinien inklusive Kontrolle (kodierend für 19 Gene) mittels lentiviraler Transduktion hergestellt und auf ihre Virustiter nach Infektion untersucht.

4.4 EXPERIMENTELLE CHARAKTERISIERUNG DER INFLUENZAVIRUS-VERMEHRUNG IN GENETISCH MODIFIZIERTEN ZELLINIEN

4.4.1 ANALYSE DER VIRUSVERMEHRUNG IN KNOCKDOWN- UND ÜBEREXPRESSIONSZELLINIEN

4.4.1.1 UNTERSUCHUNG DER FINALEN GESAMTVIRUSTITER VON INFLUENZAVIRUS A/PR/8/34- INFEKTIONEN

Bei der Produktion von Influenza-Impfstoffen spielt der Gesamtvirustiter sowie der infektiöse Virustiter pro Volumeneinheit eine wichtige Rolle. Daher wurden die Überexpressions- und Knockdownzelllinien zunächst auf ihre finalen Gesamtvirustiter untersucht. Dafür erfolgten Infektionen mit Influenzavirus A/PR/8/34 unter Niedrig-MOI Bedingungen ($MOI 10^{-4}$). Der verwendete Saatvirusstamm wurde an das Wachstum in A549-Zellen adaptiert, wodurch er gute Replikationseigenschaften für dieses Wirtszellsystem erlangte und somit zu stabilen Gesamtvirustitern führte. Als Probenahmezeitpunkte dienten 72 hpi und 96 hpi. Die Untersuchungen erfolgten in 12-Well-Platten mit 5×10^5 Zellen pro Well. Für die Auswertung der Gesamtvirustiter wurde der HA-Assay verwendet.

Aufgrund der verschiedenen zur Verfügung stehenden Kontrollen für die Überexpressionszelllinien wurden diese zunächst hinsichtlich der Virusproduktion verglichen und diejenige ausgewählt, welche über beide Zeitpunkte den höchsten finalen Gesamtvirustiter aufwies (siehe Abbildung 19). Für die Knockdownzelllinien war dies nicht notwendig, da hierfür nur eine Kontrolle generiert wurde.

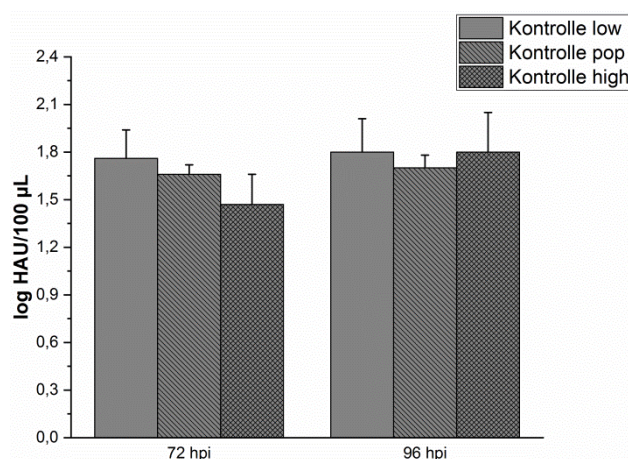


Abbildung 19: Vergleich der Überexpressionskontrollen. Die Infektion der Zelllinien „Kontrolle low“ (ungemusterte Balken), „Kontrolle pop“ (schraffierte Balken) und „Kontrolle high“ (Gitternetzlinien) erfolgte mit dem Influenzavirus A/PR/8/34 und einer MOI von 10^{-4} . Die Bestimmung des finalen Gesamtvirustiters mittels HA-Assay erfolgte zu den Zeitpunkten 72 hpi und 96 hpi. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei biologischen Replikaten sowie die dazugehörigen Standardabweichungen (Fehlerbalken).

Die Auswertung der finalen Gesamtvirustiter ergab, dass die Transduktionskontrolle „Kontrolle low“ die höchsten Gesamtvirustiter zu den Zeitpunkten 72 hpi und 96 hpi erzielte. Somit stellte sie die stringenteste Kontrolle für die Überexpressionszelllinien dar und wurde für die weiteren Versuche mitgeführt (weiterführend als „Kontrolle ÜE“ bezeichnet).

Für eine bessere Übersicht werden im Folgenden die parentale A549-Zelllinie **schwarz** und die Kontrollen **dunkelgrau** markiert. Die Ergebnisse der Gesamtvirustiteruntersuchungen der Überexpressions- und Knockdownzelllinien sind in Abbildung 20 sowie Abbildung 21 dargestellt.

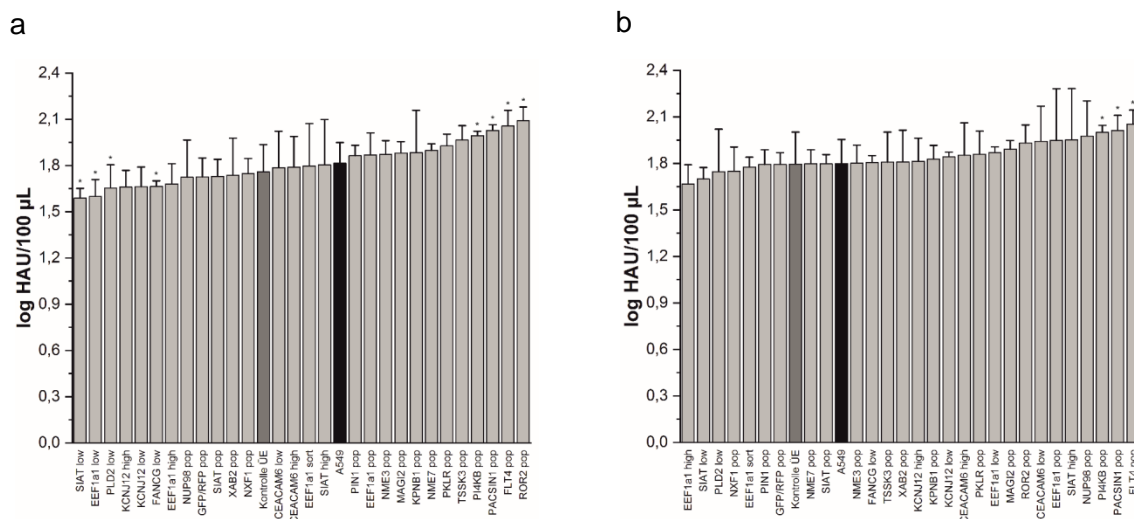


Abbildung 20: Gesamtvirustiterscreening von Überexpressionszelllinien. Die Infektion der Überexpressionszelllinien erfolgte mit dem Influenzavirus A/PR/8/34 und einer MOI von 10^{-4} . Mithilfe des HA-Assays wurden zu 72 hpi (a) und 96 hpi (b) die finalen Gesamtvirustiter bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei biologischen Replikaten sowie die dazugehörigen Standardabweichungen (Fehlerbalken). hellgrau: Überexpressionszelllinien, schwarz: parentale A549-Zelllinie, dunkelgrau: Transduktionskontrolle „Kontrolle ÜE“. Die statistische Auswertung der Beobachtungen erfolgte zwischen den Überexpressionszelllinien und der parentalen A549-Zelllinie mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests (*, $p \leq 0,05$; kein Stern $p > 0,05$).

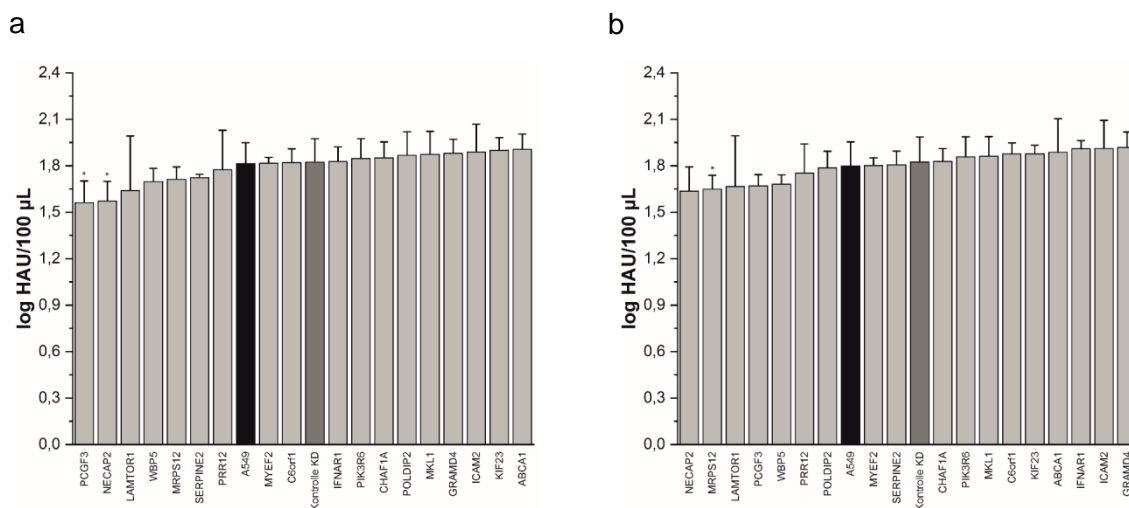


Abbildung 21: Gesamtvirustiterscreening von Knockdownzelllinien. Die Infektion der Knockdownzelllinien erfolgte mit dem Influenzavirus A/PR/8/34 und einer MOI von 10^{-4} . Mithilfe des HA-Assays wurden zu 72 hpi (a) und 96 hpi (b) die finalen Gesamtvirustiter bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei biologischen Replikaten sowie die dazugehörigen Standardabweichungen (Fehlerbalken). hellgrau: Knockdownzelllinien, schwarz: parentale A549-Zelllinie, dunkelgrau: „Kontrolle KD“. Die statistische Auswertung der Beobachtungen erfolgte zwischen den Knockdownzelllinien und der parentalen A549-Zelllinie mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests (*, $p \leq 0,05$; kein Stern $p > 0,05$).

Trotz der stabilen Genüberexpression, welche durch eine kontinuierliche Überprüfung der GFP-Expressionen kontrolliert wurde, konnte nur für wenige Zelllinien eine leichte Steigerung des finalen Gesamtvirustiters im Vergleich zur parentalen A549-Zelllinie verzeichnet werden. Diese Steigerung betrug bei ausgewählten Überexpressionszelllinien jedoch lediglich 0,2 bis 0,3 log HAU/100 µL und bei einigen Knockdownzelllinien ~ 0,15 log HAU/100 µL (nicht signifikant).

Da es sich bei dem verwendeten Virusstamm um ein an die A549-Zelllinie adaptiertes Saatvirus handelte, besteht die Möglichkeit, dass positive Effekte der getesteten Genkandidaten aufgrund des optimierten Viruswachstums nur zu geringfügigen Veränderungen der Gesamtvirustiter führen und aufgrund der relativ großen Fehlerbalken nicht klar identifiziert werden können. Des weiteren sollte ausgeschlossen werden, dass diese Beobachtungen nur dem verwendeten Influenzavirus A/PR/8/34-Stamm zugrunde liegen. Daher erfolgten auf diesen Ergebnissen basierend Infektionen mit einem anderen, nicht an A549-Zellen adaptierten, Influenzavirus-Stamm (siehe Abschnitt 4.4.1.2).

4.4.1.2 UNTERSUCHUNG DER GESAMTVIRUSTITER VON INFLUENZAVIRUS A/WSN/33-INFESTIONEN

Neben der Untersuchung der Virusreplikation eines adaptierten Influenzavirus-Stammes in den Überexpressions- und Knockdownzelllinien sollte in diesem Abschnitt der Arbeit ein nicht-

adaptiertes Saatvirus getestet werden. Hierbei fiel die Wahl auf das in MDCK-Zellen produzierte Influenzavirus A/WSN/33. Dieser Virusstamm wurde zudem für den RNAi-Screen von Karlas und Kollegen (Karlas *u. a.*, 2010) verwendet, welcher die Grundlage für die Auswahl der Genkandidaten bildete. Aufgrund der langsameren Vermehrung des verwendenden Saatvirus wurde der finale Gesamtvirustiter erst nach 96 hpi bis 120 hpi erreicht. Daher wurden die Probenahmen auf diese Zeitpunkte angepasst. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie im Abschnitt 4.4.1.1 beschrieben. Aufgrund der minimalen Unterschiede bei den Influenzavirus A/PR/8/34-Infektionsversuchen erfolgte eine Selektion der Knockdownzelllinien auf fünf vielversprechende Kandidaten basierend auf Infektionsdaten vom MPI-IB (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse von den Infektionsversuchen der Überexpressionszelllinien sind in Abbildung 22 und die der Knockdownzelllinien in Abbildung 23 dargestellt.

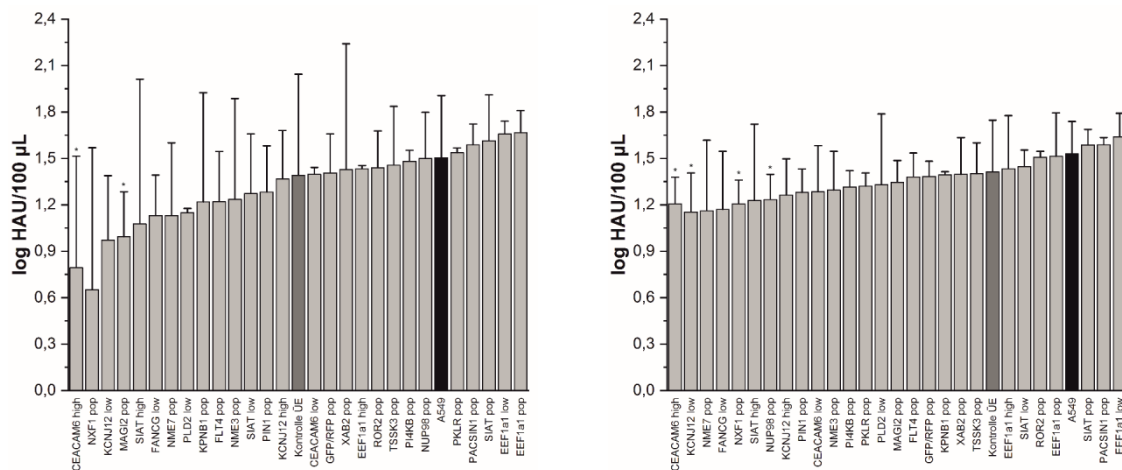


Abbildung 22: Gesamtvirustiterscreening von Überexpressionszelllinien. Die Infektion der Überexpressionszelllinien erfolgte mit dem Influenzavirus A/WSN/33 und einer MOI von 10^{-4} . Mithilfe des HA-Assays wurden zu 96 hpi (a) und 120 hpi (b) die finalen Gesamtvirustiter bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei biologischen Replikaten sowie die dazugehörigen Standardabweichungen (Fehlerbalken). hellgrau: Überexpressionszelllinien, schwarz: parentale A549-Zelllinie, dunkelgrau: Transduktionskontrolle „Kontrolle UE“. Die statistische Auswertung der Beobachtungen erfolgte zwischen den Überexpressionszelllinien und der parentalen A549-Zelllinie mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests (*, $p \leq 0,05$; kein Stern $p > 0,05$).

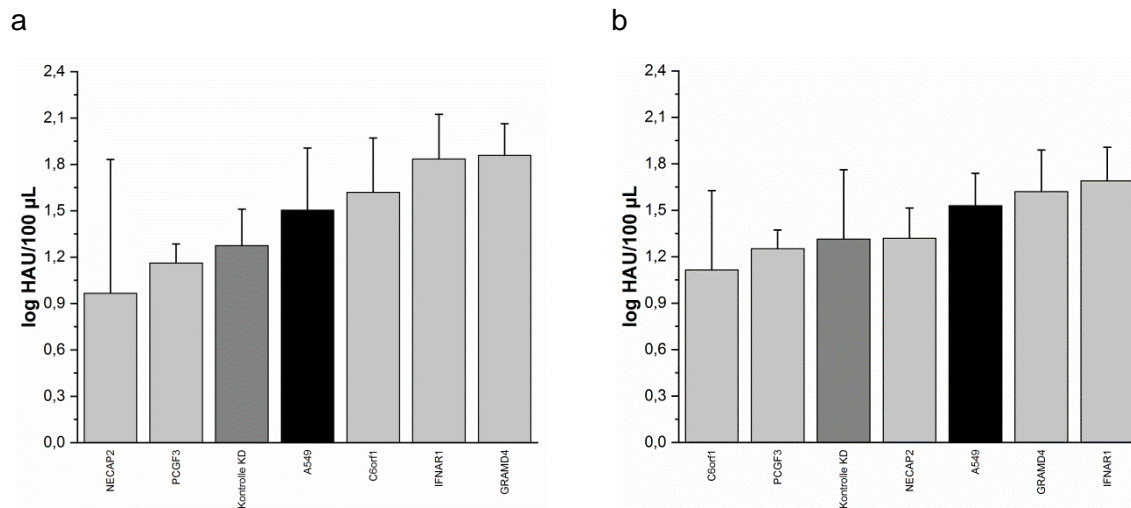


Abbildung 23: Gesamtvirustiterscreening von Knockdownzelllinien. Die Infektion der Knockdownzelllinien erfolgte mit dem Influenzavirus A/WSN/33 und einer MOI von 10^{-4} . Mithilfe des HA-Assays wurden zu 96 hpi (a) und 120 hpi (b) die finalen Gesamtvirustiter bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei biologischen Replikaten sowie die dazugehörigen Standardabweichungen (Fehlerbalken). hellgrau: Knockdownzelllinien, schwarz: parentale A549-Zelllinie, dunkelgrau: „Kontrolle KD“. Die statistische Auswertung der Beobachtungen erfolgte zwischen den Knockdownzelllinien und der parentalen A549-Zelllinie mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests (*, $p \leq 0,05$; kein Stern $p > 0,05$).

Verglichen mit den Ergebnissen der Influenzavirus A/PR/8/34-Infektionen konnten bei der Verwendung des nicht-adaptierten WSN-Stammes größere Unterschiede bei den erzielten finalen Gesamtvirustitern beobachtet werden. Diese wiesen jedoch noch größere Schwankungen innerhalb der biologischen Replikate auf und sind nicht signifikant. Zudem lag der erzielte finale Gesamtvirustiter oftmals deutlich unter den Werten der Influenzavirus A/PR/8/34-Infektionen. Trotz der Verwendung des nicht-adaptierten WSN-Stammes konnte erneut kein Genkandidat identifiziert werden, der zu einer Steigerung des finalen Gesamtvirustiters führt. Aufgrund dieser Datenlage erfolgten im Anschluss Untersuchungen der frühen Gesamtvirustiter, um herauszuarbeiten, ob durch die Veränderung der Genexpression ausgewählter Zielgene die Virusreplikationsdynamik beeinflusst werden kann. Erhöhte Gesamtvirustiter zu frühen Zeitpunkten können ebenfalls die Influenza-Impfstoffproduktion positiv durch eine Verkürzung der Produktionszeit beeinflussen.

4.4.1.3 UNTERSUCHUNG FRÜHER GESAMTVIRUSTITER VON INFLUENZA A/PR/8/34-INFESTIONEN

Aufgrund der Vielzahl an zu untersuchenden Zelllinien erfolgte vor Beginn dieser Versuche eine Selektion auf 21 vielversprechende Überexpressionskandidaten basierend auf ihren erzielten Gesamtvirustitern. Auf Seiten der Knockdownzelllinien wurden die vorselektierten fünf Zelllinien weitergeführt. Die Infektionen erfolgten mit dem Influenzavirus A/PR/8/34 wie im Abschnitt 4.4.1.1 beschrieben. Als Probenahmezeitpunkte kamen für die Überexpressionszelllinien 36 hpi und 42 hpi und für die Knockdownzelllinien 30 hpi und 48 hpi

zum Einsatz. Die Abweichung der Probenahmezeitpunkte kam durch den unterschiedlichen Optimierungsstatus der Infektionsversuche zu Stande. Zunächst erfolgten die Probenahmen für die Knockdownzelllinien zu 30 hpi und 48 hpi. Im Laufe der Arbeit wurden die Zeitpunkte für die Bestimmung der Gesamtvirustiter der frühen Infektionsphase für die Überexpressionszelllinien auf 36 hpi und 42 hpi angepasst, um den dynamischen Bereich der Virusreplikation besser abzudecken und um zuverlässig bestimmbare HA-Werte zu erzielen. Die nachfolgende Abbildung 24 zeigt die Ergebnisse der Überexpressionszelllinien und die Abbildung 25 die Ergebnisse der Knockdownzelllinien.

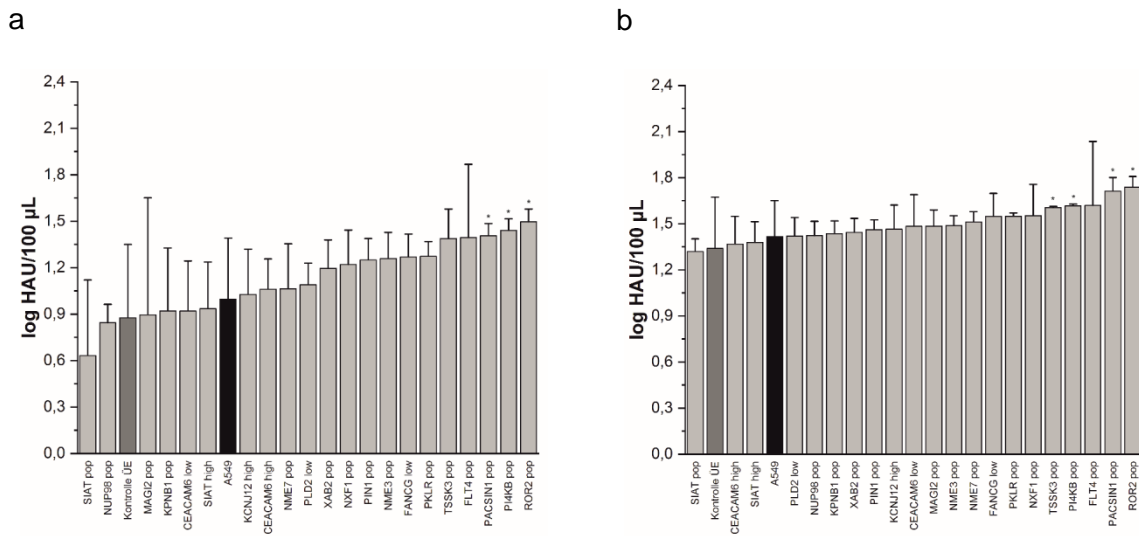


Abbildung 24: Gesamtvirustiter der frühen Infektionsphase von Überexpressionszelllinien. Die Infektion der Überexpressionszelllinien erfolgte mit dem Influenzavirus A/PR/8/34 und einer MOI von 10^{-4} . Mithilfe des HA-Assays wurden zu 36 hpi (a) und 42 hpi (b) die Gesamtvirustiter bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei biologischen Replikaten sowie die dazugehörigen Standardabweichungen (Fehlerbalken). hellgrau: Überexpressionszelllinien, schwarz: parentale A549-Zelllinie, dunkelgrau: Transduktionskontrolle „Kontrolle UE“. Die statistische Auswertung der Beobachtungen erfolgte zwischen den Überexpressionszelllinien und der parentalen A549-Zelllinie mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests (*, $p \leq 0,05$; kein Stern $p > 0,05$).

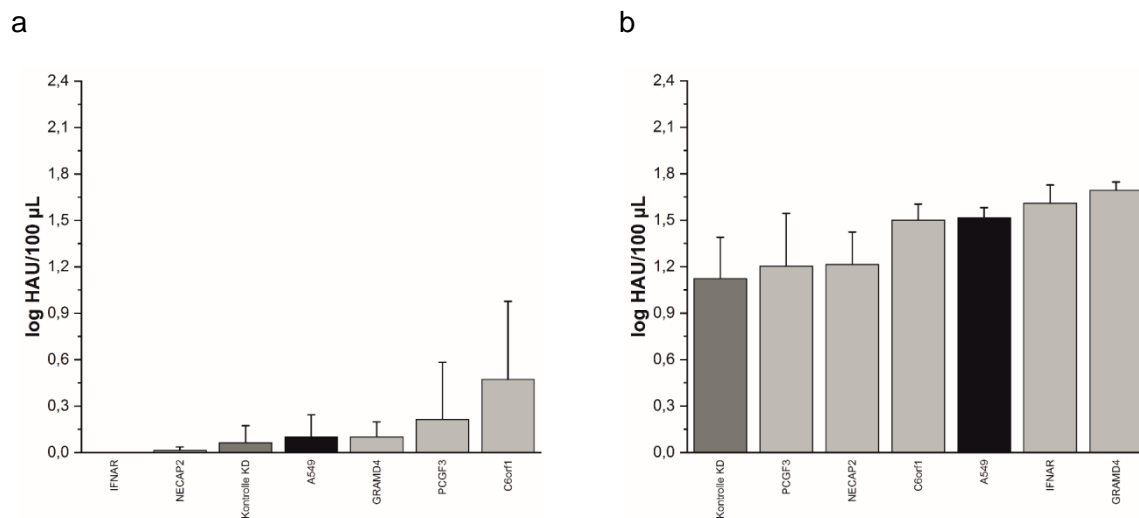


Abbildung 25: Gesamtvirustiter der frühen Infektionsphase von Knockdownzelllinien. Die Infektion der Knockdownzelllinien erfolgte mit dem Influenzavirus A/PR/8/34 und einer MOI von 10^{-4} . Mithilfe des HA-Assays wurden zu 30 hpi (a) und 48 hpi (b) die Gesamtvirustiter bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei biologischen Replikaten sowie die dazugehörigen Standardabweichungen. hellgrau: Knockdownzelllinien, schwarz: parentale A549-Zelllinie, dunkelgrau: „Kontrolle KD“. Die statistische Auswertung der Beobachtungen erfolgte zwischen den Knockdownzelllinien und der parentalen A549-Zelllinie mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests (*, $p \leq 0,05$; kein Stern $p > 0,05$).

Die Untersuchung der Gesamtvirustiter ergab, dass einige Genüberexpressionen (PACSIN1, ROR2, PI4KB) im Vergleich zu den Kontrollen eine signifikant schnellere Virusreplikation ermöglichen. Des Weiteren kann jedoch auch beobachtet werden, dass dieser Vorteil über die Infektionsdauer abnimmt (siehe Abbildung 24b). Für die Knockdownzelllinien konnte anhand des 30 hpi Probenahmezeitpunktes für PCGF3 und C6orf1 ebenfalls eine frühere Initiation der Virusreplikation beobachtet werden. Auch in diesem Fall verliert sich dieser positive Effekt nach 48 hpi (siehe Abbildung 25b). Parallel zu den Analysen der frühen Gesamtvirustiter bei Influenzavirus A/PR/8/34-Infektionen erfolgten Infektionsversuche mit dem Influenzavirus A/WSN/33 (siehe Abschnitt 4.4.1.4).

4.4.1.4 UNTERSUCHUNG FRÜHER GESAMTVIRUSTITER VON INFLUENZA A/WSN/33-INFESTIONEN

Die Durchführung der Infektionsstudien mit Influenzavirus A/WSN/33 erfolgte wie im Abschnitt 4.4.1.1 erläutert. Aufgrund der langsameren Virusvermehrung erfolgten die Probenahmezeitpunkte für die Überexpressionszelllinien zu 60 hpi und 66 hpi und für die Knockdownzelllinien zu 54 und 72 hpi. Auch hierbei sind die Unterschiede der gewählten Probezeitpunkte dem unterschiedlichen Optimierungsstatus der Infektionsversuche geschuldet. Die erzielten HA-Titer sind in Abbildung 26 und Abbildung 27 dargestellt.

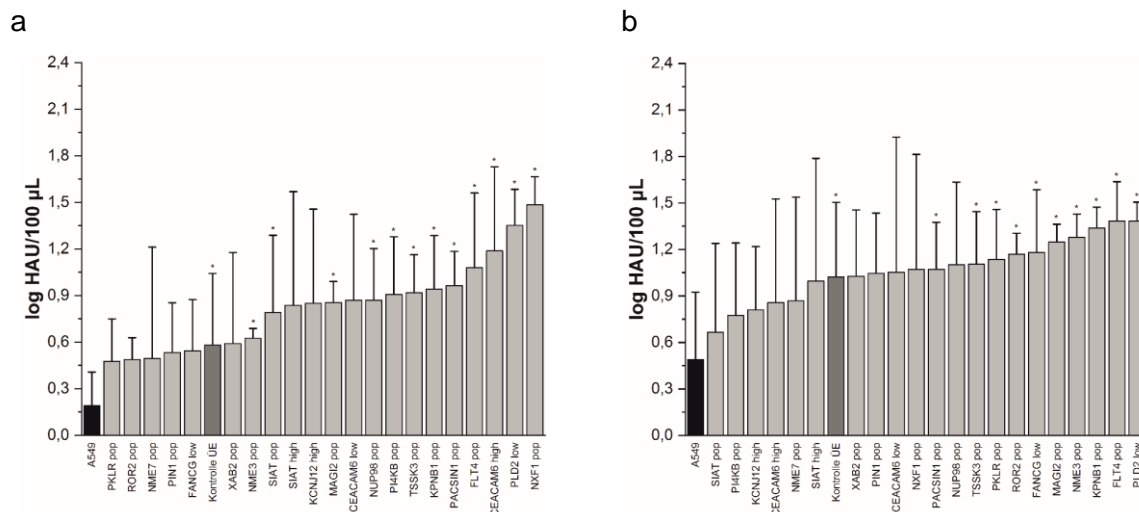


Abbildung 26: Gesamtvirustiter der frühen Infektionsphase von Überexpressionszelllinien. Die Infektion erfolgte mit Influenzavirus A/WSN/33 und einer MOI von 10^{-4} . Die Probenahmen erfolgten zu (a) 60 hpi und (b) 66 hpi. Für die Bestimmung des Gesamtvirustiters kam der HA-Assay zum Einsatz. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei biologischen Replikaten sowie die dazugehörigen Standardabweichungen (Fehlerbalken). hellgrau: Überexpressionszelllinien, schwarz: parentale A549-Zelllinie, dunkelgrau: Transduktionskontrolle „Kontrolle UE“. Die statistische Auswertung der Beobachtungen erfolgte zwischen den Überexpressionszelllinien und der parentalen A549-Zelllinie mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests (*, $p \leq 0,05$; kein Stern $p > 0,05$).

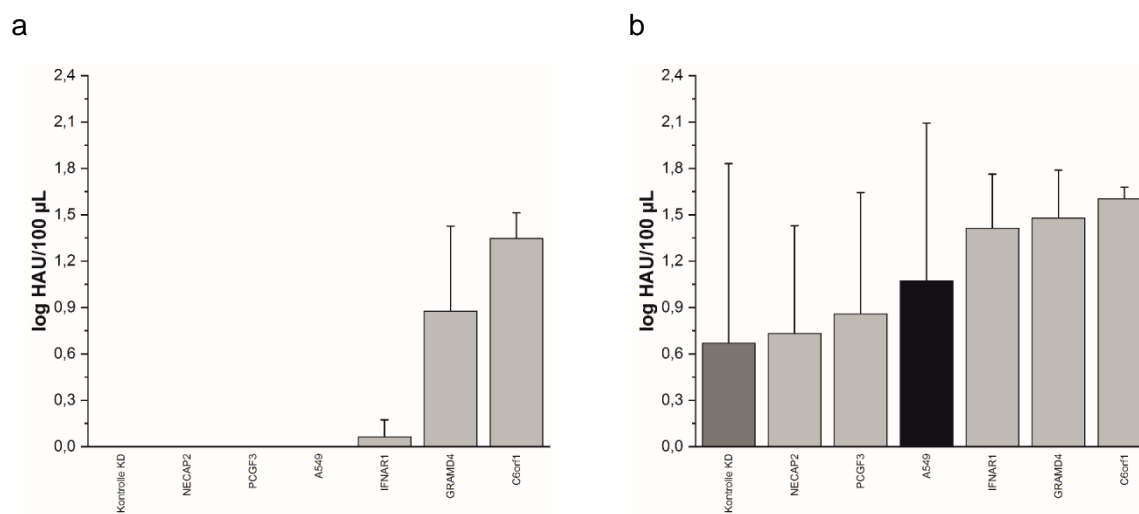


Abbildung 27: Gesamtvirustiter der frühen Infektionsphase von Knockdownzelllinien. Die Infektion erfolgte mit Influenzavirus A/WSN/33 und einer MOI von 10^{-4} . Die Probenahmen erfolgten zu 54 hpi (a) und 72 hpi (b). Für die Bestimmung des Gesamtvirustiters kam der HA-Assay zum Einsatz. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei biologischen Replikaten sowie die dazugehörigen Standardabweichungen (Fehlerbalken). hellgrau: Knockdownzelllinien, schwarz: parentale A549-Zelllinie, dunkelgrau: „Kontrolle KD“. Die statistische Auswertung der Beobachtungen erfolgte zwischen den Knockdownzelllinien und der parentalen A549-Zelllinie mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests (*, $p \leq 0,05$; kein Stern $p > 0,05$).

Ebenso wie bei den Analysen der finalen Gesamtvirustiter der Influenzavirus A/WSN/33-Infektionen (siehe Abschnitt 4.4.1.2) weisen die erzielten frühen Gesamtvirustiter starke Schwankungen innerhalb der biologischen Replikate auf. Dennoch zeigte sich auch hierbei der positive Trend auf die frühe Replikationsphase von einigen Überexpressions- und

Knockdownkandidaten. Beispielsweise wiesen die Überexpressionszelllinien PACSIN1 pop, PI4KB pop und ROR2 pop sowie die Knockdownzelllinien GRAMD4 und C6orf1 (bis auf 48 hpi bei den Influenzavirus A/PR/8/34-Infektionen) sowohl bei den Infektionsversuchen mit Influenzavirus A/PR/8/34 als auch Influenzavirus A/WSN/33 z. T. signifikant erhöhte Gesamtvirustiter zu frühen Zeitpunkten der Infektion im Vergleich zur parentalen A549-Zelllinie auf.

Zusammenfassend betrachtet konnte aufgrund der geringen absoluten Unterschiede und der starken Schwankungen der Gesamtvirustiter innerhalb der biologischen Replikate im Rahmen dieser Untersuchungen jedoch kein Genkandidat identifiziert werden, welcher zu einer konstanten Erhöhung der Gesamtvirustiter führte. Möglicherweise spielen andere, bisher nicht getestete, Schlüsselfaktoren eine Rolle bei der Virusreplikation und limitieren somit die Virusproduktion. Dennoch lassen sich Trends erkennen, welche auf potentielle Kandidaten hinweisen. Ein Grund für die starken Schwankungen innerhalb der biologischen Replikate liegt u. a. in stochastischen Fluktuationen innerhalb der Zelle. Diese Fluktuationen können sowohl durch extrinsisches als auch intrinsisches Rauschen entstehen. Extrinsisches Rauschen beschreibt Fluktuationen von der Menge an zellulären Komponenten, welche biochemische Reaktionen beeinflussen, wie beispielsweise die Konfluenz von Zellen. Intrinsisches Rauschen definiert hingegen stochastische Fluktuationen von biochemischen Reaktionen bei der Umsetzung von Molekülen, wie z. B. die Zellgröße und der Zellzyklus-Status. Da Viren auf zelluläre Faktoren angewiesen sind kann sowohl extrinsisches als auch intrinsisches Rauschen zu Zell-zu-Zell-Unterschieden beim Infektionsverhalten sowie bei der Virusreplikation führen (Snijder *u. a.*, 2009; Zhu, Yongky und Yin, 2009). Eine Studie von Heldt und Kupke analysierte Influenzavirus-Infektionen anhand von Einzelzell-Experimenten unter Hoch-MOI Bedingungen und führte zudem stochastische Simulationen durch, um Einblicke zu erlangen, ob auch in diesem System extrinsisches und intrinsisches Rauschen zu Zell-zu-Zell-Schwankungen in der Virusausbeute führen kann. Des weiteren wurde der Effekt des segmentierten Genoms von IAV auf diese Variabilität untersucht. Die Auswertung der erzielten Daten ergab, dass sowohl extrinsisches als auch intrinsisches Rauschen zu Unterschieden im vRNA-Gehalt führen kann und das segmentierte Genom von Influenzaviren zu einer Verstärkung dieser Effekte führt. Des weiteren wurde deutlich, dass diese Unterschiede in der frühen Phase der Virusreplikation entstehen. Ebenso wurden mithilfe von stochastischen Simulationen Niedrig-MOI-Szenarios, wie sie auch in dieser Arbeit verwendet wurden, untersucht. Das Ergebnis dieser Simulation zeigt einen deutlich verringerten infektiösen Virustiter, welcher zum einen durch eine hohe Anzahl an niedrig-produzierenden Zellen hervorgerufen wird sowie durch einen signifikanten Anstieg an nicht-produzierenden Infektionen. Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass rund 93 % der Infektionen nicht zur

Freisetzung von Nachkommenviren führen. Gründe hierfür liegen u. a. in dem Fehlschlagen der Fusion der parentalen Viren mit der endosomalen Membran sowie dem Fehlen von Genomsegmenten, wodurch kein vollständiger Replikationszyklus ermöglicht werden kann. Diese Studie zeigt deutlich, dass vor allem Niedrig-MOI-Bedingungen zu starken Zell-zu-Zell-Schwankungen bei der Virusausbeute führen und dass, je nach Anzahl an hoch- oder niedrigproduzierenden Einzelzellen, der Gesamtvirustiter innerhalb einer Zellpopulation stark beeinflusst werden kann.

Neben stochastischen Fluktuationen können auch DIPs zu Schwankungen der Virustiter zwischen Experimenten führen. DIPs werden wie folgt definiert: (1) DIPs besitzen die gleichen Strukturproteine wie das Wildtypvirus von dem sie abstammen. (2) DIPs weisen große Deletionen in wenigstens einem ihrer acht Genomsegmente auf wodurch sie nicht in der Lage sind alle benötigten Proteine für ihre Replikation zu bilden. Die Entstehung dieser Deletionen beruht zum einen auf der fehlenden Korrekturlesefähigkeit der viralen RdRp sowie durch fehlerhafte Anlagerungen der viralen Polymerase an die RNA innerhalb der dreidimensionalen RNA-Struktur (Frensing, 2015). Zudem betrifft sie meist die Polymerase-kodierenden Gene (Nayak, Chambers und Akkina, 1985) (3) Durch eine Ko-Infektion mit einem Wildtypvirus können DIPs replizieren. Dabei interferiert das DIP-Virus mit der Replikation des Wildtypvirus, wodurch vorrangig neue DIP-Viruspartikel gebildet und freigesetzt werden. Neben ihrer interferierenden Wirkung können DIPs zudem eine verstärkte Aktivierung der antiviralen Immunreaktion in der Zelle sowie eine erhöhte Apoptoseinduktion bewirken (Frensing *u. a.*, 2014). Das zeigt, dass DIPs einen wesentlichen Einfluss auf die Virusreplikation ausüben können und vor allem bei Hoch-MOI-Infektionen zur Beeinflussung der Virustiter führen. Vor allem bei der Adaption von Influenzaviren für die Herstellung von Saatviren sollte daher darauf geachtet werden, dass es zu keiner Anreicherung von DIPs kommt. Die Adaption von Viren auf andere Kultivierungssysteme erfolgt in der Regel über mehrere Passagen, wobei es zu Hoch-MOI Situationen und somit zur Anreicherung von DIPs kommen kann (Frensing, 2015). Der in dieser Arbeit verwendete A549-adaptierte Influenzavirus A/PR/8/34-Stamm wurde unter Verwendung einer Niedrig-MOI ($MOI\ 10^{-4}$) generiert und eine Charge mit einem guten Verhältnis aus infektiösen Virustiter zu Gesamtvirustiter ausgewählt. Des Weiteren erfolgten Untersuchungen der einzelnen Genomsegmente auf DIPs mittels RT-PCR. Eine ausführliche Beschreibung dieser Methode befindet sich in der Publikation von Frensing und Kollegen aus dem Jahr 2014 (Frensing *u. a.*, 2014). Durch die Verwendung dieser Niedrig-MOI Methode konnte ein Saatvirus hergestellt werden, welches einen hohen infektiösen Virustiter mit nur wenigen DIPs aufwies (Daten nicht gezeigt). Für das verwendete A/WSN/33-Saatvirus stehen leider keine Informationen zum Herstellungsverfahren zur Verfügung. Es ist daher möglich, dass dieses Saatvirus unter Verwendung einer höheren MOI hergestellt wurde und somit viele

DIPs enthielt. Dies wiederum könnte ein Grund für die starken Schwankungen bei den WSN-Infektionsversuchen darstellen.

Ein weiterer Grund für die beobachteten Unterschiede zwischen den Influenzavirus A/WSN/33-Infektionen und den A/PR/8/34-Infektionen, trotz der Verwendung gleicher Virusstartmengen (MOI 10^{-4}), kann der unterschiedliche Adaptierungsgrad der verwendeten Saatviren sein. In einer Studie von Rödiger und Kollegen wurde beispielsweise der IAV-Adaptationsprozess bei einem Wirtszellwechsel von MDCK-Zellen auf Vero-Zellen hinsichtlich des Einflusses auf die *N*-Glykosylierungsstrukturen der HA-Oberflächenproteine und die erzielten Gesamtvirustiter (HA-Assay) untersucht. Diese Studien zeigten, dass es bei einem Wechsel des Wirtszellsystems wesentlich länger dauert, bis eine Virusfreisetzung detektiert wird als bei der Verwendung eines adaptierten Saatvirus. Des Weiteren fielen die erzielten Gesamtvirustiter geringer aus. Ein Grund hierfür ist die vermutlich fehlende Adaptierung der *N*-Glykosylierungsstrukturen auf den HA-Proteinen, welche eine entscheidende Rolle bei der Virusanlagerung spielen (Roedig *u. a.*, 2011). Des Weiteren ist zu bedenken, dass die *N*-Glykosylierungsstrukturen nicht nur durch den Adaptierungsprozess (Roedig *u. a.*, 2011) und das Wirtszellsystem (Schwarzer *u. a.*, 2009) beeinflusst werden kann, sondern auch durch verschiedene Zellkulturmedien, das Herstellungsverfahren des Saatvirus, das Kultivierungssystem, die Kultivierungsbedingungen, die Zellkonzentration sowie die eingesetzte Virusstartmenge (MOI).

Neben den bereits beschriebenen Faktoren kann auch die begrenzte Anzahl an untersuchten Genkandidaten ein Grund für die ausbleibende Steigerung der Gesamtvirustiter sein. Auch das gewählte RNAi-Screeningverfahren zur Identifikation der zellulären Schlüsselfaktoren könnte dazu geführt haben, dass falsch-positive Genkandidaten identifiziert wurden (siehe Abschnitt 2.6.2). Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass mehrere Schlüsselfaktoren die Virusreplikation limitieren und somit die Genüberexpression bzw. der Genknockdown eines einzelnen Gens nicht ausreicht. Dieser Ansatz wird im Abschnitt 4.4.5 weiterverfolgt.

4.4.1.5 VALIDIERUNG DER C6ORF1- UND GRAMD4-KNOCKDOWNZELLINIEN

Aufgrund der beobachteten leichten Erhöhung der Gesamtvirustiter nach der Infektion mit Influenzavirus A/PR/8/34 und A/WSN/33 der C6orf1- und GRAMD4-Knockdownzelllinien verglichen zu der parentalen A549-Ausgangszelllinie (siehe Abbildung 23a/b, Abbildung 25a und Abbildung 27a), wurden von den Kooperationspartnern am MPI-IB mehrere Kontrollzelllinien erzeugt, um zu überprüfen, ob die beobachteten Effekte genspezifisch sind. Diese Kontrolle war notwendig, da keine weiteren Validierungen der Knockdownkandidaten im

Rahmen der Studie von Karlas und Kollegen erfolgten (Karlas *u. a.*, 2010). Diese Kontrollzelllinien umfassten eine Doppelknockdownzelllinie (shRNA-Expression gegen C6orf1 und GRAMD4), jeweils eine Überexpressionszelllinie für C6orf1 und GRAMD4 sowie zwei Kombinationszelllinien (shRNA GRAMD4 + Überexpression von GRAMD4 bzw. shRNA C6orf1 + Überexpression von C6orf1). Mithilfe der Doppelknockdownzelllinie sollte überprüft werden, ob durch den gleichzeitigen Knockdown dieser zwei Zielgene eine weitere Steigerung der Virustiter möglich ist. Die C6orf1- und GRAMD4-Überexpressionszelllinien dienten der Überprüfung des genspezifischen Effektes. Im Falle einer antiviralen Wirkung von C6orf1 und GRAMD4 sollte die Überexpression dieser Gene zu einem verminderten Virustiter führen. Durch die Kombination von shRNA-Expression und Genüberexpression sollte sich ein ausgleichender Effekt ergeben. Ein genspezifischer Knockdown würde in diesem Fall durch die zusätzliche Überexpression kompensiert werden und somit, im Falle einer ähnlichen Expressionsstärke des Knockdown- und Überexpressionskonstruktes, zu Virustitern ähnlich der Kontrollen führen. Nach dem Erhalt dieser Zelllinien erfolgte zunächst die Bestimmung der Genexpression der jeweiligen Zielgene mittels *real-time* PCR (siehe Abbildung 28).

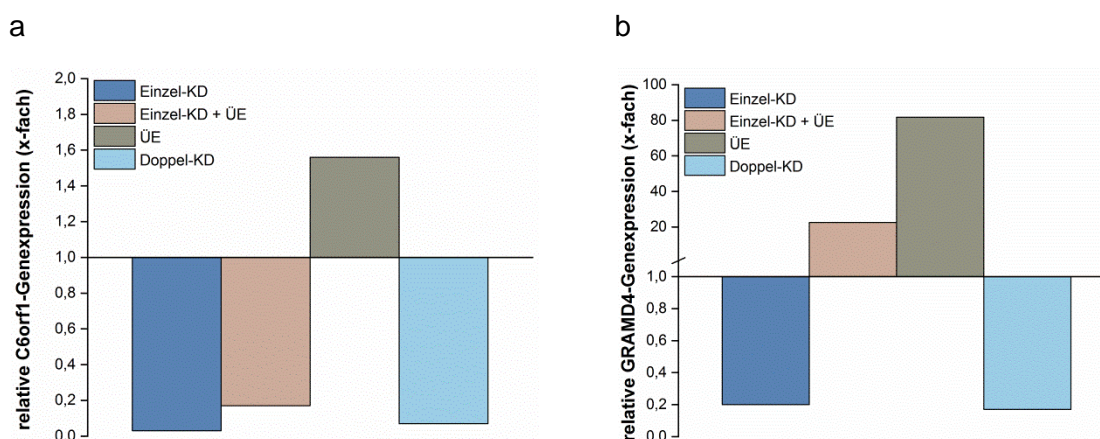


Abbildung 28: Bestimmung der C6orf1- und GRAMD4-Genexpression in Knockdown- und Überexpressionszelllinien. Die Bestimmung der Genexpression von (a) C6orf1 und (b) GRAMD4 erfolgte mittels *real-time* PCR in Überexpressions- und Knockdownzelllinien auf Basis der parentalen A549-Zelllinie. Dargestellt ist das Ergebnis einer Einzelmessung. Einzel-KD: shRNA vermittelter Knockdown von C6orf1 (a) / GRAMD4 (b), Einzel-KD + UE: Simultane Expression von shRNA und Überexpressionskonstrukt (shRNA + Überexpressionskonstrukt C6orf1 (a), shRNA + Überexpressionskonstrukt GRAMD4 (b)), UE: Überexpression von C6orf1 (a) / GRAMD4 (b), Doppel-KD: Simultane shRNA-Expression gegen C6orf1 und GRAMD4.

Die Bestimmung der C6orf1-Genexpression (siehe Abbildung 28a) zeigt, dass der Knockdown sowohl in der Einzel-Knockdownzelllinie als auch in der Doppel-Knockdownzelllinie erfolgreich zu einer Verringerung der Genexpression von > 80 % führte. Durch die Überexpression von C6orf1 konnte jedoch nur eine leichte Steigerung von ~60 % (\cong 1,6-fache Genexpression) verglichen zum Grundexpressionslevel (\cong 1-fache Genexpression) erzielt werden. Diese schwache Überexpression führte somit bei der Kombinationszelllinie auch nur zu einer leichten Verringerung des Knockdowns. Die Bestimmung der GRAMD4-Genexpression (siehe

Abbildung 28b) bestätigte den erfolgreichen Knockdown in der Einzel- und Doppel-Knockdownzelllinie ($\geq 80\%$). Zudem konnte gezeigt werden, dass die GRAMD4-Genexpression in der Überexpressionszelllinie um das ~ 80 -fache gesteigert werden konnte. Die gleichzeitige Expression der shRNA und des Überexpressionskonstruktes führte zu einer Steigerung der GRAMD4-Genexpression um das ~ 22 -fache.

Nach Bestätigung der unterschiedlichen Genexpressionslevel in den C6orf1- und GRAMD4-Zelllinien erfolgten Infektionsstudien mit Influenzavirus A/PR/8/34 (Durchführung siehe Abschnitt 4.4.1.1) und Probenahmen zu 36 hpi und 42 hpi, um zu überprüfen, ob die unterschiedlichen Genexpressionslevel zu veränderten Virustitern führen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 zusammengefasst.

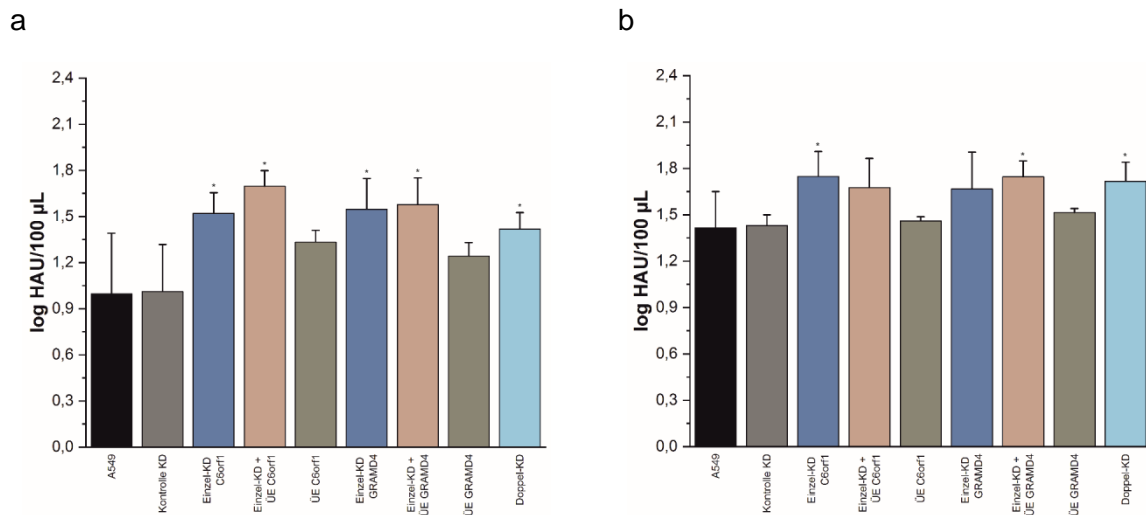


Abbildung 29: Influenzavirus-Produktion in den C6orf1- und GRAMD4-Kontrollzelllinien. Die Infektion der Kontrollzelllinien erfolgte mit Influenzavirus A/PR/8/34 und mit einer von $MOI 10^{-4}$. Mithilfe des HA-Assays wurden zu 36 hpi (a) und 42 hpi (b) die Gesamtvirustiter bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei biologischen Replikaten sowie die dazugehörigen Standardabweichungen (Fehlerbalken). schwarz: parentale A549-Zelllinie, dunkelgrau: shRNA Kontrolle. Einzel-KD: shRNA vermittelter Knockdown von C6orf1 (a) / GRAMD4 (b), Einzel-KD + UE: Simultane Expression von shRNA und Überexpressionskonstrukt (shRNA + Überexpressionskonstrukt C6orf1 (a), shRNA + Überexpressionskonstrukt GRAMD4 (b)), UE: Überexpression von C6orf1 (a) / GRAMD4 (b), Doppel-KD: Simultane shRNA-Expression gegen C6orf1 und GRAMD4. Die statistische Auswertung der Beobachtungen erfolgte zwischen den genetisch modifizierten Zelllinien und der parentalen A549-Zelllinie mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests (*, $p \leq 0,05$; kein Stern $p > 0,05$).

Unerwarteter Weise konnte zu 36 hpi für alle untersuchten Zelllinien eine leichte Steigerung des Gesamtvirustiters beobachtet werden. Auch nach 42 hpi blieb dieser Trend für die Einzel-Knockdownzelllinien, die Doppel-Knockdownzelllinie und die Kombinationszelllinien erhalten. Die Überexpression von C6orf1 bzw. GRAMD4 führte somit nicht wie erwartet zu einem verringerten Virustiter. Des weiteren zeigten die Kombinationszelllinien aus shRNA und Überexpressionskonstrukt entgegen der Erwartungen die höchsten Gesamtvirustiter, obwohl ein verringerter Knockdown für C6orf1 bzw. eine Überexpression für GRAMD4 vorlag.

Aufgrund dieser unschlüssigen Datenlage wurden am MPI-IB Knockoutzelllinien für C6orf1 und GRAMD4 mittels *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR)/*CRISPR-associated protein* (Cas) (CRISPR/Cas) hergestellt und der Virustiter im Vergleich zu den Kontrollzelllinien ermittelt. Im Gegensatz zu den erzielten Ergebnissen der Knockdownzelllinien konnte mit den Knockoutzellen kein gesteigerter Virustiter zu den frühen Zeitpunkten der Virusproduktion erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es sich hierbei wahrscheinlich um einen *off-target* Effekt der verwendeten shRNAs handelt. Der Grund für solche *off-target* Effekte liegt in dem RNAi-Wirkmechanismus. Wie bereits im Abschnitt 2.6.1 beschrieben, ermöglichen regulatorische RNAs (wie beispielsweise siRNAs und shRNAs) Zielgene sequenzspezifisch zu erkennen und diese zu regulieren. Neben diesen exogenen kleinen regulatorischen RNAs werden jedoch auch endogene, kleine regulatorische RNAs durch das Genom von Säugetieren kodiert. Diese werden als miRNAs bezeichnet und können, auch bei nur teilweise vorliegender Komplementarität, hunderte Ziel-mRNAs in ihrer Regulation beeinflussen. Eine entscheidende Rolle bei diesem Prozess spielt das Argonaut-Protein (Ago), ein Haupteffektorprotein des RISC (siehe Abschnitt 2.6.1), welches den „*anti-sense*“ Strang (komplementär zu der Ziel-mRNA-Sequenz) von si/shRNAs und miRNAs an sich bindet (Tijsterman und Plasterk, 2004; Seok *u. a.*, 2018). Im Falle einer perfekten Paarung des „*anti-sense*“ Stranges mit der Ziel-mRNA-Sequenz kommt es zum Schneiden dieses RNA-Doppelstrangbereiches durch Ago und somit zum Abbau dieser mRNA. Besteht jedoch nur eine teilweise Komplementarität, wie sie auch bei miRNAs in Tieren vorliegt, kann trotz des nicht stattfindenden Schneidens durch Ago aufgrund einer verminderten mRNA-Stabilität und/oder der Inhibierung der Translation die Expression des Zielgens unterdrückt werden. Dieser miRNA-ähnliche Unterdrückungsmechanismus besitzt meist nur einen geringen Einfluss auf das individuelle Transkriptlevel und wird daher fälschlicherweise oft als phänotypisch irrelevant eingestuft. Dennoch kann dieser Effekt einen Einfluss auf die globale Genexpression ausüben (Seok *u. a.*, 2018). Aufgrund der Tatsache, dass Ago nicht in der Lage ist, zwischen exogenen und endogenen kleinen RNAs zu unterscheiden, können shRNAs, wie in dieser Arbeit angewandt, als miRNAs agieren und zu unerwarteten Ergebnissen, den *off-target* Effekten, führen. Um solche *off-target* Effekte von si/shRNAs zu vermindern, ist es wichtig zum einen unspezifische bzw. „*scrambled*“ RNA-Sequenzen als Kontrolle zu verwenden und zum anderen mehrere si/shRNAs mit unterschiedlicher Sequenz gegen das gleiche Gen zu testen. Neben dem gezielten Design von si/shRNA-Sequenzen mit möglichst geringen Übereinstimmungen zu anderen mRNA-Sequenzen ist es ratsam, Sequenzen zu vermeiden, welche häufig in 3'UTRs vorkommen. Zudem sollte der GC-Gehalt, die thermodynamische Stabilität und auch die Konzentration der eingesetzten si/shRNA bedacht werden. Eine weitere Möglichkeit zur Verringerung von *off-target* Effekten ist die chemische Modifikation von diesen Sequenzen,

wie beispielsweise 2'-O-Methylmodifikationen oder die Blockierung von Nukleinsäuren (Seok *et al.*, 2018). In dem Screen von Karlas und Kollegen wurden vier unabhängige siRNA pro Gen sowie Kontrollen, neben weiteren Ausleseverfahren (nachzulesen in Karlas *et al.*, 2010), für die Erstellung der Liste mit 287 Genkandidaten verwendet. Anschließend erfolgte eine weitere Untersuchung dieser siRNAs auf Zelltoxizität und die Erstellung von einer Liste mit 93 vielversprechenden Kandidaten, welche später die Grundlage für die Überexpressionszelllinien bildete. Für die Auswahl der Knockdownkandidaten wurden manche Gene durch zwei und manche durch vier unterschiedliche siRNAs abgedeckt und nach folgenden Kriterien bewertet: Prozentualer Anteil infizierter Zellen, Anzahl an infizierten Zellen und Re-Infektion. Gene, für die zwei von zwei bzw. drei von vier siRNAs einen Effekt zeigten, wurden als Hit gezählt. Diese Gene wurden anschließend verwendet, um die shRNA-Knockdownzelllinien zu erzeugen. Hierfür kamen mindestens zwei shRNAs zum Einsatz, wobei der Hauptfokus bei der Auswahl der Knockdownzelllinien auf der erzielten Knockdowneffizienz lag. Konnte kein Knockdown von $\geq 70\%$ erzielt werden, wurden weitere shRNA-Sequenzen getestet. Bei dem Vergleich der zwei shRNA-Sequenzen für C6orf1 konnten beispielsweise teilweise Überlappungen der Sequenzen beobachtet werden. Somit besteht die Gefahr von *off-target* Effekten bei den Knockdownzelllinien, welche durch die generierten Knockout-Zelllinien, die keine Effekte zeigten, untermauert wurden. Eine Eingrenzung einer möglichen miRNA-Funktionalität der verwendeten shRNA wäre mithilfe von *Microarray*-Analysen eventuell möglich gewesen, dies hätte jedoch den zeitlichen Rahmen dieser Arbeit weit überschritten. Aufgrund dessen wurden diese Kandidaten nicht weiter verfolgt und werden nicht weiter diskutiert. Als Kontrolle wurde eine Zelllinie erzeugt, welche eine *non-target* shRNA gegen das Luciferasegen exprimiert (siehe Abschnitt 4.3). Die Verwendung chemischer Modifikationen der shRNAs zur Verminderung von *off-target* Effekten war aufgrund der endogenen Expression der Sequenzen nicht möglich.

4.4.2 BESTIMMUNG DER SPEZIFISCHEN ZELLWACHSTUMSRATEN

Um sicherzustellen, dass beobachtete Veränderungen im Virustiter von den lentiviral transduzierten Zelllinien nicht durch eine unterschiedliche spezifische Zellwachstumsrate hervorgerufen werden, wurden diese für ausgewählte Zelllinien zwischen 24 und 96 Stunden nach Zellaussaat bestimmt. Die Tabelle 30 fasst die ermittelten spezifischen Zellwachstumsraten zusammen.

Tabelle 30: Ermittlung der mittleren spezifischen Zellwachstumsraten

Zelllinie	Mittlere spezifische Zellwachstumsrate
Parentale A549-Zelllinie	0,027 ± 0,003
Überexpressionszelllinien	
CEACAM6 high	0,027 ± 0,002
CEACAM6 low	0,025 ± 0,002
EEF1a1 high	0,026 ± 0,002
EEF1a1 pop	0,027 ± 0,003
EEF1a1 low	0,026 ± 0,001
KPNB1 pop	0,025 ± 0,002
NUP98 pop	0,024 ± 0,003
NXF1 pop	0,028 ± 0,006
PLD2 low	0,027 ± 0,001
XAB2 pop	0,028 ± 0,001
Kontrolle ÜE	0,029 ± 0,003
SIAT1 high	0,028 ± 0,001
SIAT1 pop	0,028 ± 0,001
SIAT1 low	0,025 ± 0,001
GFP/RFP pop	0,028 ± 0,002
Knockdownzelllinien	
Kontrolle KD	0,028 ± 0,005
C6orf1	0,026 ± 0,007
IFNAR1	0,026 ± 0,005
NECAP2	0,025 ± 0,006
PCGF3	0,030 ± 0,005
CASP8AP2	0,028 ± 0,005
GRAMD4	0,027 ± 0,004

Die Überprüfung der mittleren spezifischen Zellwachstumsraten ergab keine Unterschiede zwischen den lentiviral transduzierten Zelllinien und der parentalen A549-Zelllinie. Somit kann ausgeschlossen werden, dass die Unterschiede bei den erzielten Gesamtvirustitern durch stark abweichende Zellzahlen hervorgerufen wurden. Ein möglicher Einfluss auf die Zellvitalität und die zelluläre Funktion durch das Einbringen lentiviraler Vektoren *per se* konnte bisher nicht beobachtet werden. Sowohl Studien an natürlichen Killerzellen (Tran und Kung, 2007) als auch an humanen und murinen dendritischen Zellen (Dullaers *u. a.*, 2004) konnten zeigen, dass die lentivirale Transduktion der Zellen keinen Einfluss auf die Zellvitalität, den Phänotyp noch die zelluläre Funktion ausübt.

4.4.3 BEWERTUNG DER ZELLINIEN

Nach Abschluss des Virustiter-Screenings erfolgte ein Ranking der untersuchten Überexpressionszelllinien hinsichtlich ihrer mittleren Gesamtvirustiter zu 36 hpi, 42 hpi, 72 hpi und 96 hpi aus den Infektionsexperimenten mit Influenzavirus A/PR/8/34 und eine anschließende Auswahl vielversprechender Kandidaten. Hierfür wurde eine Steigerung des HA-Titers um $\geq 20\%$ mit dem Wert 1, $\geq 40\%$ mit dem Wert 2, $\geq 60\%$ mit dem Wert 3, $\geq 80\%$ mit dem Wert 4 und $\geq 100\%$ mit dem Wert 5 bewertet. Als Grundlage diente der mittlere Gesamtvirustiter der parentalen A549-Zelllinie. Der Zusammenhang zwischen der prozentualen Steigerung und den damit verbundenen Auswirkung auf den Gesamtvirustiter wird in der nachfolgenden Tabelle 31 veranschaulicht.

Tabelle 31: Auswirkung der prozentualen Steigerung auf den Gesamtvirustiter

Prozentuale Steigerung	Gemessener Gesamtvirustiter (log HAU/100 μL)
20 %	+ 0,079
40 %	+ 0,146
60 %	+ 0,204
80 %	+ 0,255
100 %	+ 0,301

Das finale Zellranking zeigt Tabelle 32.

Tabelle 32: Bewertung der Überexpressionszelllinien hinsichtlich ihrer Steigerung des Gesamtvirustiters

Zelllinien	Probenahmezeitpunkt			
	36 hpi	42 hpi	72 hpi	96 hpi
A549	0	0	0	0
Kontrolle ÜE	0	0	0	0
CEACAM6 high	0	0	0	0
CEACAM6 low	0	0	0	1
FANCG low	4	1	0	0
FLT4 pop	5	2	2	3
KCNJ12 high	0	0	0	0
KPNB1 pop	0	0	0	0
MAGI2 pop	0	0	0	1
NME3 pop	4	0	0	0
NME7 pop	0	1	1	0
NUP98 pop	0	0	0	2
NXF1 pop	3	1	0	0
PACSIN1 pop	5	4	2	3
PI4KB pop	5	2	2	2
PIN1 pop	3	0	0	0
PKLR pop	4	1	1	0
PLD2 low	1	0	0	0
ROR2 pop	5	5	4	1
SIAT1 high	0	0	0	2
SIAT1 pop	0	0	0	0
TSSK3 pop	5	2	2	0
XAB2 pop	2	0	0	0

(Rot) keine Veränderung der Gesamtvirustiter, (Grünstufen) Ausmaß der Steigerung des Gesamtvirustiters mit steigender Zahl

Die Bewertung der Gesamtvirustiter zeigte erneut, dass durch die Überexpression eines Gens meist nur der frühe Gesamtvirustiter gesteigert werden konnte (Werte > 0) und dieser Effekt nicht über einen längeren Zeitraum erhalten bleibt. Zwar konnte für die Zelllinien FLT4 pop, PACSIN1 pop, PI4KB pop und ROR2 pop bis zum Zeitpunkt 96 hpi eine Steigerung des finalen Gesamtvirustiters von $\geq 20\%$ detektiert werden, jedoch fällt diese prozentuale Erhöhung, verglichen zu den frühen Zeitpunkten, deutlich niedriger aus. Ein Grund hierfür könnte die Überexpression von jeweils nur einem Wirtszellfaktor sein. Es ist durchaus denkbar, dass weitere zelluläre Engstellen (*bottlenecks*) vorliegen, welche eine erhöhte Virusproduktion bis zu späten Infektionszeitpunkten (72 hpi, 96 hpi), trotz ausreichender Ressourcen an Viruspartikeln, limitieren. Eine mögliche Engstelle könnten die *lipid raft*-Domänen der Zellmembran bilden, welche eine essentielle Rolle bei der Virusfreisetzung spielen (Rossman

und Lamb, 2011). Des Weiteren führt die Infektion mit IAV zu einem sogenannten „*host shutoff*“, um eine bevorzugte Translation der viralen mRNAs gegenüber der zellulären Transkripte zu ermöglichen. Dieser „*host shutoff*“ führt u. a. zu einer Reduzierung der antiviralen Mechanismen, wodurch sich das Virus besser vermehren kann (Bercovich-Kinori u. a., 2016). Andererseits werden durch diesen Mechanismus auch zelluläre Wirtszellfaktoren reduziert, welche möglicherweise einen positiven Einfluss auf die Virusreplikation ausüben. Somit ist es ebenso denkbar, dass es, trotz der Genüberexpression dieser Wirtszellfaktoren, zu Engpässen bei der voranschreitenden Virusinfektion kommt.

Anhand der Bewertung aus Tabelle 32 wurden folgende Zelllinien als potentiell vielversprechend eingestuft (siehe Tabelle 33).

Tabelle 33: Liste der vielversprechenden Überexpressionszelllinien

FANCG low	NME3 pop	PI4KB pop	PLD2 low	XAB2 pop
FLT4 pop	NXF1 pop	PIN1 pop	ROR2 pop	
MAGI2 pop	PACSIN1 pop	PKLR pop	TSSK3 pop	

Aufgrund zeitlicher Unterschiede bei der Bereitstellung der Überexpressionszelllinien und der limitierten Projektlaufzeit erfolgte bereits zu einem frühen Zeitpunkt die Auswahl von Kandidaten, welche in Detailstudien weiter analysiert werden sollten. Daher konnten nur ausgewählte vielversprechende Kandidaten aus der Liste weiterverfolgt werden (FANCG low, NXF1 pop, XAB2 pop und PLD2 low). Zudem beinhalteten die Detailstudien die Zelllinie CEACAM6 high. Zum Zeitpunkt der Auswahl konnte auch für diese Zelllinie eine Steigerung des Gesamtvirustiters von $\geq 20\%$ zu 36 hpi und 42 hpi beobachtet werden. Der Grund für das abweichende Ergebnis zur finalen Bestimmung des Gesamtvirustiters besteht darin, dass zum Zeitpunkt der Auswahl der mittlere Gesamtvirustiter von der parentalen A549-Zelllinie etwas geringer ausfiel. Für die Herstellung von Kombinationszellen (siehe Abschnitt 4.4.5) konnten, neben den bereits genannten Genen, noch die Kandidaten ROR2, PI4KB, PACSIN1 und MAGI2 integriert werden. Für die Zelllinien FLT4 pop, NME3 pop, PIN1 pop, PKLR pop und TSSK3 pop konnten aufgrund des Endes der Projektlaufzeit keine weiteren Analysen erfolgen.

4.4.4 DETAILSTUDIEN DER VIELVERSPRECHENDEN ZELLINIEN

4.4.4.1 UNTERSUCHUNG DER INFEKTIOSEN VIRUSTITER NACH INFEKTION MIT INFLUENZAVIRUS A/PR/8/34

Neben der Bestimmung der Gesamtvirustiter erfolgte für die Zelllinien FANCG low, NXF1 pop, XAB2 pop, CEACAM6 high und PLD2 low die Untersuchung des infektiösen Virustiters zu 36 hpi und 42 hpi mithilfe des TCID₅₀-Assay. Diese Untersuchung diente zur Überprüfung, ob die teilweise erhöhten Gesamtvirustiter zu frühen Zeitpunkten auch im infektiösen Virustiter wiederzufinden sind. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in der Abbildung 30 dargestellt.

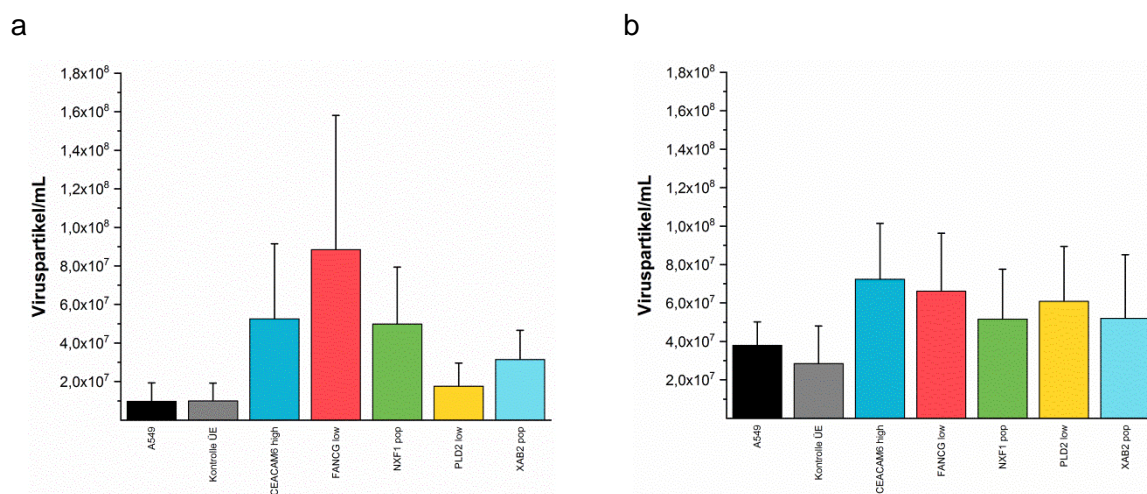


Abbildung 30: Infektiöser Virustiter der frühen Infektionsphase von Überexpressionszelllinien. Die Infektion erfolgte mit dem Influenzavirus A/PR/8/34 und einer von MOI 10⁻⁴. Die Probenahmen erfolgten zu 36 hpi (a) bzw. 42 hpi (b). Der infektiöse Virustiter wurde mit dem TCID₅₀-Assay bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei biologischen Replikaten sowie die dazugehörigen Standardabweichungen (Fehlerbalken). schwarz: parentale A549-Zelllinie, dunkelgrau: Transduktionskontrolle „Kontrolle UE“. Die statistische Auswertung der Beobachtungen erfolgte zwischen den Überexpressionszelllinien und der parentalen A549-Zelllinie mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests (*, p ≤ 0,05; kein Stern p > 0,05).

Trotz der recht großen Schwankungen der erzielten infektiösen Virustiter konnte die Stimulation der Replikation durch einzelne Genüberexpressionen zu frühen Infektionszeitpunkten bestätigt werden. Vor allem zu 36 hpi zeigten die Zelllinien CEACAM6 high, FANCG low und NXF1 pop erhöhte infektiöse Virustiter. Die Ergebnisse der 42 hpi-Probenahmen bestätigten jedoch erneut, dass die beobachteten positiven Effekte auf den infektiösen Virustiter nicht über einen längeren Zeitraum in diesem Ausmaß erhalten bleiben.

4.4.4.2 INFEKTION MIT INFLUENZAVIRUS A/PR/8/34 MIT EINER MOI VON 1

Wie bereits im Verlauf dieser Arbeit deutlich wurde, unterliegen die ermittelten Virustiter teilweise sehr starken Schwankungen, welche u. a. durch stochastische Fluktuationen hervorgerufen werden können (siehe Abschnitt 4.4.1.4). Eine Möglichkeit diesen Fluktuationen entgegen zu wirken ist die Verwendung einer höheren MOI. Um zu überprüfen, ob die positiven Auswirkungen auf den frühen Gesamtvirustiter auch unter Bedingungen mit geringeren stochastischen Fluktuationen reproduzierbar sind, erfolgten Infektions-experimente mit dem Influenzavirus A/PR/8/34 und einer MOI von 1. Die erhöhte Virusstartmenge erforderte jedoch die Anpassung der Probenahmezeitpunkte, um weiterhin die frühe Phase der Virusproduktion abzudecken. Dazu erfolgten Vorversuche (Daten nicht gezeigt) und die anschließende Auswahl der Zeitpunkte 20 hpi und 28 hpi. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 31 dargestellt.

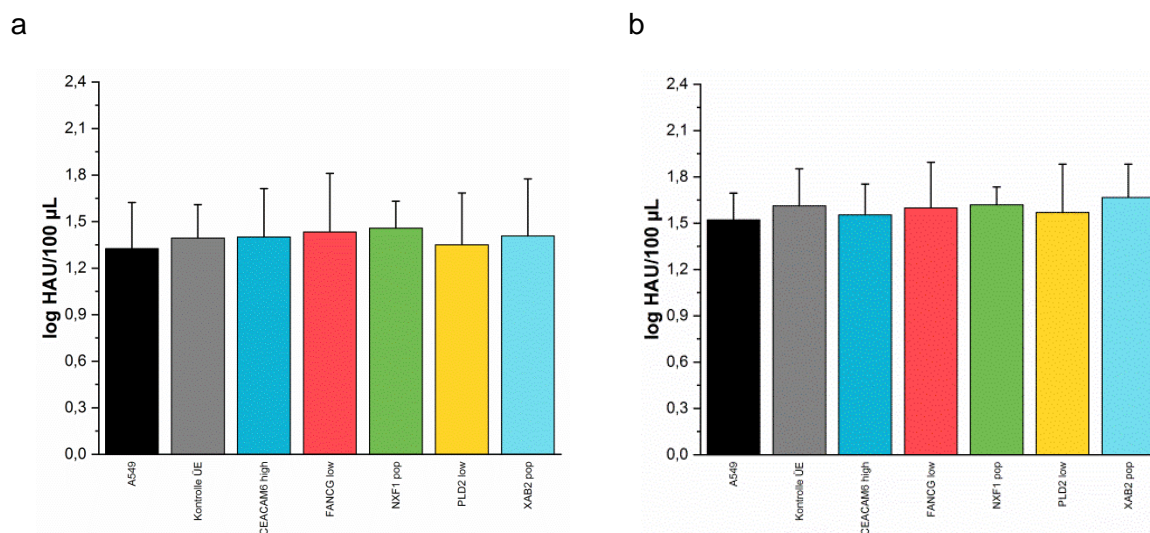


Abbildung 31: Gesamtvirustiter bei einer Infektion mit Influenzavirus A/PR/8/34 und einer MOI von 1. Die Probenahme erfolgten zu (a) 20 hpi bzw. (b) 28 hpi und die Bestimmung des Gesamtvirustiters mittels des HA-Assays. Dargestellt sind der Mittelwert aus mindestens drei biologischen Replikaten sowie die Standardabweichung. schwarz: parentale A549-Zelllinie, dunkelgrau: Transduktionskontrolle „Kontrolle UE“. Die statistische Auswertung der Beobachtungen erfolgte zwischen den Überexpressionszelllinien und der parentalen A549-Zelllinie mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests (*, $p \leq 0,05$; kein Stern $p > 0,05$).

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass unter Einsatz einer höheren Virusstartmenge der positive Einfluss auf die frühe Virusreplikation lediglich sehr gering (20 hpi) ausfällt bis nicht vorhanden (28 hpi) ist. Dies zeigt deutlich, dass die Überexpression der gewählten Genkandidaten nur einen schwachen Effekt auf die Virusreplikation ausübt. Durch die Verwendung einer höheren Virusmenge zum Start der Infektion, können mehr Zellen gleichzeitig infiziert werden, wodurch es zu einer schnelleren Ausbreitung der Viren innerhalb der Zellpopulation kommt. Somit spielen kleinere Effekte wie beispielsweise eine etwas effizientere Virusreplikation oder Freisetzung für die Ausbreitung der Infektion innerhalb der

Zellpopulation keine größere Rolle. Ein ähnliches Phänomen konnte bei den Studien zum Einfluss der antiviralen Immunantwort auf die Influenzavirus-Infektion in A549-Zellen beobachtet werden (siehe Abschnitt 4.2.2, Abbildung 15c). Trotz der erfolgreichen Aktivierung der antiviralen Immunantwort und der anfänglichen Unterdrückung der Virusreplikation kam es zu einem Anstieg des Gesamtvirustiters nach 48 h. Dies zeigt, dass dieser Influenzavirus-Stamm mithilfe seiner eigenen viralen Antagonisten in der Lage war, die zelluläre Immunabwehr zu „überrennen“. Ebenso könnten weitere zelluläre Schlüsselfaktoren innerhalb der Zelle der Grund für die schwachen Effekte sein, welche in Kombination mit anderen Schlüsselfaktoren in ihrer Genexpression beeinflusst werden müssten. Aufgrund dessen erfolgte im Abschnitt 4.4.5 die Kombination verschiedener vielversprechender Genkandidaten. Ein weiterer Grund könnte eine starke Heterogenität der lentiviral transduzierten Zellpopulationen sein. Um diese Heterogenität der GOI-Expression zu minimieren, erfolgte in dem nachfolgenden Abschnitt 4.4.4.3 die Herstellung von Einzelzell-basierten Zellpopulationen.

4.4.4.3 ANALYSE DER VIRUSVERMEHRUNG IN EINZELZELL-BASIERTEN ZELLPOPULATIONEN

Da lentivirale Vektoren keine positionsspezifische Integration im Genom unter *in vitro* Bedingungen erlauben (Bushman *u. a.*, 2005), ist die GOI-Expressionsstärke stark abhängig von der transkriptionellen Aktivität des Integrationslokus. Da in dieser Arbeit Zellpopulationen verwendet wurden, welche aus einem Zellpool nach der Transduktion hervorgingen, weisen diese Zelllinien eine starke Heterogenität der GOI-Expression innerhalb der Zellpopulation auf.

Um zunächst einen Überblick über die bestehende Heterogenität der GOI-Expression innerhalb der Zellpopulationen zu erlangen, erfolgten Untersuchungen der GFP-Expression (gekoppelt an GOI Expression) mittels Durchflusszytometrie (siehe Abbildung 32).

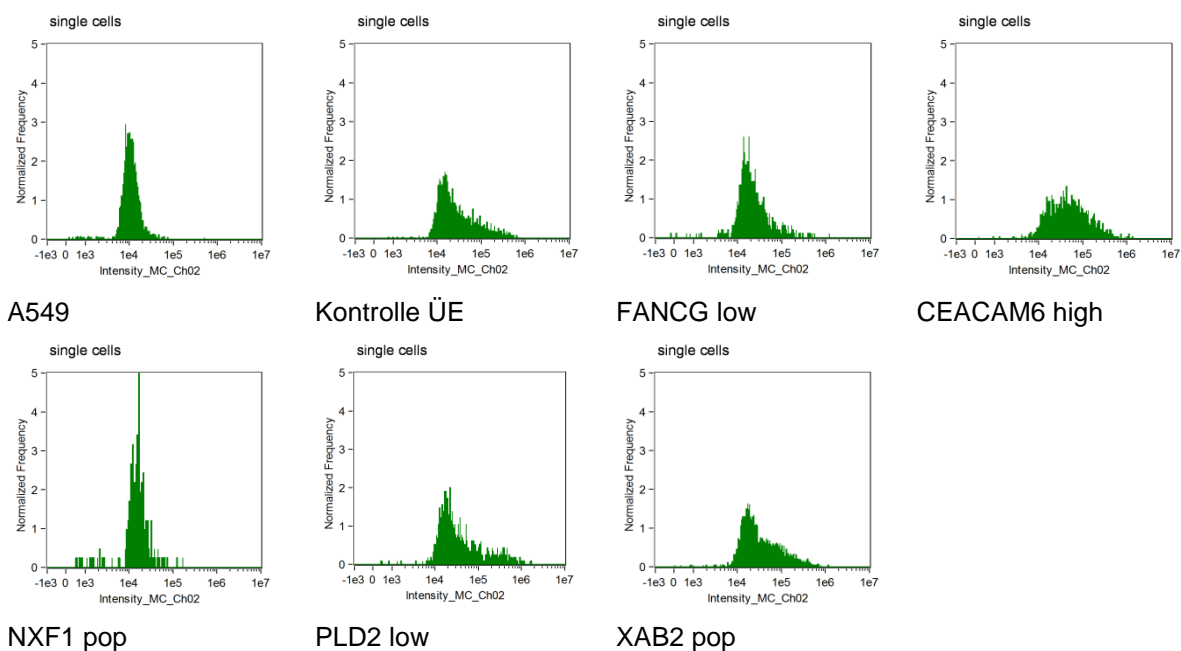


Abbildung 32: GFP-Messung ausgewählter Überexpressionszelllinien mittels Durchflusszytometrie. Populationen der Überexpressionszelllinien wurden geerntet und mit 2 %-igem PFA fixiert. Im Anschluss erfolgte die Messung des GFP-Signals mithilfe des *ImageStream® Mark II* und unter Verwendung der *IDEAS* Software. Dargestellt ist das Ergebnis einer Einzelmessung.

Die Zellpopulationen wiesen eine breite Verteilung der Fluoreszenzintensität auf. Diese kann u. a. durch die bereits angesprochene heterogene GOI-Expression in der Zellpopulation hervorgerufen werden. Um die Variabilität innerhalb der Population zu verringern erfolgte daher eine klonale Expansion von Einzelzellen (Durchführung siehe 3.4.2, im Weiteren als Einzelzell-basierte Zellpopulation bezeichnet). Nach dem Erzeugen der Einzelzell-basierten Zellpopulationen von NXF1, CEACAM6, PLD2 und XAB2 wurde zunächst die mittlere GFP-Fluoreszenzintensität bestimmt. Für die Einzelzell-basierten Zellpopulation mit FANCG-Überexpression konnte dies aufgrund des Projektendes nicht mehr erfolgen. Die ermittelten Fluoreszenzintensitäten (*mean fluorescent intensity*, MFI) wurden anschließend ins Verhältnis zu der Hintergrundfluoreszenz von A549-Zellen gesetzt. Die ermittelten Verhältnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 34 zusammengefasst.

Tabelle 34: GFP-Expression in den Einzelzell-basierten Zellpopulationen

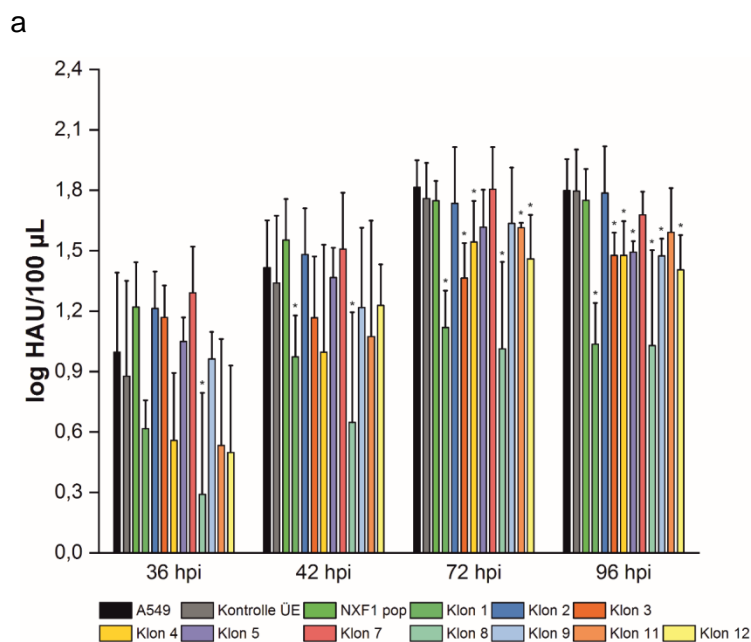
Zelllinie	Relative GFP-Expression (x-fach)
NXF1 pop	1,2
Einzelzell-basierte Zellpopulation mit NXF1-Überexpression	
Klon 1	1,7
Klon 2	1,0
Klon 3	1,0
Klon 4	0,8

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION – EXPERIMENTELLE CHARAKTERISIERUNG DER ERZEUGTEN ZELLINIEN

Zelllinie	Relative GFP-Expression (x-fach)
Klon 5	1,0
Klon 6	1,2
Klon 7	1,1
Klon 8	0,9
Klon 9	1,1
Klon 10	1,2
CEACAM6 high	5,7
Einzelzell-basierte Zellpopulation mit CEACAM6-Überexpression	
Klon 1	8,6
Klon 2	3,2
Klon 3	6,6
Klon 4	2,1
Klon 5	3,7
Klon 6	1,9
Klon 7	2,3
Klon 8	3,5
Klon 9	21,6
Klon 10	2,1
PLD2 low	8,6
Einzelzell-basierte Zellpopulation mit PLD2-Überexpression	
Klon 1	38,9
Klon 2	1,5
Klon 3	2,3
Klon 4	8,7
Klon 5	4,5
Klon 6	3,9
Klon 7	3,2
Klon 8	4,1
Klon 9	5,0
XAB2 pop	6,5
Einzelzell-basierte Zellpopulation mit XAB2-Überexpression	
Klon 1	1,4
Klon 2	1,3
Klon 3	3,5
Klon 4	4,5
Klon 5	22,5

Zelllinie	Relative GFP-Expression (x-fach)
Klon 6	1,5
Klon 7	1,3
Klon 8	1,6

Durch die klonale Expansion von Einzelzellen konnten Populationen erzeugt werden, welche im Vergleich zu der Ausgangspopulation im Mittel einen höheren bzw. niedrigeren GFP-Fluoreszenzwert aufwiesen (siehe Tabelle 34). Aufgrund der gekoppelten Expression kann somit angenommen werden, dass die erzeugten Einzelzell-basierten Zellpopulationen auch Unterschiede in ihrer GOI-Expressionsstärke besitzen. Im nächsten Schritt sollte daher untersucht werden, ob eine höhere GOI-Expression mit erhöhten Virustitern korreliert. Dafür erfolgten Infektionen mit dem Influenzavirus A/PR/8/34 und einer MOI von 10^{-4} wie im Abschnitt 4.4.1.1 erläutert. Als Probenahmezeitpunkte dienten 36 hpi und 42 hpi für die frühe Virusreplikation sowie 72 hpi und 96 hpi für die Bestimmung der finalen Gesamtvirustiter. Die Ergebnisse sind in Abbildung 34a (NXF1 und CEACAM6) und Abbildung 34b (PLD2 und Kontrolle ÜE) dargestellt.



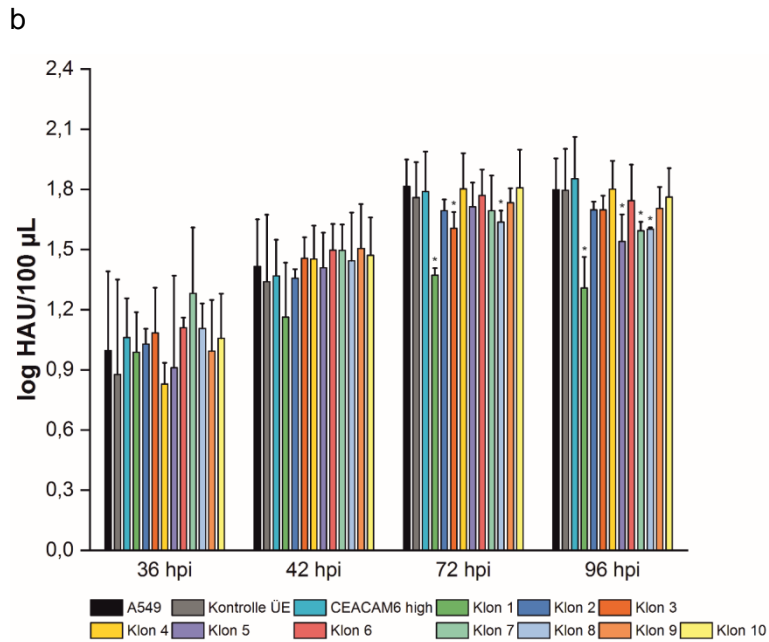
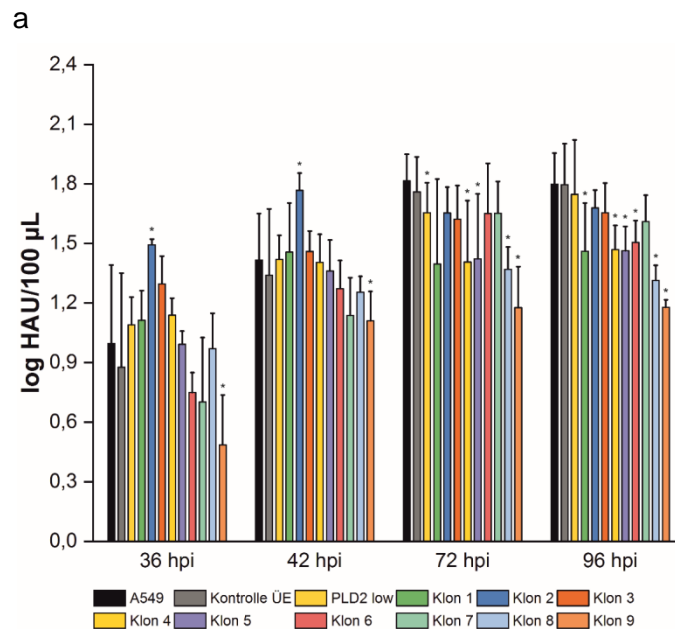


Abbildung 33: Gesamtvirustiter der frühen und späten Infektionsphase der erzeugten Einzelzellbasierten Zellpopulationen. Die Infektion der Zelllinien erfolgte mit dem Influenzavirus A/PR/8/34 und einer von $MOI 10^{-4}$. Mithilfe des HA-Assays wurden zu 36 hpi, 42 hpi, 72 hpi und 96 hpi die Gesamtvirustiter bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei biologischen Replikaten sowie die dazugehörigen Standardabweichungen (Fehlerbalken) der Ausgangspopulationen sowie der dazugehörigen Einzelzellbasierten Zellpopulationen für die (a) NXF1- und (b) CEACAM6-Genüberexpression. schwarz: parentale A549-Zelllinie, dunkelgrau: Transduktionskontrolle „Kontrolle UE“. Die statistische Auswertung der Beobachtungen erfolgte zwischen den Überexpressionszelllinien und der parentalen A549-Zelllinie mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests (*, $p \leq 0,05$; kein Stern $p > 0,05$).



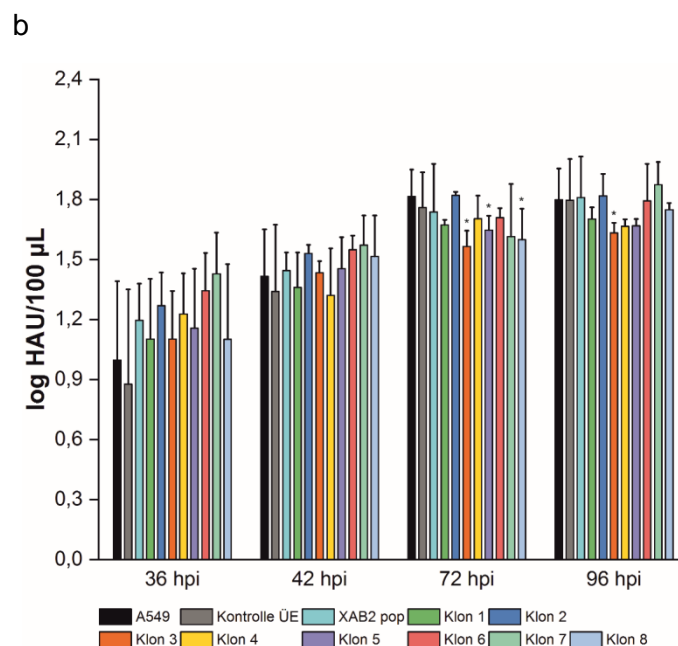


Abbildung 34: Gesamtvirustiter der frühen und späten Infektionsphase der erzeugten Einzelzell-basierten Zellpopulationen. Die Infektion der Zelllinien erfolgte mit dem Influenzavirus A/PR/8/34 und einer von $MOI\ 10^{-4}$. Mithilfe des HA-Assays wurden zu 36 hpi, 42 hpi, 72 hpi und 96 hpi die Gesamtvirustiter bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei biologischen Replikaten sowie die dazugehörigen Standardabweichungen (Fehlerbalken) der Ausgangspopulationen sowie der dazugehörigen Einzelzell-basierten Zellpopulationen für die (a) PLD2- und (b) XAB2-Genüberexpression. schwarz: parentale A549-Zelllinie, dunkelgrau: Transduktionskontrolle „Kontrolle ÜE“. Die statistische Auswertung der Beobachtungen erfolgte zwischen den Überexpressionszelllinien und der parentalen A549-Zelllinie mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests (*, $p \leq 0,05$; kein Stern $p > 0,05$).

Betrachtet man das GFP-Fluoreszenzsignal (Korrelation zur GOI-Expression) ausgewählter Klone so wird deutlich, dass dieses nicht mit den erzielten Gesamtvirustitern korreliert. Beispielsweise weist die Einzelzell-basierte Zellpopulation PLD2-Klon 1 (siehe Abbildung 34c) eine deutlich höhere GFP-Fluoreszenz zur Ausgangspopulation auf, jedoch geht diese nicht mit einer Steigerung der Gesamtvirustiter einher.

Im Gegenzug zeigt die Einzelzell-basierte Zellpopulation von PLD2-Klon 2 eine geringere GFP-Fluoreszenz als die Ausgangspopulation, erzielte jedoch höhere Gesamtvirustiter. Ein ähnliches Bild zeichnet sich für die Einzelzell-basierten Zellpopulationen CEACAM6-Klon 6 und Klon 9 (siehe Abbildung 34b) sowie XAB2-Klon 2 und Klon 5 (siehe Abbildung 34d) ab. Anstelle einer Korrelation der GOI-Expression mit einer Steigerung der Virusproduktion scheint ein eher gegensätzlicher Effekt vorzuliegen. Zudem wurde im Rahmen der Masterarbeit von Melanie Dostert beispielhaft die PLD2- bzw. NXF1-Genexpression in den PLD2- und NXF1-Einzelzell-basierten Zellpopulationen mittels *real-time* PCR bestimmt (Dostert, 2016). Diese Messungen bestätigten die Korrelation zwischen der GOI- und der GFP-Expression.

Anhand dieser Experimente konnte gezeigt werden, dass eine erfolgreiche Überexpression einzelner fördernder Faktoren nicht ausreichend für eine deutliche Veränderung zellulärer Mechanismen ist. Häufig wird die Genüberexpression dazu genutzt, um bestimmte Proteine anzureichern und anschließend Rückschlüsse auf zelluläre Funktionen zu ermöglichen. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass eine anormale Proteinexpression auch zu negativen Effekten führen kann. Dabei stellt vor allem die Überladung der zellulären Ressourcen ein Problem dar, welche beispielsweise für die korrekte Translation sowie die Faltung, Lokalisation, Modifikation und Degradation von Proteinen verantwortlich sind. Bei einer Überladung dieses Systems kommt es häufig zu Effekten auf das Zellwachstum (Moriya, 2015). Trotz der Verwendung des EF1a-Promotors, welcher eine relativ starke Genüberexpression ermöglicht (Qin *u. a.*, 2010), konnten im Rahmen der Untersuchungen der spezifischen Zellwachstumsraten keine negativen Einflüsse beobachtet werden (siehe 4.4.2). Dennoch ist hierbei zu bedenken, dass die spezifischen Zellwachstumsraten ohne zusätzliche Virusinfektion stattfanden. Ein negativer Effekt der Genüberexpression auf den zellulären Zustand unter zusätzlichen Stressbedingungen, wie beispielsweise während einer Virusinfektion, kann nicht ausgeschlossen werden. Des Weiteren erfolgte die Bestimmung der spezifischen Zellwachstumsraten anhand der Pool-basierten Zellpopulationen und nicht mit den Einzelzell-basierten Zellpopulationen. Ein weiteres Problem bei der Genüberexpression besteht in einem stöchiometrischen Ungleichgewicht von Proteinkomponenten z. B. innerhalb größerer Proteinkomplexe und Membrandomänen. Unter Normalbedingungen sind die Proteinexpression und -degradation innerhalb einer Zelle soweit optimiert, dass die einzelnen Proteinkomponenten in ihren funktionalen Bereichen im Gleichgewicht vorliegen. Wird jedoch beispielsweise nur eine Komponente in einem Komplex überexprimiert, herrscht ein stöchiometrisches Ungleichgewicht. Je nach Funktionalität des betroffenen Proteins kann dies zu zytotoxischen Effekten und zu Defekten in der Zelle führen. Des Weiteren kann eine Proteinüberexpression je nach Ausmaß und zellulärer Funktion auch zelluläre Signalwege stören (Moriya, 2015). Der beobachtete gegenläufige Effekt könnte somit einen Hinweis darauf geben, dass durch die starke Überexpression die oben genannten Probleme eine Rolle spielen und deswegen mitunter zu einem niedrigeren Virustiter führen. Durch eine gezielte Kombination von Genüberexpressionen könnte möglicherweise ein stöchiometrisches Ungleichgewicht oder die Überladungen einzelner Prozesse ausgeglichen werden. Daher wurden im Anschluss Kombinations-Überexpressionszelllinien generiert (siehe Abschnitt 4.4.5).

4.4.5 ANALYSE DER VIRUSVERMEHRUNG IN KOMBINATIONS-ÜBEREXPRESSIONSZELLINIEN

Ein weiterer Ansatz die Virusausbeute zu steigern beruhte auf der Kombination vielversprechender Genkandidaten. Dafür wurden die Überexpressionszelllinien NXF1 pop, XAB2 pop, PLD2 low, FANCG low, CEACAM6 high und PACSIN1 pop verwendet und erneut am HZI Braunschweig mit ausgewählten lentiviralen Vektoren transduziert (siehe Abbildung 35).

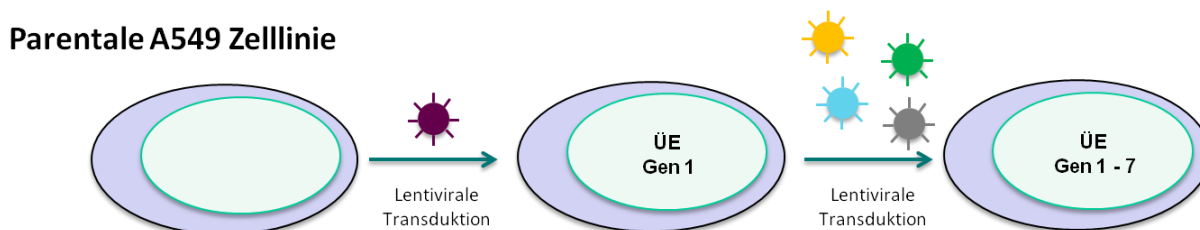


Abbildung 35: Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Erzeugung der Kombinations-Überexpressionszelllinien. ÜE: Überexpression. Gen 1-7: NXF1 pop, XAB2 pop, PLD2 low, FANCG low, CEACAM6 high, PACSIN1 pop, PI4KB pop, MAGI2, ROR2.

In der nachfolgenden Tabelle 35 sind die erzeugten Kombinations-Überexpressionszelllinien aufgelistet.

Tabelle 35: Liste der generierten Kombinations-Überexpressionszelllinien

Kombinations-Überexpressionszelllinie	Enthaltene Gene
NXF1 Kombi 1	NXF1 pop + CEACAM6 + PLD2 + XAB2 + FANCG
NXF1 Kombi 2	NXF1 Kombi 1 + PACSIN1 + PI4KB
XAB2 Kombi 1	XAB2 pop + PLD2 + FANCG
XAB2 Kombi 2	XAB2 Kombi 1 + PACSIN1 + PI4KB
CEACAM6 Kombi 1	CEACAM6 high + XAB2 + FANCG + PLD2 + NXF1
FANCG Kombi 1	FANCG low + XAB2 + CEACAM6 + PLD2 + NXF1
PACSIN1 Kombi 1	PACSIN1 pop + PI4KB
PACSIN1 Kombi 2	PACSIN1 pop + PI4KB + MAGI2 + ROR2

Um sicherzustellen, dass die gewünschten Gene auch überexprimiert werden, wurde die GOI-Expression von den Kombinations-Überexpressionszelllinien mittels *real-time* PCR untersucht. Als Berechnungsgrundlage für die Bestimmung der Verhältnisse diente die parentale A549-Zelllinie. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in der nachfolgenden Tabelle 36 zusammengefasst.

Tabelle 36: Bestimmung der GOI-Genexpression in den Kombinations-Überexpressionszelllinien

	NXF1	PLD2	XAB2	FANCG	CEACAM6	PACSIN1	PI4KB	MAGI2	ROR2
NXF1 Kombi 1	2,2	2,5	3,9	19,7	24,6	-	-	-	-
NXF1 Kombi 2	1,4	1,4	3,2	25,8	12,6	125,1	5,8	-	-
XAB2 Kombi 1	-	4,3	11,2	15,1	-	-	-	-	-
XAB2 Kombi 2	-	3,8	8,6	10,5	-	216,2	4,5	-	-
CEACAM6 Kombi 1	1,6	1,2	1,5	10,4	12,4	-	-	-	-
FANCG Kombi 1	2,6	1,3	7,2	1,4	57,3	-	-	-	-
PACSIN1 Kombi 1	-	-	-	-	-	139,7	3,4	-	-
PACSIN1 Kombi 2	-	-	-	-	-	159,1	4,2	7,1	209,9

Referenzgen: 18S RNA

Die Analyse der GOI-Expression ergab eine breite Variabilität bei den erzielten Überexpressionsstärken. Für einige Gene konnte lediglich eine Steigerung der Expression von 20 % bis 60 % erreicht werden wohingegen andere um das 10 bis 200-fache zum Ausgangsniveau gesteigert werden konnten. Hierbei handelte es sich erneut um Pool-basierte Zellpopulationen, welche theoretisch unterschiedliche Genkombinationen innerhalb der einzelnen Zellen aufweisen konnten. Zudem kann aufgrund der Verwendung der gleichen lentiviralen Vektoren mit dem gleichen Selektionsmarker nicht garantiert werden, dass alle transduzierten Genkonstrukte in die Zelle integriert wurden. Diese Genexpressions-Daten liefern somit nur einen Mischwert der untersuchten Populationen. Dennoch kann beobachtet werden, dass manche Gene stärker als andere in den untersuchten Kombinationszelllinien überexprimiert werden können. Dies könnte mit einer möglichen Toxizität einiger Genüberexpressionen (siehe 4.4.4.3) im Zusammenhang stehen. Die niedrige FANCG-Expression in der FANCG Kombi 1-Zelllinie könnte auch mit der Sortierung der Ausgangszelllinie auf Niedrig-Expriemierer (FANCG low) zusammenhängen.

Im Anschluss wurden diese Kombinations-Überexpressionszelllinien mit dem Influenzavirus A/PR/8/34 unter Verwendung einer MOI von 10^{-4} wie im Abschnitt 4.4.1.1 beschrieben infiziert.

Die Probenahmen erfolgten zu 42 hpi und 96 hpi. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Abbildung 36 dargestellt.

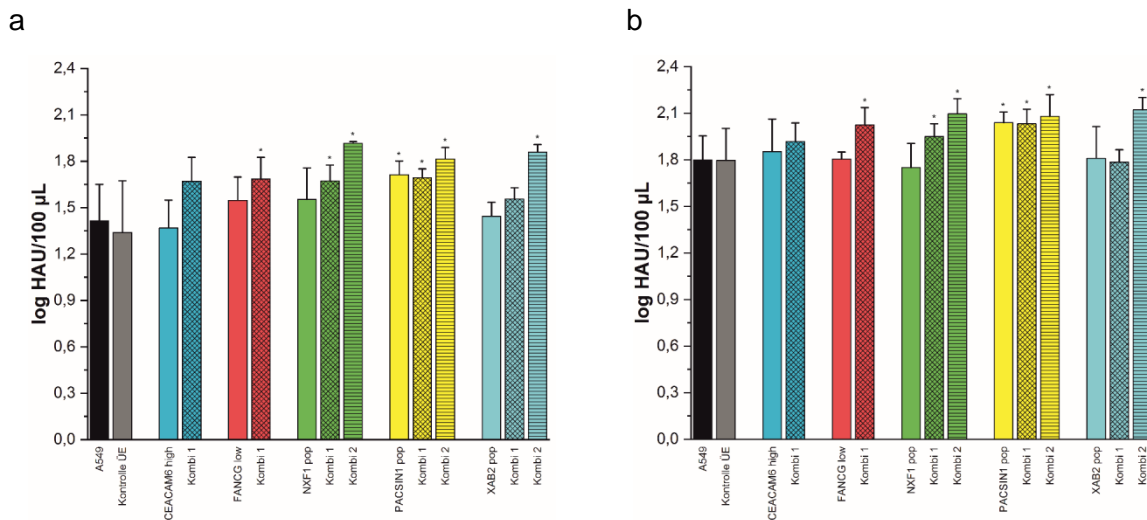


Abbildung 36: Gesamtvirustiter der frühen und späten Infektionsphase der generierten Kombinations-Überexpressionszelllinien. Die Infektion der Einzelgen- und Kombinations-Überexpressionszelllinien erfolgte mit dem Influenzavirus A/PR/8/34 und einer MOI von 10^{-4} . Mithilfe des HA-Assays wurden zu 42 hpi (a) und 96 hpi (b) die Gesamtvirustiter bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei biologischen Replikaten sowie die dazugehörigen Standardabweichungen (Fehlerbalken). schwarz: parentale A549-Zelllinie, dunkelgrau: Transduktionskontrolle „Kontrolle UE“. Die statistische Auswertung der Beobachtungen erfolgte zwischen den Überexpressionszelllinien und der parentalen A549-Zelllinie mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests (*, $p \leq 0,05$; kein Stern $p > 0,05$).

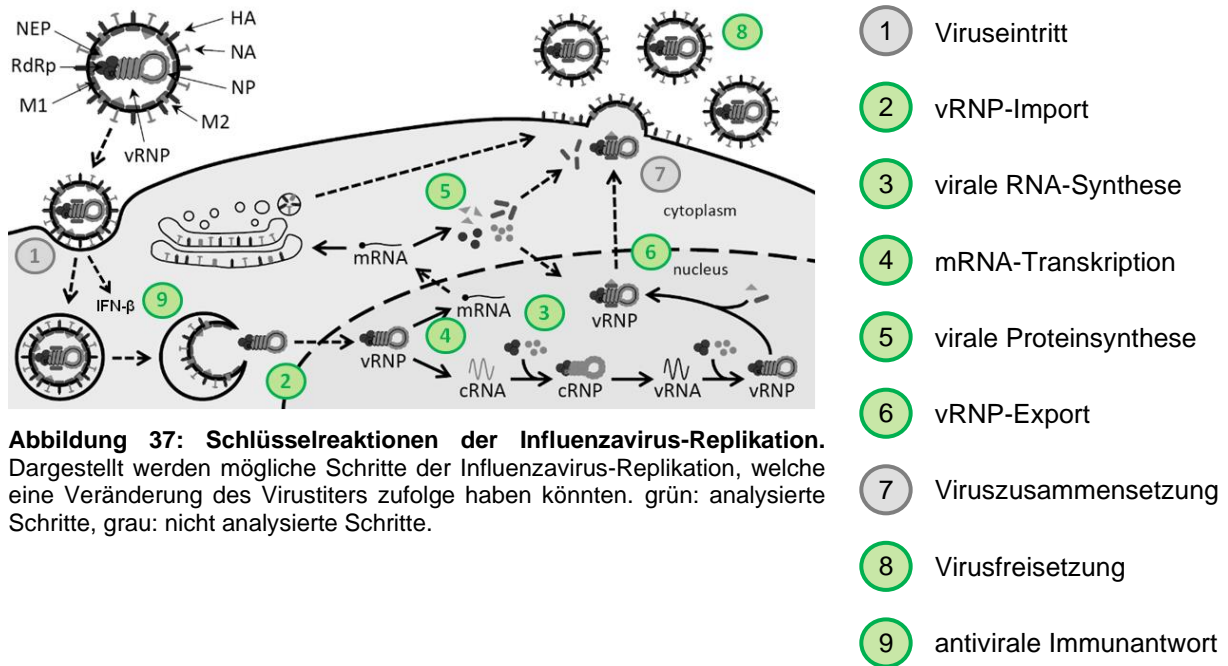
Durch die kombinierte Expression vielversprechender Genkandidaten konnte der frühe Gesamtvirustiter (42 hpi) im Vergleich zu den Einzelgen-Überexpressionszelllinien weiter gesteigert werden. Ebenfalls zeigten die Kombinationszelllinien XAB2 pop Kombi 2, NXF1 pop Kombi 1 und Kombi 2 sowie FANCG low Kombi 1 einen leicht signifikant erhöhten Gesamtvirustiter verglichen zu den Kontrollen und den Einzelgen-Überexpressionszelllinien. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass durch gezielte Veränderungen der Genexpression mehrerer Genkandidaten der Gesamtvirustiter positiv beeinflusst werden kann. Ob es sich bei den untersuchten Kombinationen um einen universellen oder einen Influenzavirus-Stamm- bzw. Spezies-/Zelltyp-spezifischen Effekt handelt, konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht geklärt werden und erfordert weitere Forschungsarbeiten.

Mehrere Studien der letzten Jahre konnten bereits eine Vielzahl an Wirtzellfaktoren identifizieren, welche die Influenzavirus-Vermehrung in verschiedenen Modellorganismen und Zellsystemen beeinflussen. Ein aktueller Review von Villalón-Letelier und Kollegen fasst beispielsweise mehrere dieser Faktoren zusammen, weist jedoch deutlich darauf hin, dass die Wirksamkeit der einzelnen Faktoren sowohl stark von der jeweiligen Spezies als auch von dem Zelltyp abhängig ist (Villalón-Letelier *u. a.*, 2017). Eine Arbeit von Yi und Kollegen

befasste sich beispielsweise mit dem Einfluss von BST-2 auf die Influenzavirus-Vermehrung. BST-2 ist ein Typ-II Transmembranprotein, welches die Freisetzung der viralen Vesikel von umhüllten Viren inhibiert und durch Typ-I-IFNs induziert wird. Im Rahmen dieser Studie konnte durch den Knockout dieses Proteins die Freisetzung viraler Partikel in das Zellkulturmedium um mindestens das 2-fache bis 50-fache, verglichen mit dem jeweiligen Wildtyp, gesteigert werden. Dieser positive Effekt konnte für verschiedene Wirtszellsysteme und unterschiedliche Virusfamilien gezeigt werden (Yi *u. a.*, 2017). Dennoch steht der beobachtete positive Effekt auf die Influenzavirus-Vermehrung in MDCK-Zellen im Widerspruch zu den Ergebnissen einer Studie von Watanabe und Kollegen aus dem Jahr 2011. Neben einem leicht abweichenden Versuchsansatz, wurden in der Studie von Watanabe auch andere Influenzasaatviren verwendet, was einen möglichen Erklärungsansatz bietet (Watanabe, Leser und Lamb, 2011). Zudem unterstützt eine Studie von Gnirß und Kollegen diese Theorie, welche ebenfalls Unterschiede bei der Sensitivität verschiedener Influenzavirus-Stämme gegenüber BST-2 beschreibt (Gnirß *u. a.*, 2015). Neben BST-2 konnten auch die Wirtszellfaktoren *Nuclear factor 90* (NF90) (Wang *u. a.*, 2009), SIAT1 (Matrosovich *u. a.*, 2003), FANCG (Tafforeau *u. a.*, 2011) und IFNAR1 (Carvajal-Yepes *u. a.*, 2015) identifiziert werden, welche in den gewählten Zellsystemen in Kombination mit dem verwendeten Influenzavirus-Stamm zu einer höheren Expression von viralen Komponenten oder zu einer Steigerung des Virustiters führten. Bisher konnte jedoch noch kein universeller Schlüsselfaktor identifiziert werden, welcher Spezies- und Virusstamm-übergreifend zu einer gesteigerten Virusproduktion führt. Eine strategische Kombination ausgewählter Genkandidaten erscheint daher als vielversprechendste Methode, um durch additive oder synergetische Effekte der einzelnen Gene hoch-permissive und vielfältige Produktionszelllinien zu erzeugen (Yi *u. a.*, 2017).

4.4.6 MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN DER VIELVERSPRECHENDEN ZELLINIEN

Um gezielte molekularbiologische Untersuchungen durchzuführen zu können, erfolge zunächst eine Definition von Schritten, welche ausschlaggebend für die Limitierung der Virusausbeute sein könnten. Eine Übersicht dieser Schritte ist in Abbildung 37 dargestellt. Die grün markierten Schritte konnten mithilfe bestehender bzw. neu etablierter Methoden untersucht werden. Für die grau markierten Schritte (Viruseintritt und Viruszusammensetzung) konnten im Rahmen des Projektes leider keine Analysemethoden etabliert werden.



In dem nachfolgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Untersuchungen zum vRNP-Import und -Export, der viralen RNA-Synthese und der viralen Proteinsynthese dargestellt. Die Ergebnisse zur Virusfreisetzung sind im Abschnitt 4.4.1 beschrieben.

4.4.6.1 UNTERSUCHUNG DES vRNP-IMPORTS

Aufgrund der komplexen Proteininteraktionen während des vRNP-Imports (nachzulesen im Abschnitt 2.1.3) ist es denkbar, dass durch eine erhöhte Bereitstellung einer oder mehrerer beteiligter Komponenten der vRNP-Import optimiert werden kann. Dies wiederum könnte zu einem früheren Start der viralen Transkription und Replikation führen oder die vRNP-Menge innerhalb des Zellkerns erhöhen, wodurch mehr Ausgangsmaterial für die Virusreplikation und Virusverpackung zur Verfügung steht. Um zu untersuchen, ob die Überexpression der ausgewählten Kandidaten einen Einfluss auf den beschriebenen Transportmechanismus besitzt, wurden die Überexpressionszelllinien mit Influenzavirus A/PR/8/34 und einer MOI von 50 infiziert. Der Einsatz dieser hohen MOI war notwendig, um eine synchrone Infektion der Zellpopulation sicherzustellen. Um eine gezielte Analyse der Effekte auf die primäre Transkription zu ermöglichen, erfolgte die Zugabe von CHX vor und während der Infektion (Beschreibung der Funktionalität von CHX siehe Abschnitt 3.5.6.1). Für die Probenahmen wurden folgende Zeitpunkte nach der Infektion gewählt: 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 und 120 min (Bereich des linearen Anstiegs des vRNP-Fluoreszenzsignals [FI/min]). Nach den Probenahmen wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und anschließend mithilfe eines spezifischen vRNP-Antikörpers markiert. Die Bestimmung der vRNP-Importrate erfolgte anhand der prozentualen Verteilung des Fluoreszenzsignals innerhalb des Zellkerns im

Vergleich zur Fluoreszenzintensität der Gesamtzelle. Detaillierte Angaben zur Durchführung sind unter Abschnitt 3.5.6 aufgeführt. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in der nachfolgenden Abbildung 38 dargestellt.

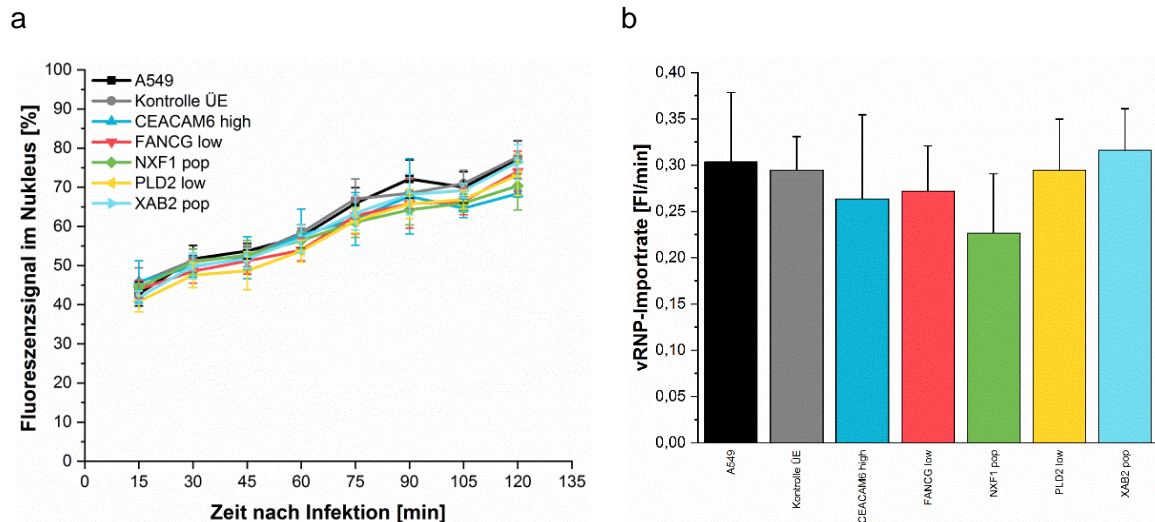


Abbildung 38: Untersuchung der vRNP-Importrate in Überexpressionszelllinien. Überexpressionszelllinien wurden mit CHX (100 µg/mL) für 30 min behandelt und anschließend mit Influenzavirus A/PR/8/34 und einer MOI von 50 sowie unter weiterer Verwendung von CHX infiziert. Die Probenahmen erfolgten 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 und 120 min nach Infektion. Für die Bestimmung der prozentualen Verteilung des Fluoreszenzsignals wurden ein vRNP-spezifischer NP-Antikörper sowie DAPI für die Kernfärbung verwendet. Die Analysen erfolgten mittels bildgebender Durchflusszytometrie. (a) prozentualer Anstieg des Fluoreszenzsignals im Zellkern, (b) vRNP-Importraten [FI/min] der untersuchten Überexpressionszelllinien. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei biologischen Replikaten sowie die dazugehörigen Standardabweichungen (Fehlerbalken). schwarz: parentale A549-Zelllinie, dunkelgrau: Transduktionskontrolle „Kontrolle ÜE“. Die statistische Auswertung der Beobachtungen erfolgte zwischen den Überexpressionszelllinien und der parentalen A549-Zelllinie mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests (*, $p \leq 0,05$; kein Stern $p > 0,05$).

Alle untersuchten Zelllinien weisen zunächst einen ähnlichen Verlauf bei der Zunahme des Fluoreszenzsignals im Zellkern auf (siehe Abbildung 38a). Bei der Berechnung der vRNP-Importraten (siehe Abbildung 38b) wird jedoch ein Unterschied zwischen der Überexpressionszelllinie NXF1 pop im Vergleich zu den Kontrollen deutlich. Für die Kontrollen wurde eine mittlere vRNP-Importrate von ca. 0,3 FI/min berechnet, wohingegen die Überexpressionszelllinie NXF1 pop eine mittlere Importgeschwindigkeit von 0,23 FI/min aufweist. Aufgrund der großen Standardabweichung sind diese Ergebnisse jedoch nicht signifikant und somit nur als Trend zu betrachten.

4.4.6.2 UNTERSUCHUNG DES vRNP-EXPORTS

Ebenso wie beim vRNP-Import spielen auch beim vRNP-Export eine Vielzahl an Proteinen eine entscheidende Rolle für eine erfolgreiche Influenzavirus-Replikation (siehe Abschnitt 2.1.3). Da hierbei ebenfalls viele Proteine zusammenwirken ist es durchaus denkbar, dass durch die Überexpression einer bzw. einzelner Komponente(n) die Effizienz dieses

Transportmechanismus gesteigert werden kann und somit mehr vRNPs für die Verpackung in neue Viruspartikel im Zytoplasma zur Verfügung stehen. Für die Untersuchung des vRNP-Exports wurden die Überexpressionszelllinien mit Influenzavirus A/PR/8/34 und einer MOI von 50 infiziert. Die Probenahmen erfolgten 180, 210, 240 und 270 min nach Infektion. Die Exportrate wurde anhand der Zeitpunkte 210, 240 und 270 min nach Infektion berechnet, da in diesem Zeitraum ein nahezu linearer Abfall der Fluoreszenzintensität im Zellkern stattfindet. Die Details zur Experimentdurchführung sind im Abschnitt 3.5.6.2 zu finden. Die erlangten Ergebnisse werden in Abbildung 39 dargestellt.

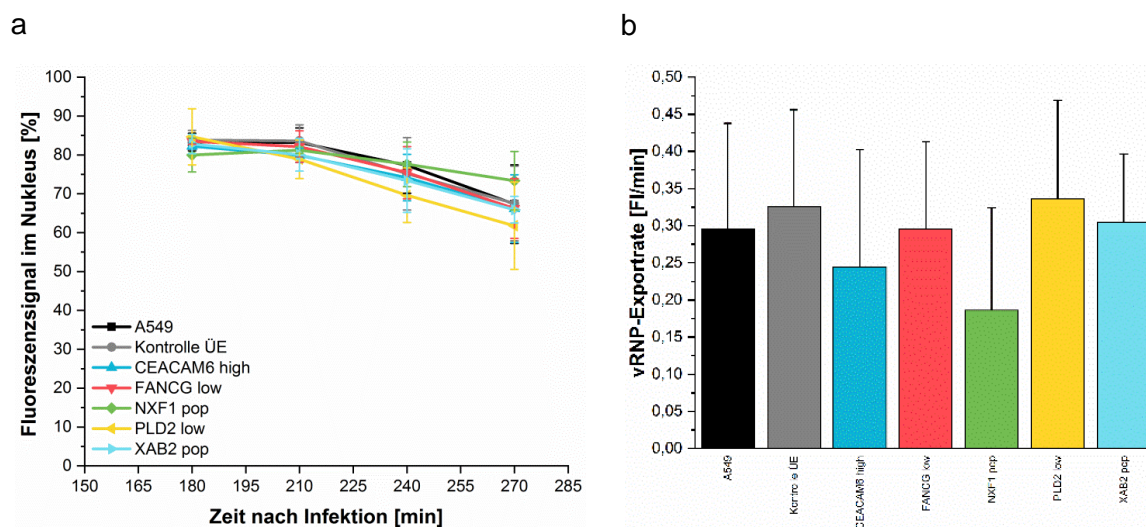


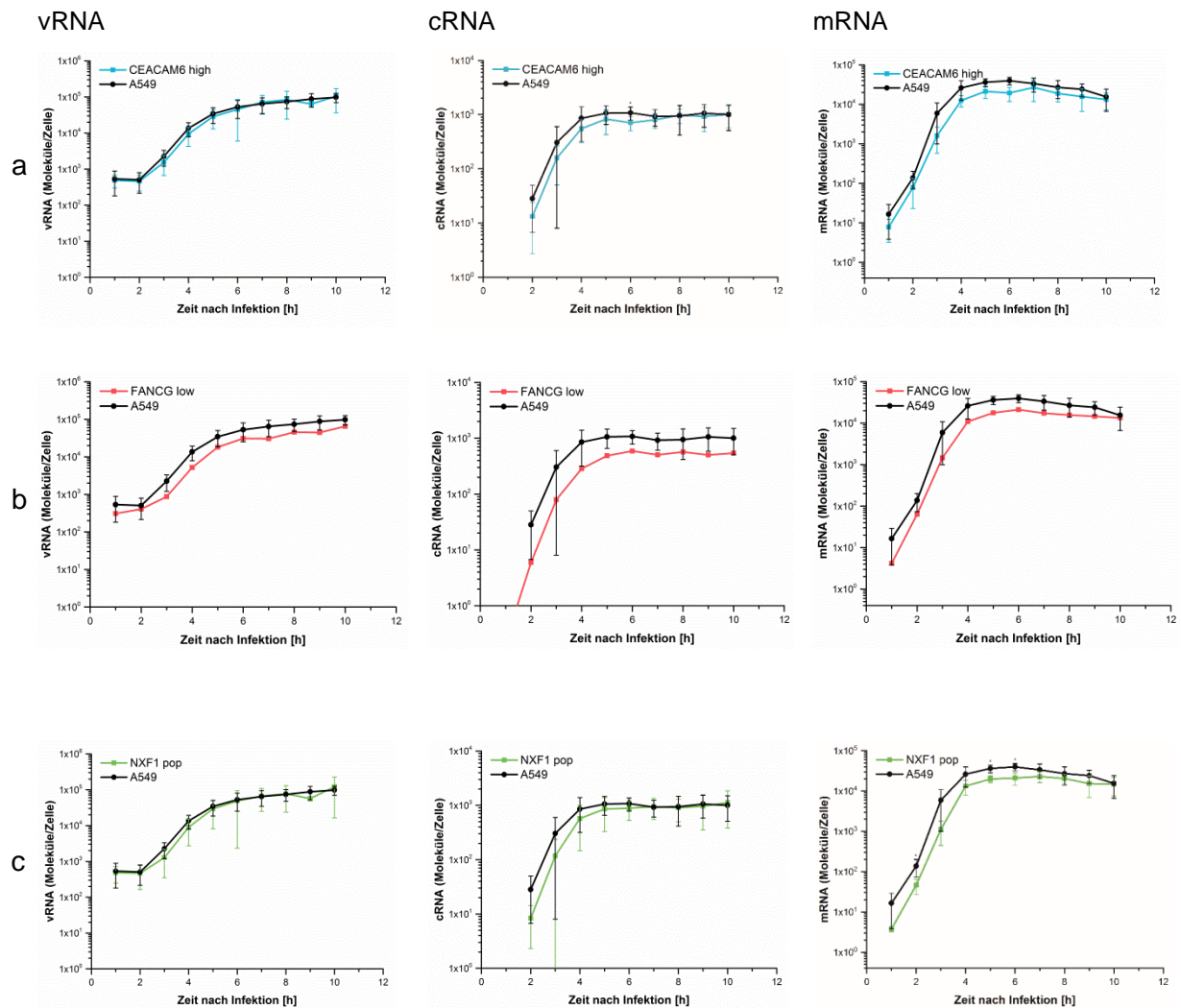
Abbildung 39: Untersuchung der vRNP-Exportrate in Überexpressionszelllinien. Überexpressionszelllinien wurden mit Influenzavirus A/PR/8/34 und einer MOI von 50 infiziert. Die Probenahmen erfolgten 180, 210, 240 und 270 min nach Infektion. Für die Bestimmung der prozentualen Verteilung des Fluoreszenzsignals wurden ein vRNP-spezifischer NP-Antikörper sowie DAPI für die Kernfärbung verwendet. Die Analysen erfolgten mittels bildgebender Durchflusszytometrie. (a) prozentualer Abfall des Fluoreszenzsignals im Zellkern, (b) vRNP-Exportraten der untersuchten Überexpressionszelllinien (Berechnung anhand der Zeitpunkte 210, 240 und 270 min nach Infektion). Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei biologischen Replikaten sowie die dazugehörigen Standardabweichungen (Fehlerbalken). schwarz: parentale A549-Zelllinie, dunkelgrau: Transduktionskontrolle „Kontrolle UE“. Die statistische Auswertung der Beobachtungen erfolgte zwischen den Überexpressionszelllinien und der parentalen A549-Zelllinie mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests (*, $p \leq 0,05$; kein Stern $p > 0,05$).

Die Analyse des prozentualen Fluoreszenzsignals im Zellkern zeigt, dass bis zum Zeitpunkt 210 min nach Infektion nur bei der Überexpressionszelllinie PLD2 low eine leichte Verschiebung der Verhältnisse des Fluoreszenzsignals zwischen Zellkern und Zytoplasma zu verzeichnen war (siehe Abbildung 39a). Möglicherweise beginnt diese Zelllinie eher mit dem vRNP-Export als die Kontrollen. Des weiteren konnte beobachtet werden, dass die Überexpressionszelllinie NXF1 pop eine langsamere Verhältnisverschiebung zeigt (siehe Abbildung 39a). Die sich anschließenden Berechnungen der vRNP-Exportraten ergaben für die Zelllinie NXF1 pop eine Exportrate von 0,19 FI/min. Diese ist im Vergleich zu den A549-Zellen mit 0,3 FI/min deutlich langsamer. Für die Zelllinie PLD2 low konnte eine geringfügig gesteigerte Exportrate von 0,34 FI/min bestimmt werden (siehe Abbildung 39b). Beide

Ergebnisse stehen somit im Einklang mit dem jeweiligen Verlauf des Fluoreszenzsignals im Zellkern.

4.4.6.3 UNTERSUCHUNG DER VIRALEN RNA-SYNTHESE

Im nächsten Schritt erfolgte die detaillierte Analyse der viralen RNA-Synthese. Hierfür erfolgten erneut Infektionen mit dem Influenzavirus A/PR/8/34 unter Hoch-MOI Bedingungen (MOI 50) sowie stündliche Probenahmen über einen Zeitraum von 1 bis 10 Stunden. Als Kontrolle dienten Mock-infizierte Proben, welche zum Zeitpunkt 10 hpi genommen wurden. Die Bestimmung der Molekülanzahl pro Zelle erfolgte exemplarisch durch die absolute Quantifizierung der vRNA, cRNA und mRNA für das Segment 5 der Überexpressionszelllinien CEACAM6 high, FANCG low, NXF1 pop, PLD2 low, XAB2 pop sowie der parentalen A549-Zelllinie und der Transduktionskontrolle mittels *real-time* PCR (siehe Abbildung 40).



4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION – EXPERIMENTELLE CHARAKTERISIERUNG DER ERZEUGTEN ZELLINIEN

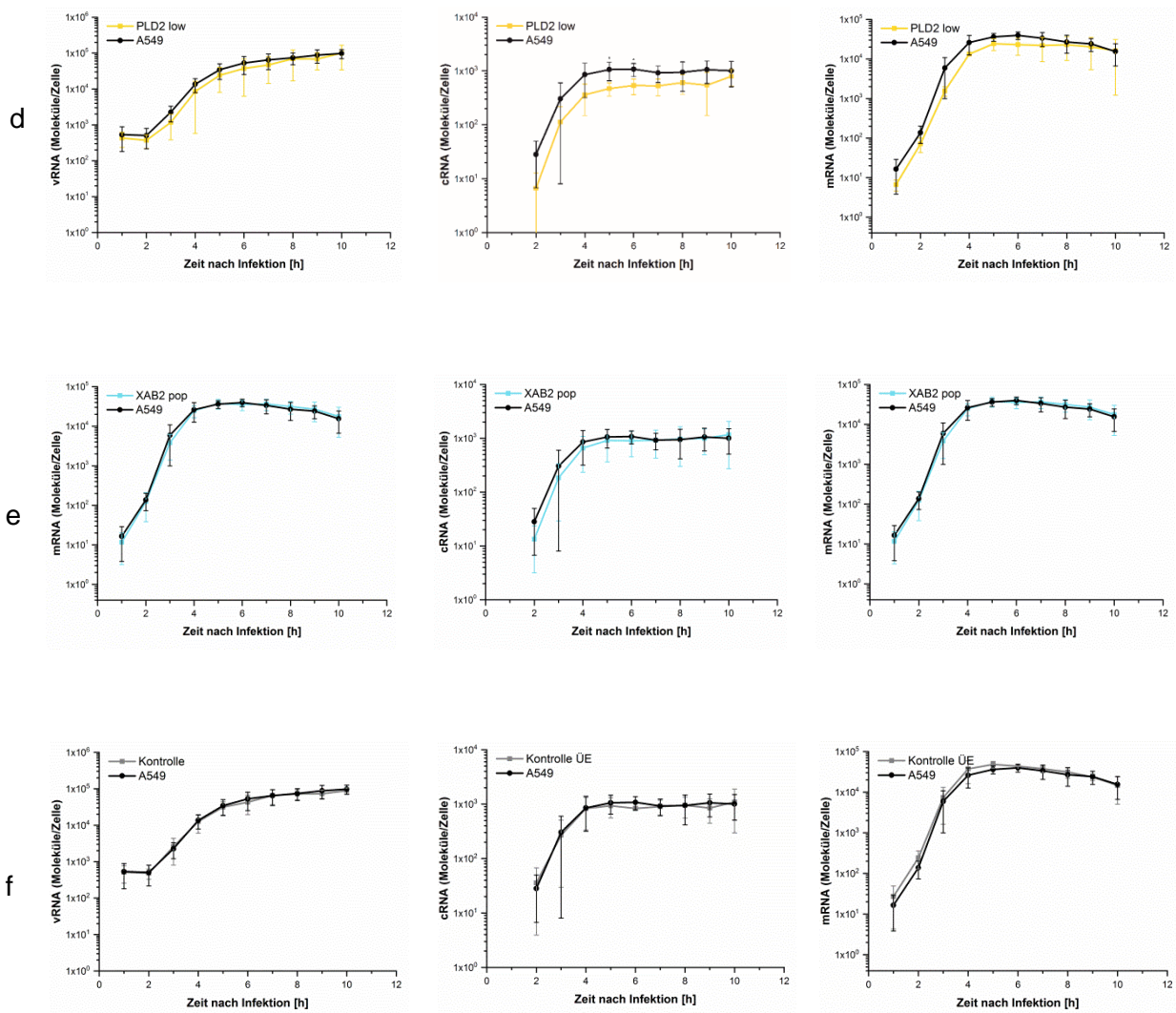


Abbildung 40: Untersuchung der viralen RNA-Synthese. Die Infektion der Überexpressionszelllinien (a-e), der Transduktionskontrolle (f) sowie der parentalen A549-Zelllinie (a-f) erfolgte mit dem Influenzavirus A/PR/8/34 und mit einer MOI von 50. Nach der Infektion erfolgten stündliche Probenahmen in einem Zeitraum von 1 bis 10 hpi. Als Kontrolle dienten Mock-infizierte Proben. Die Bestimmung der Molekülanzahl pro Zelle erfolgte durch die absolute Quantifizierung der vRNA, cRNA und mRNA exemplarisch für das Segment 5 mittels quantitativer reverse Transkription (qRevT) *real-time* PCR. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten (FANCG low – Mittelwert aus zwei biologische Replikaten) sowie die dazugehörigen Standardabweichungen (Fehlerbalken). Die statistische Auswertung der Beobachtungen erfolgte zwischen den Überexpressionszelllinien und der parentalen A549-Zelllinie mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests (*, $p \leq 0,05$; kein Stern $p > 0,05$).

Bei der vRNA-Syntheserate zeigte die Überexpressionszelllinie FANCG low einen Unterschied zur A549-Zelllinie. Dabei ist jedoch zu beachten, dass dieser Messung nur zwei biologische Replikate zugrunde liegen. Aus Zeitmangel konnte eine dritte Messung im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgen. In der zweiten Spalte sind die Ergebnisse der cRNA-Synthese dargestellt. Hierbei konnte für die Zelllinien CEACAM6 high und NXF1 pop innerhalb der ersten Stunden eine geringere Menge an cRNA Molekülen pro Zelle im Vergleich zu den A549-Zellen detektiert werden. Nach rund sieben Stunden erreichte die Molekülanzahl vergleichbare Level. Im Falle der Zelllinien FANCG low und PLD2 low blieb die verminderte

Molekülanzahl pro Zelle jedoch über den gesamten beobachteten Zeitraum erhalten. Auch bei der mRNA-Synthese konnten deutlich geringere Molekülanzahlen über einen Großteil des beobachteten Zeitraums für die Überexpressionszelllinien CEACAM6 high, FANCG low, NXF1 pop und PLD2 low beobachtet werden. Erst nach rund 10 h wurde das Level der A549-Zellen erreicht. Interessanterweise weist die Zelllinie XAB2 pop keinerlei Unterschiede bei der RNA-Synthese zu den A549-Zellen auf. Mithilfe der Transduktionskontrolle konnte zudem ausgeschlossen werden, dass die Integration der lentiviralen Konstrukte einen Einfluss auf die v-, c- und mRNA-Synthese hat.

4.4.6.4 UNTERSUCHUNG DER VIRALEN PA-, M1- UND NP-PROTEINEXPRESSION

Weitere Untersuchungen befassten sich mit Proteinexpressionsanalysen der viralen Proteine PA, NP und M1. Hierfür wurden die Zellen mit dem Influenzavirus A/PR/8/34 und einer MOI von 50 infiziert und Proteinproben zu 6 und 8 hpi genommen. Angaben zur Durchführung können dem Abschnitt 0 entnommen werden. Die Durchführung der quantitativen Bestimmung der Proteinlevel erfolgte mithilfe des Programms ImageJ unter Verwendung der im Abschnitt 3.5.5.4 beschriebenen Auswertungsmethode. In Abbildung 41 sind die Ergebnisse für die Zelllinien CEACAM6 high und FANCG low dargestellt. Aufgrund des Projektendes konnten für die anderen Zelllinien keine drei biologischen Replikate angefertigt werden. Auf die Darstellung von Ergebnissen aus Einzelexperimenten bzw. zwei biologischen Replikaten wurde aufgrund der beobachteten großen Schwankungen verzichtet. Für die Auswertung wurde die Proteinexpression der A549-Zellen auf 100 % gesetzt.

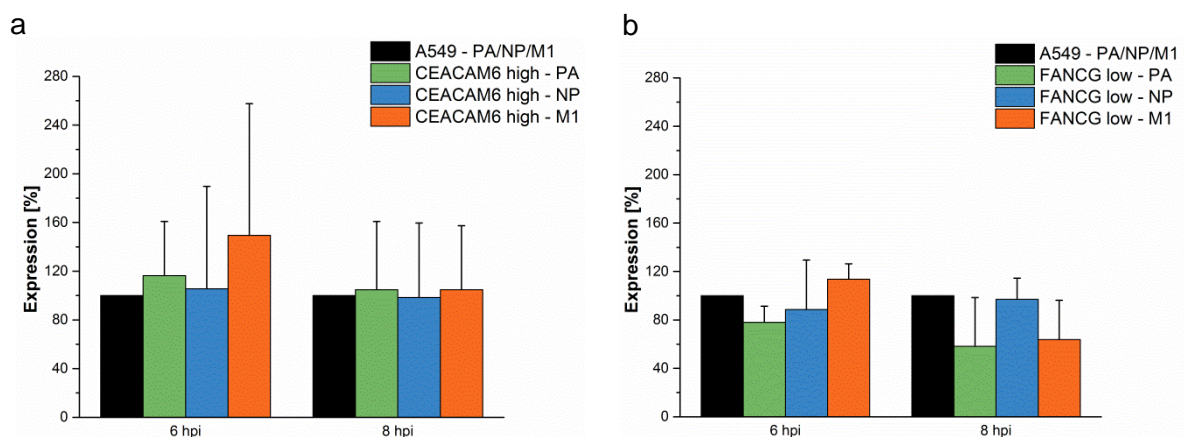


Abbildung 41: Virale Proteinexpression in den Überexpressionszelllinien CEACAM6 high und FANCG low. Die Infektion der Zellen erfolgte mit dem Influenzavirus A/PR/8/34 und mit einer MOI von 50. Nach der Infektion erfolgten Probenahmen zu (a) 6 hpi und (b) 8 hpi. Als Kontrolle diente die parentale A549-Zelllinie. Die Analyse der Proteinproben erfolgte mittels SDS-PAGE, Western Blot-Transfer und anschließender Immunodetektion der viralen Proteine PA, NP und M1. Als Ladekontrolle kam GAPDH zum Einsatz. Für die Quantifizierung der Western Blot-Banden wurde das Programm ImageJ verwendet und die erzielten Ergebnisse

zu der A549-Zelllinie normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten sowie die dazugehörigen Standardabweichungen (Fehlerbalken).

Die Untersuchung der viralen M1-, PA- und NP-Proteinexpression in den Zelllinien CEACAM6 high und FANCG low zeigte keine deutlichen Unterschiede im Vergleich zu der parentalen A549-Zelllinie auf. Mögliche geringfügige Unterschiede sind jedoch aufgrund der starken Schwankungen innerhalb der biologischen Replikate schwer zu identifizieren. Unter Betrachtung der Einzelexperiment-Ergebnisse konnte ebenfalls kein eindeutiger Trend beobachtet werden. Generell ist jedoch zu bemerken, dass sich die Versuchsdurchführung als relativ schwierig herausstellte (z. B. Auswahl eines geeigneten Referenzproteins, Detektion und Quantifizierung mehrerer Proteine nacheinander) und somit experimentell bedingte Schwankungen nicht komplett ausgeschlossen werden können. Da jedoch innerhalb der Einzelexperimente auch keine Unterschiede bei den untersuchten Überexpressionszelllinien beobachtet werden konnten, liegt dem positiven Einfluss der Überexpression von CEACAM6 und FANCG wahrscheinlich kein oder nur ein sehr gering verändertes Proteinlevel an PA, NP und M1 zugrunde.

Mathematische Modellierung der erzielten Daten

Im Anschluss an diese Arbeit wurden die erzielten Daten mithilfe eines mathematischen Modells der IAV-Replikation analysiert und in einer aktuellen Studie von Laske und Kollegen veröffentlicht (Laske *u. a.*, 2019). Dem verwendeten mathematischen Modell liegt die Annahme zugrunde, dass die Veränderung der Expression eines Wirtszellfaktors einen direkten Einfluss auf die kinetischen Parameter der Virusreplikation besitzt. Durch Parameterauslenkungen können somit Unterschiede bei der Virusfreisetzung analysiert und Schlüsselreaktionen identifiziert werden. Bei diesen Analysen stellte sich heraus, dass sowohl eine signifikante Steigerung des Virustiters als auch eine frühere Freisetzung von Viruspartikeln durch eine gesteigerte Transkription (Erhöhung der viralen mRNA-Synthese) oder Translation ermöglicht werden kann. Des weiteren gibt dieses Modell Hinweise darauf, dass bestimmte Schritte der Virusreplikation, wie beispielsweise die NP-Binderate an die nackte virale RNA sowie die vRNA- und cRNA-Synthese, herunterreguliert werden müssen, um höhere zellspezifische Virustiter zu erzielen. Das weist darauf hin, dass die virale RNA-Synthese bereits gesättigt bzw. die Syntheserate zu hoch ist. Eine Steigerung des Virustiters ist somit vielmehr durch die zur Verfügung stehen viralen Proteine limitiert als durch eine zu niedrige RNA-Syntheserate. Des weiteren führt, laut dem Modell, eine Steigerung der nukleären vRNP-Importrate nur zu einem früheren Beginn der Virusfreisetzung. Eine alleinige Hochregulation der nukleären vRNP-Exportrate scheint keinen Einfluss auf den finalen Gesamtvirustiter zu haben.

Aufgrund der bestehenden Datenlage, dass die frühe Replikationsphase durch einige Genkandidaten beeinflusst werden konnte (siehe Abschnitt 4.4.1.3 und Abschnitt 4.4.1.4), erfolgten weiterführende experimentelle Untersuchungen der Virusreplikationsdynamik auf intrazellulärem Level (siehe Abschnitt 4.4.6.1, 4.4.6.2 und 4.4.6.3). Dabei konnte u. a. beobachtet werden, dass, im Gegensatz zu den Vorhersagen des Modells, eine Verringerung der nukleären vRNP-Importrate sowie eine geringere mRNA-Syntheserate bei den Überexpressionszelllinien CEACAM6 high und NXF1 pop mit der Detektion höherer Virustiter zu frühen Zeitpunkten der Infektion korrelierten. So erzielte die Zelllinie NXF1 pop die höchsten frühen Gesamtvirustiter verglichen zu den Einzelgen-Überexpressionszelllinien CEACAM6 high, XAB2 pop, PLD2 low, FANCG low sowie den Kontrollzelllinien. Eine Steigerung des Virustiters ist somit nur durch eine erhöhte Virusfreisetzungsrates zu begründen (Laske *u. a.*, 2019). Hinweise hierauf gibt eine Studie von Larsen und Kollegen aus dem Jahr 2014, in der gezeigt werden konnte, dass eine Inhibition von NXF1 in A549-Zellen den nukleären Export der viralen mRNAs für NP, HA und NA stört (Larsen *u. a.*, 2014). Es ist daher denkbar, dass durch eine Überexpression von NXF1 die genannten viralen Proteinen früher zur Verfügung stehen wodurch mehr Viren in dem untersuchten Zeitraum verpackt und freigesetzt werden können.

Ein ähnlicher Kompensationseffekt ist auch für die CEACAM6 high-Überexpressionszelllinie möglich, da auch für diese eine niedrigere vRNP-Importrate sowie geringere mRNA-Level detektiert wurden. Zwar konnte bisher noch kein direkter Einfluss von CEACAM6 auf die Virusreplikation beobachtet werden, jedoch zeigte eine Studie von Gaur und Kollegen, dass durch die Interaktion des viralen NA-Proteins mit CEACAM6 das Überleben der Wirtszelle gefördert wird. Diese Interaktion führt zu einer Aktivierung des Scr/Akt-Signalweges, welcher das Überleben der Zelle, die Proliferation, die Migration, Differenzierung sowie die Apoptose beeinflusst (Gaur *u. a.*, 2012). Die Auswirkungen einer CEACAM6-Überexpression wurden in einer Studie von Duxbury und Kollegen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte Expression von CEACAM6 zu einer Resistenz gegenüber der Anoikis, einer Form der Apoptose, welche in normalen Zellen durch einen Verlust des Zell-Matrix-Kontaktes induziert wird, führt (Duxbury *u. a.*, 2004). Zudem führte der von Gaur und Kollegen durchgeführte siRNA-vermittelte Knockdown von CEACAM6 zu einer verminderten Aktivierung des Scr/Akt-Signalweges, einer gesteigerten Apoptose sowie zu einer verringerten Expression der viralen Proteine und geringeren Virustitern in Influenzavirus-infizierten A549- und NHBE-Zellen (Gaur *u. a.*, 2012). Es ist daher möglich, dass durch eine CEACAM6-Überexpression das Überleben der Wirtszelle während der Infektion verlängert wird, die niedrigen mRNA-Level und die verringerte vRNP-Importrate kompensiert werden und es zu einer Steigerung der Virustiter kommt. Dennoch konnte durch die Überexpression dieses

Faktors der Gesamtvirustiter nur minimal nach 36 hpi bei den Influenzavirus A/PR/8/34- und nach 60 hpi bei den Influenzavirus A/WSN/33-Infektionsversuchen gesteigert werden. Ein Grund hierfür könnte die kontinuierliche Überexpression von CEACAM6 sein. Mehrere Studien befassten sich bereits mit der Fragestellung, ob die Aktivierung der Apoptose ein positiver oder negativer Faktor für die Influenzavirus-Replikation ist. Die Aktivierung der Apoptose durch verschiedene Initiator- und Effektor-Caspasen spielt eine entscheidende Rolle bei der Eindämmung von Influenzavirus-Infektionen durch die Eliminierung infizierter Zellen aus dem Körper (Iwai, Shiozaki und Miyazaki, 2013). Andererseits zeigte eine Studie von Wurzer und Kollegen, dass der Knockdown von Caspase 3, ein Haupteffektor der virusinduzierten Apoptose, die Influenzavirus-Replikation stark limitiert (Wurzer *u. a.*, 2003). Diese gegensätzlichen Einflüsse der Apoptoseinduktion deuten darauf hin, dass der Aktivierungszeitpunkt eine entscheidende Rolle spielt. Eine solche Regulation wäre nur durch ein induzierbares System möglich gewesen. Möglicherweise reguliert CEACAM6 auch weitere Faktoren. Für CEACAM1, ein weiteres Mitglied der CEACAM-Proteinfamilie, konnte beispielsweise eine antivirale Wirkung nachgewiesen werden (Vitenshtein *u. a.*, 2016).

Basierend auf den Modellanalysen von Laske und Kollegen besaß die Überexpression von FANCG im Falle einer gesteigerten mRNA-Synthese das größte Potential für eine Virustitersteigerung. Die Aussage des Modells basiert dabei auf den Erkenntnissen aus einer Studie von Tafforeau und Kollegen, welche für FANCG bei einem siRNA-Knockdown eine 50 %ige Reduktion der Polymeraseaktivität und im Falle einer Überexpression eine dreifache Steigerung der Polymeraseaktivität beobachten konnten (Tafforeau *u. a.*, 2011; Laske *u. a.*, 2019). Überraschenderweise zeigte diese Zelllinie jedoch, im Gegensatz zu allen anderen getesteten Überexpressionszelllinien, für alle drei viralen RNA-Spezies (v/c/mRNA) verringerte RNA-Level. Des weiteren blieb der vRNP-Import im Vergleich zu den parentalen A549-Zellen unbeeinflusst. Trotz dieser widersprüchlichen Ergebnisse konnten für FANCG zu frühen Zeitpunkten der Virusreplikation erhöhte Gesamtvirustiter (36 hpi: $\geq 80\%$ Steigerung, 42 hpi: $\geq 40\%$ Steigerung) verzeichnet werden. Wie bereits erwähnt, liegen diesen Ergebnissen nur zwei biologische Replikate zugrunde. Da die Einzelexperimente jedoch den gleichen Trend aufwiesen wie die gemittelten Werte und immer unter den Werten der parentalen A549-Zelllinie (im Einzelexperiment als auch im Mittelwert) lagen, kann davon ausgegangen werden, dass die erzielten Beobachtungen nicht durch experimentelle Schwankungen hervorgerufen wurden. Trotz eines möglichen positiven Einflusses auf die Polymeraseaktivität konnte der Virustiter nicht gesteigert werden. Dies spricht dafür, dass weitere Schlüsselfaktoren die Influenzavirus-Replikation limitieren. Des weiteren ist zu bedenken, dass in der Studie von Tafforeau und Kollegen ein Minireplikon-Assay zur Bestimmung der Polymeraseaktivität in einem artifiziellen System verwendet wurde.

Regulatorische Wirkungen anderer zellulärer und viraler Proteine, die im Rahmen einer Virusinfektion auftreten, können mit diesem System nicht erfasst werden. Möglicherweise spielen auch weitere zelluläre Funktionen von FANCG eine Rolle, welche zu der frühen Steigerung der Virustiter beigetragen haben. Beispielsweise besitzt FANCG ebenfalls eine Funktion bei DNA-Reparaturmechanismen (Kaddar und Carreau, 2012). Aufgrund der Tatsache, dass Influenzavirus-Infektionen zu DNA-Schäden führen (Ryan, Hollingworth und Grand, 2016), könnte eine Steigerung der Reparaturmechanismen einen positiven Einfluss auf die Überlebensdauer der Wirtszelle ausüben.

Bei XAB2 handelt es sich um einen multifunktionalen Faktor, der eine wichtige Rolle beim Spleißen von pre-mRNAs, Transkriptionsprozessen und Transkriptions-gekoppelten DNA-Reparaturmechanismen einnimmt (Kuraoka *u. a.*, 2008). Bisher konnte XAB2 nur als Restriktionsfaktor für die Virusreplikation identifiziert werden (Thakur, Qureshi und Kumar, 2017). Möglicherweise spielte bei der Identifikation von XAB2 als proviraler Wirtszellfaktor für die Influenzavirus-Replikation u. a. die Wahl des Screening-Systems und des Saatvirus eine Rolle. Des Weiteren basiert die Einstufung von XAB2 als Restriktionsfaktor auf mehreren Screens, welche mit unterschiedlichen Virusstämmen durchgeführt wurden (Thakur, Qureshi und Kumar, 2017). Es besteht damit die Möglichkeit, dass XAB2 im Falle von Influenzavirus-Infektionen trotzdem eine provirale Funktion erfüllt. Im Rahmen dieser Studie konnte für XAB2 nur ein leicht erhöhter Virustiter zu den frühen Infektionszeitpunkten beobachtet werden. Der vRNP-Import, vRNP-Export sowie die vRNA-, cRNA- und mRNA-Synthese scheint nicht durch diesen Faktor beeinflusst gewesen zu sein. Ein möglicher positiver Einfluss auf die DNA-Reparatur während der Infektion wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

Neben den bereits genannten Faktoren wurde auch PLD2 in den Versuchszellen überexprimiert und dessen Einfluss auf die Influenzavirus-Replikation untersucht. Bei PLD2 handelt es sich um eine Phospholipase, welche bereits im Zusammenhang mit Influenzavirus-Infektionen beschrieben wurde. In einer Studie aus dem Jahr 2014 erfolgten Experimente, bei denen PLD2 entweder chemisch oder durch einen siRNA-vermittelten Knockdown im Kontext einer Influenzavirus-Infektion inhibiert wurde. Beide Behandlungen führten dabei zu einem verlangsamten Viruseintritt und zu reduzierten Virustitern. *In vivo*-Studien zeigten zudem einen signifikanten Anstieg der Transkription für Komponenten der angeborenen antiviralen Immunantwort. Des Weiteren konnten die Autoren anhand der Daten schlussfolgern, dass die Interaktion von Influenzaviren mit PLD2 eine schnellere Endozytose erlaubt, wodurch sich das Virus der Detektion durch die angeborene Immunantwort entziehen kann (Oguin 3rd *u. a.*, 2014). Leider konnte im Rahmen dieses Projektes keine Messmethode für den Viruseintritt etabliert werden. Es erfolgten jedoch Messungen der MxA-Genexpression im Rahmen einer

Infektion mit Influenzavirus A/PR/8/34 zu 0 hpi, 24 hpi und 48 hpi unter Niedrig-MOI-Bedingungen (MOI 10^{-4} , drei biologische Replikate) und in einem Zeitraum von 5 hpi bis 10 hpi unter Hoch-MOI-Bedingungen (MOI 1, Einzelexperiment) für die parentale A549-Zelllinie, die Transduktionskontrolle sowie die Überexpressionszelllinien PLD2 low und NXF1 pop (Daten nicht gezeigt). Die Messungen unter Niedrig-MOI-Bedingungen ergaben für beide Kontrollzelllinien sowie die PLD2-Überexpressionszelllinie ein niedriges MxA-Genexpressionslevel (1- bis 4-fach gesteigerte Genexpression im Vergleich zur Kontrolle). Die Zelllinie NXF1 pop wies, im Vergleich zu den anderen Zelllinien, zu 24 hpi das höchste MxA-Genexpressionslevel mit einem Mittelwert von 13-fach auf. Zum Zeitpunkt 48 hpi kam es bei allen untersuchten Zelllinien zu einem Abfall der MxA-Genexpression. Ein ähnlicher Trend zeigte sich bei dem Hoch-MOI-Experiment. Auch hierbei zeigte die NXF1-Überexpressionszelllinie den höchsten Anstieg der MxA-Genexpression von 72-fach zu 7 hpi. Für die PLD2-Überexpressionszelllinie wurde nur ein Maximalwert von 18-fach zum gleichen Zeitpunkt erreicht. Im Vergleich dazu lag der MxA-Genexpressionswert für die Transduktionskontrolle sowie die A549-Zelllinie bei 3-fach. Generell führt die Infektion mit Influenzavirus A/PR/8/34, aufgrund der effektiven Unterdrückung der antiviralen Immunantwort durch den viralen Antagonisten NS1, nur zu einer geringfügigen Aktivierung der MxA-Genexpression (Hayman *u. a.*, 2006; Seitz *u. a.*, 2010). Dies konnte anhand der Genexpressionsdaten für die Kontrollen auch belegt werden. Dennoch wird deutlich, dass beide Überexpressionszelllinien, welche über den gesamten Zeitraum eine leichte Titersteigerung zeigten, erhöhte MxA-Genexpressionslevel aufwiesen. Ob der beobachtete Unterschied der MxA-Genexpression zwischen der NXF1- und PLD2-Überexpressionszelllinie durch die unterschiedlich starke Virusreplikation innerhalb der Zelle hervorgerufen wurde oder ein Resultat der gesteigerten Endozytose durch die PLD2-Überexpression ist, konnte nicht abschließend geklärt werden.

Genetische Manipulation von Zelllinien mittels lentiviraler Transduktion

Trotz der erfolgreichen Überexpression der ausgewählten Genkandidaten sowie deren bereits teilweise in der Literatur beschriebenen Interaktionen mit Influenzaviren konnte in dieser Arbeit kein Gen identifiziert werden, welches zu einer signifikanten und stabilen Steigerung des finalen Gesamtvirustiters führte. Wie bereits im Abschnitt 4.4.4.3 erwähnt, könnte die willkürliche Integration der lentiviralen Vektoren in das Wirtszellgenom sowie das unterschiedliche Überexpressionslevel von Zelle zu Zelle ein Grund hierfür sein. Trotz dieser Nachteile, stellt die lentivirale Transduktion eine effiziente Methode für die Erzeugung von genetisch veränderten Zelllinien im Hochdurchsatzverfahren dar und war zum Zeitpunkt der Projektplanung und des Projektstartes die Methode der Wahl. Für eine sequenzspezifische

Manipulation wurden zu dieser Zeit u. a. Meganukleasen, Zinkfinger-Nukleasen (ZFN) und *transcription activator-like effector nucleases* (TALEN) verwendet, die auf der Erkennung langer Nukleotidsequenzen basieren. Da ZFNs und TALENs jedoch auf Protein-DNA-Interaktionen angewiesen sind, wird für jede Zielsequenz eine neue Konstruktion und Klonierung des Proteins benötigt. Aufgrund dessen eigneten sich diese Methoden nicht für die Herstellung von Zelllinien in einem Hochdurchsatzverfahren. Die Entdeckung des CRISPR/Cas-Systems als biochemische Methode für die gezielte Manipulation von DNA-Sequenzen im Jahr 2012 revolutionierte jedoch die Herstellung von sequenzspezifisch veränderten Zellen. Ursprünglich stammt das CRISPR/Cas9-System aus Bakterien und stellt einen Teil des bakteriellen Immunsystems zur Abwehr von Viren und anderen mobilen genetischen Elementen dar (Rath u. a., 2015). Bei Cas9 handelt es sich, im Gegensatz zu den meisten bekannten DNA-Bindeproteinen, um eine RNA-gesteuerte Nuklease, welche durch die Paarung einer *guide* RNA mit der komplementären DNA-Sequenz gezielte DNA-Doppelstrangbrüche induziert (Wang, La Russa und Qi, 2016). Durch den Austausch der eingesetzten *guide* RNA kann eine Vielzahl genomischer Loci in den verschiedensten Organismen, wie Bakterien, Pilze, Pflanzen und Tieren, verändert werden. Das heutzutage am weitesten verbreitete CRISPR/Cas9-System gehört zu dem Typ-II-CRISPR-System und benötigt für die Induktion eines zielgerichteten DNA-Doppelstrangbruchs einen Duplex aus einer crRNA (20-bp lange, zur Zielsequenz komplementäre, RNA-Sequenz) und einer tracrRNA (Typ-II-CRISPR-System spezifische RNA-Sequenz, welche mit der crRNA hybridisiert). Anstelle dieses Zwei-Komponentensystems kann auch eine chimäre *guide* RNA (*single guide* RNA, sgRNA) zum Einsatz kommen. Neben der angesprochenen Basenpaarung wird zudem das Vorhandensein eines *protospacer adjacent motif* (PAM) benötigt. Nach der Erzeugung des Doppelstrangbruchs kann die Reparatur durch die zellulären Mechanismen über zwei Wege erfolgen: die nicht-homologe Endverbindung (*nonhomologous end joining*, NHEJ) oder die Homologie-vermittelte Reparatur (*homology-directed repair*, HDR). Die NHEJ führt zu nahezu willkürlichen Insertionen und Deletionen an der Bruchstelle, wodurch es zu einem Genknockout aufgrund der Verschiebung des Leserahmens oder durch die Mutation einer kritischen Region des kodierten Proteins kommen kann. Durch die HDR können hingegen bestimmte Sequenzen durch homologe Rekombinationsereignisse an der Stelle des DNA-Doppelstrangbruchs sequenzspezifisch gegen bestimmte Zielsequenzen ausgetauscht werden. Diese Eigenschaften machen CRISPR/Cas9 zu einer sehr effizienten Methode für die Generierung von Genknockouts, für die Integration von Genen, sequenzspezifische Mutagenesen und Sequenzkorrekturen. Trotz vieler Vorteile besitzt auch dieses System Nachteile, welche bei der Projektplanung bedacht werden müssen. Beispielsweise muss bei der Durchführung von CRISPR/Cas-basierten Screens bedacht werden, dass essentielle Faktoren aufgrund eines Genknockouts zu letalen Effekten führen können, wohingegen bei

RNAi-Screens nur das Transkriptionslevel reduziert wird. Des Weiteren werden für einen vollständigen Knockout Mutationen in beiden Allelen benötigt, die zum Abbruch der Translation des kodierten Proteins führen. Ein weiteres Problem stellen *off-target* Effekte dar, welche aufgrund der relativ kurzen Zielsequenz von 20 bp in Kombination mit der benötigten PAM auftreten können (Wang, La Russa und Qi, 2016). Eine Verwendung des CRISPR/Cas9-Systems für die Herstellung von Knockoutzelllinien wäre dennoch für dieses Projekt denkbar gewesen. Eine sequenzspezifische Integration von Überexpressionskassetten mittels CRISPR/Cas9 hätte möglicherweise durch die vorherige Herstellung einer Empfängerzelllinie realisiert werden können, welche die Integration der Gensequenzen in einem Locus mit bestätigter transkriptioneller Aktivität sowie eine Selektion auf HDR-Ereignisse erlaubt. Eine Selektion auf HDR-Ereignisse wäre in diesem Fall essentiell, da dieser Reparaturmechanismus viel seltener abläuft als die NHEJ. Des Weiteren ist zu bedenken, dass auch bei der Verwendung von Integrationskassetten *off-target* Effekte auftreten können. Beispielsweise kann es aufgrund von Sequenzhomologien zu unspezifischen, CRISPR/Cas9-unabhängigen, Rekombinationsereignissen an anderen Stellen im Genom kommen. Ebenso besteht die Gefahr einer Teilintegration der gewünschten Zielsequenz oder der Umstellung von Sequenzabschnitten. Eine Selektion auf Zellpopulationen mit korrekter Integration ist durch die Kombination verschiedener molekularbiologischer Methoden zwar möglich, jedoch sehr zeitaufwendig (Koch *u. a.*, 2018).

Optimierungsstrategien der Influenza-Impfstoffproduktion

Wie bereits unter Abschnitt 2.2.1 ausführlich beschrieben, wird heutzutage immer noch ein Großteil der Influenza-Impfstoffe in embryonierten Hühnereiern produziert. Aufgrund der Länge des Herstellungsverfahrens empfahl die WHO bereits im Jahr 1995 die Entwicklung eines alternativen Influenzavirus-Produktionssystems. Die Zellkultur-basierte Influenza-Impfstoffproduktion bildet dabei aufgrund kürzerer Produktionszeiten, größerer Produktionskapazitäten, einer besseren Prozesskontrolle und der Herstellung eines verlässlichen und gut-charakterisierten Produktes, eine vielversprechende Alternative. Für eine effiziente Zellkultur-basierte Produktion werden jedoch noch weitere Optimierungsschritte benötigt. Einen Ansatzpunkt bildet der Einsatz hochproduktiver Zelllinien, die eine schnelle und effiziente Virusproduktion erlauben und für eine Vielzahl an Influenzavirus-Stämmen (sowohl IAV als auch IBV) eingesetzt werden können (Pérez Rubio und Eiros, 2018). Für die Generierung solcher Zelllinien können genetische Modifikationen, wie beispielsweise die Genüberexpression bestimmter Wirtszellfaktoren oder der Knockdown von antiviralen Restriktionsfaktoren, durchgeführt werden. Ein sehr erfolgreiches Beispiel bildet die Überexpression der α -2,6-Sialyltransferase (SIAT1), welche ebenfalls Bestandteil dieser

Arbeit war. Mehrere Studien konnten bereits zeigen, dass die Überexpression von SIAT1 in den Zelllinien MDCK (Hatakeyama *u. a.*, 2005), PER.C6 (Govorkova *u. a.*, 1995; Durocher und Butler, 2009) und Vero-Zellen die primäre Isolation und die Vermehrung von IAV verbessert. Vor allem humane, nicht an Eier adaptierte, H1N1-Stämme profitieren von der Überexpression von SIAT1 aufgrund einer besseren Anheftung des Virus an die zellulären Rezeptoren (Matrosovich *u. a.*, 2003). Der Grund hierfür könnte das geringe Expressionslevel von SAa2,6 Gal auf der Oberfläche der verwendeten Zelllinien verglichen zu Zellen der humanen Luftwege sein (Abdoli *u. a.*, 2016). Trotz der bereits beschriebenen positiven Auswirkungen einer SIAT1-Überexpression konnte in dieser Arbeit kein Vorteil für die Vermehrung der IAV-Stämme A/PR/8/34 und A/WSN/33 in SIAT1-überexprimierenden A549-Zellen beobachtet werden. Aufgrund des alveolären Ursprungs dieser Zelllinie könnte es jedoch sein, dass diese Zellen bereits große Mengen an SAa2,6 Gal-Rezeptoren auf der Oberfläche exprimieren und dieses System daher bereits gesättigt ist. Neben der Produktion von IAV sollten die Produktionszelllinien ebenfalls eine effiziente IBV-Vermehrung unterstützen. Leider war es aufgrund von Adaptionsproblemen des vorhandenen MDCK-produzierten IBV an A549-Zellen nicht möglich die vorhandenen Zelllinien mit einem IBV-Stamm zu testen. Neben der Manipulation der Produktionszelllinien gibt es jedoch noch weitere Ansatzpunkte für Optimierung der Zellkultur-basierten Influenza-Impfstoffproduktion. Einen weiteren wichtigen Faktor bildet der Einsatz von chemisch definierten synthetischen Medium ohne tierische Zusätze, welches die Kultivierung der Produktionszellen zu hohen Zellzahlen im industriellen Maßstab erlaubt (Pérez Rubio und Eiros, 2018). Ein rationales Design der Supplementierung des Mediums kann hierbei einen wesentlichen Einfluss auf den zellspezifischen Virustiter sowie den Gesamtvirustiter ausüben. Eine Studie von Huang und Kollegen analysierte beispielsweise die Nährstoffansprüche von MDCK-Zellen während des Influenzavirus-Produktionsprozesses und entwickelte daraufhin eine Strategie zur gezielten Nährstoffzugabe. Basierend auf dem Nährstoffverbrauch erfolgte während der Infektion eine Anpassung der Glukose- und Aminosäurezugabe, wodurch die Sterberate der Zellen vermindert und der zellspezifische Virustiter erhöht werden konnte (Huang *u. a.*, 2014). Weitere Möglichkeiten um die Influenzavirus-Produktion zu optimieren ist die Generierung von Saatvirusstämmen mit guten Wachstumseigenschaften (Kim *u. a.*, 2018), eine zellspezifische Optimierung des Trypsins (Iskandar *u. a.*, 2018) und eine Kultivierung der Zellen im Hochzelldichte (HCD)-Format (Tapia *u. a.*, 2016). Letzteres profitiert von der Gegebenheit, dass die Zellkonzentration die finalen Virustiter definiert. Dabei ist jedoch zu beachten, dass sich die Zellen in einem gesunden Zustand befinden müssen und nicht durch einen Mangel an essentiellen Nährstoffen oder durch inhibitorische Nebenprodukte (wie z. B. Laktat) in ihrem Wachstum beeinträchtigt werden. HCD-Produktionsprozesse können beispielsweise mithilfe von Hohlfaser-Reaktoren und Hohlfaser-basierten Perfusionssystemen durchgeführt werden (Tapia *u. a.*, 2016). Auch

eine kontinuierliche Virusproduktion ist denkbar. Ob dieser Prozess jedoch für die Influenza-Impfstoffproduktion durch die regulatorischen Behörden freigegeben wird, ist noch unklar. Vor allem die Bildung von DIPs (Frensing *u. a.*, 2013) und die Gefahr der Mutation des Virus stellen die Hauptprobleme dieses Produktionsprozesses dar (Gallo–Ramírez *u. a.*, 2015). Diese genannten Punkte machen deutlich, dass die Influenzavirus-Produktion über vielfältige Ansatzpunkte optimiert werden kann und bilden Ansatzpunkte für weiterführende Studien.

Übertragbarkeit der erzielten Ergebnisse auf den Produktionsprozess

Wie bereits in dem vorherigen Absatz beschrieben, können verschiedene Ansätze, wie beispielsweise die genetische Veränderung der Produktionszelllinien, zu einer Steigerung der Virusproduktion beitragen. Einen vielversprechenden Ansatz bildete die Studie von van der Sanden und Kollegen zur Optimierung der Poliovirus-Impfstoffproduktion (van der Sanden *u. a.*, 2016). Hierfür erfolgte zunächst ein genomweiter RNAi-Screen in der humanen Krebszelllinie HEp-2C und die Bestimmung der erzielten Antigentiter nach Virusinfektion mithilfe des *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Anschließend wurden diese primären Hits durch die Transfektion der jeweiligen siRNAs in Vero-Zellen validiert. Des Weiteren erfolgten Doppel-Knockdownversuche durch die Kombination von jeweils zwei siRNAs, die Herstellung stabiler Vero-Knockoutzelllinien mittels CRISPR/Cas9 sowie Infektionsversuche mit verschiedenen Poliovirus-Stämmen. Insgesamt konnten elf Gene identifiziert werden, welche die Poliovirus-Produktion in Vero-Zellen signifikant steigerten (van der Sanden *u. a.*, 2016). Zusätzlich erfolgten in der gleichen Arbeitsgruppe Untersuchungen zur Optimierung der Rotavirus-Impfstoffproduktion (Wu *u. a.*, 2017). Auch für diese Studie erfolgte ein genomweiter RNAi-Screen, eine anschließende Validierung der primären Hits in Vero-Zellen, die Erzeugung stabiler Vero-Knockoutzelllinien mittels CRISPR/Cas9 sowie Infektionsversuche mit verschiedenen Rotavirus-Stämmen (Wu *u. a.*, 2017). Auch hierbei konnten Wirtszellfaktoren identifiziert werden, welche die Rotavirus-Produktion signifikant steigerten. Basierend auf diesen Daten führten Hoeksema und Kollegen (Hoeksema *u. a.*, 2018) eine Anschlussstudie durch, in der die Übertragbarkeit der erzielten Ergebnisse auf den Produktionsprozess mithilfe von *small-scale* Reaktormodellen getestet werden sollte. Hierfür erfolgte zunächst die Generierung der jeweiligen Knockoutzelllinien mittels CRISPR/Cas9 anhand der WHO 10-87 GMP Vero-Zelllinie, welche für die Impfstoffproduktion eingesetzt wird. Des Weiteren wurde ein Grenzwert für die Virustitersteigerung von ≥ 30 -fach angesetzt, da dieser (1) basierend auf den Daten der Ausgangspublikationen möglich sein sollte und (2) zu einer signifikanten Steigerung der Produktion und Senkung der Kosten pro Impfdosis beitragen würde. Weiterhin erfolgten Kontrollstudien mit den Produktionsstämmen, eine Herunterskalierung des Produktionsverfahrens für das Zelllinien-Screening sowie eine

Anpassung des ELISA an die erwarteten Virustiter. Überraschenderweise konnte für keine der getesteten Knockoutzelllinien eine wesentliche Virustitersteigerung unter produktionsnahen Bedingungen erzielt werden. Die Gründe für die gescheiterte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse unter Produktionsbedingungen können u. a. in der unterschiedlichen Vorgeschichte und Herkunft der verwendeten Vero-Zelllinie, der Herkunft und Herstellung des Saatvirus, dem Herstellungsverfahren der Knockoutzelllinien mittels CRISPR/Cas9, dem Versuchsablauf sowie dem Verfahren zur Virustiterbestimmung liegen. Diese Arbeit zeigt deutlich auf, dass neben einem gründlichen experimentellen Design (eingesetzte Zelllinie, Saatvirus etc.), eine Validierung der Ergebnisse unter produktionsnahen Bedingungen essentiell für die Herstellung neuer Produktionszelllinien ist.

5 AUSBLICK

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss der antiviralen Immunantwort auf die IAV- Vermehrung in humanen Modell- und Produktionszelllinien untersucht, wobei unerwarteterweise deutliche Unterschiede bei der Aktivierung der antiviralen Genexpression festgestellt werden konnten. In der bisherigen Literatur wurde bereits eine starke antivirale Genexpression für humane Modellzelllinien, wie beispielsweise die A549-Zellen, beschrieben (Haller und Kochs, 2011). Diese Studien umfassten bisher jedoch keine neuartigen Produktionszelllinien, welche häufig durch das Einbringen adenoviraler Gene immortalisiert werden. Durch umfassende IFN-Stimulations- und Infektionsversuche konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Expression des adenoviralen Proteins E1A die antivirale Aktivität in der Zelle stark inhibiert (Bachmann *u. a.*, 2016). Somit spielt die antivirale Immunantwort bei der Influenzavirus-Produktion in humanen Ad₅-Zellen keine Rolle. Basierend auf diesen Erkenntnissen können durch das gezielte Einbringen der adenoviralen Gene E1A und E1B neuartige Produktionszelllinien mit einer gestörten antiviralen Immunantwort hergestellt werden. Ob der positive Einfluss auf die Influenzavirus-Produktion auf nicht-humane Zelllinien übertragbar ist, hängt von dem jeweiligen Zellsystem und der Zellspezies ab. Des weiteren erhielten bisher nur die Zelllinien MDCK und Vero eine Zulassung für die Zellkultur-basierte Influenza-Impfstoffproduktion. Vorhergegangene Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten bereits zeigen, dass MDCK-Zellen kein Mx-Protein mit antiviraler Aktivität besitzen (Seitz *u. a.*, 2010; Frensing *u. a.*, 2011) und dass zudem durch die Zugabe von Trypsin bei der Virusinfektion ein proteolytischer Abbau von IFN stattfindet (Seitz *u. a.*, 2012). Bei Vero-Zellen spielt die antivirale Immunreaktion aufgrund fehlender funktionaler IFN-Gene keine Rolle (Desmyter, Melnick und Rawls, 1968). Neben der Virusproduktion ist jedoch auch eine Anwendung von Ad₅-Zellen für die Virusdiagnostik und -isolation sowie für die Grundlagenforschung denkbar (Young *u. a.*, 2003; Stewart, Randall und Adamson, 2014; McSharry *u. a.*, 2015).

Neben der antiviralen Immunantwort können zelluläre Faktoren die Influenzavirus-Produktion beeinflussen. Für die Identifizierung dieser Wirtszellfaktoren erfolgte die Generierung von A549-basierten Überexpressions- und Knockdownzelllinien mittels lentiviraler Transduktion. Leider führte keiner der ausgewählten Genkandidaten zu einer deutlichen Steigerung der finalen Gesamtvirustiter. Lediglich eine kleine Auswahl an Überexpressionszelllinien unterstützte eine leichte Steigerung der frühen Gesamtvirustiter. Aufgrund des geringfügigen Effektes wären weitere Untersuchungen dieser vorhandenen Zelllinien sowie die Herstellung von Produktionszelllinien mit diesen Überexpressionskandidaten wenig sinnvoll. In der Literatur konnten jedoch bereits einige Wirtszellfaktoren beschrieben werden, welche im Falle

einer Überexpression bzw. eines Knockdowns zu einer Steigerung der Influenzavirustiter führten (Beispiele Li *u. a.*, 2011; Yi *u. a.*, 2017). Ob diese Faktoren auch zu einer gesteigerten Ausbeute unter Produktionsbedingungen führen, wurde bisher allerdings noch nicht untersucht. Die Auswahl solcher Wirtszellfaktoren erfolgt meist basierend auf den Daten von Protein- und RNAi-Screens, deren Auslesezeitpunkte meist die frühe Phase der Virusreplikation abdecken. Um mögliche Wirtszellfaktoren für die Optimierung der Influenzavirus-Produktion zu identifizieren, müssten zukünftige Screening-Verfahren entwickelt werden, deren Auslesezeitpunkte zu einer späteren Phase der Virusreplikation stattfinden sowie die Bestimmung der Gesamtvirustiter ermöglichen. Des Weiteren wären Screening-Verfahren basierend auf Überexpressionszelllinien für die Identifikation von proviralen Wirtszellfaktoren wünschenswert. Ansätze hierfür lieferte bereits ein CRISPR/Cas9-Screen von Heaton und Kollegen (Heaton *u. a.*, 2017). Im Gegensatz zu den vielen *loss-of-function* Screens zur Identifikation von pro- und antiviralen-Wirtszellfaktoren, wird bei dieser Methode ein Cas9-Fusionsprotein verwendet, welches eine Transaktivator-domäne besitzt. Dieses Fusionsprotein wird anschließend durch sequenzspezifische *guide* RNAs an die jeweiligen Promotorsequenzen geleitet und aktiviert dort die Genexpression. Somit kann eine Überexpression ohne das Einbringen zusätzlicher Gensequenzen ermöglicht werden (Koneremann *u. a.*, 2015; Heaton *u. a.*, 2017). In Kombination mit einem Hochdurchsatzverfahren zur Bestimmung der Gesamtvirustiter zu produktionsrelevanten Zeitpunkten könnten potentielle Kandidaten für die Optimierung der Influenzavirus-Produktion identifiziert werden. Die Arbeitsgruppe Bioprozesstechnik verfügt bereits über standardisierte Verfahren zur Bestimmung von Gesamtvirustitern, welche jedoch noch in ein Hochdurchsatzformat überführt werden müssten. Zudem stehen vielfältige Produktionszelllinien und verschiedene Bioreaktoren zur Verfügung, welche produktionsnahe Bedingungen schaffen. Wie essentiell produktionsnahen Bedingungen für eine Übertragbarkeit der Ergebnisse in den Produktionsmaßstab sind, konnte die Studie von Hoeksema und Kollegen (Hoeksema *u. a.*, 2018) deutlich belegen. In dieser konnten die Ergebnisse von vielversprechenden Genkandidaten aus zwei Publikationen zur Steigerung der Poliovirus- (van der Sanden *u. a.*, 2016) und Rotavirustiter (Wu *u. a.*, 2017) nicht unter produktionsnahen Bedingungen reproduziert werden. Zudem könnten die erzielten Daten mithilfe des mathematischen Modells der IAV-Replikation analysiert werden und weiterführende molekularbiologische Analysen zur Funktionalität der entsprechenden Gene erfolgen.

6 VERZEICHNISSE

6.1 LITERATURVERZEICHNIS

Abdoli, A. u. a. (2016) „Comparison between MDCK and MDCK-SIAT1 cell lines as preferred host for cell culture-based influenza vaccine production“, *Biotechnology Letters*, 38(6), S. 941–948. doi: 10.1007/s10529-016-2069-4.

Ackrill, A. M. u. a. (1991) „Inhibition of the cellular response to interferons by products of the adenovirus type 5 E1A oncogene“, *Nucleic Acids Res*, 19(16), S. 4387–4393. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1832217> (Zugegriffen: 15. Januar 2018).

Al-Mazrou, A. u. a. (1991) „Comparison of adverse reactions to whole-virion and split-virion influenza vaccines in hospital personnel“, 145(3), S. 213–218. Verfügbar unter: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-0025895936&origin=inward&txGid=03dc9eac6be231e56e7d6931a0ef8353> (Zugegriffen: 19. Dezember 2017).

Alexopoulou, L. u. a. (2001) „Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3.“, *Nature*, 413(6857), S. 732–8. doi: 10.1038/35099560.

Ali, A. u. a. (2000) „Influenza virus assembly: effect of influenza virus glycoproteins on the membrane association of M1 protein.“, *Journal of virology*, 74(18), S. 8709–19. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10954572> (Zugegriffen: 14. November 2017).

Ambrose, C. S. und Levin, M. J. (2012) „The rationale for quadrivalent influenza vaccines“, *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 8(1), S. 81–88. doi: 10.4161/hv.8.1.17623.

Amorij, J.-P. u. a. (2012) „Towards tailored vaccine delivery: needs, challenges and perspectives.“, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 161(2), S. 363–76. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.12.039.

Anderson, K. P. und Fennie, E. H. (1987) „Adenovirus early region 1A modulation of interferon antiviral activity“, *J Virol*, 61(3), S. 787–795. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3027405> (Zugegriffen: 15. Januar 2018).

Andreakos, E. u. a. (2017) „Interferon-λs: Front-Line Guardians of Immunity and Homeostasis

in the Respiratory Tract“, *Frontiers in Immunology*. Frontiers, 8, S. 1232. doi: 10.3389/fimmu.2017.01232.

Bachmann, M. u. a. (2016) „Impaired antiviral response of adenovirus-transformed cell lines supports virus replication“, *Journal of General Virology*. Microbiology Society, 97(2), S. 293–298. doi: 10.1099/jgv.0.000361.

Bancroft, C. T. und Parslow, T. G. (2002) „Evidence for segment-nonspecific packaging of the influenza A virus genome.“, *Journal of virology*. American Society for Microbiology (ASM), 76(14), S. 7133–9. doi: 10.1128/JVI.76.14.7133-7139.2002.

Barría, M. I. u. a. (2013) „Localized Mucosal Response to Intranasal Live Attenuated Influenza Vaccine in Adults“, *The Journal of Infectious Diseases*, 207(1), S. 115–124. doi: 10.1093/infdis/jjs641.

Basu, M. u. a. (2006) „Inhibition of vesicular stomatitis virus infection in epithelial cells by alpha interferon-induced soluble secreted proteins“, *J Gen Virol*, 87(Pt 9), S. 2653–2662. doi: 10.1099/vir.0.82039-0.

Bercovich-Kinori, A. u. a. (2016) „A systematic view on influenza induced host shutoff.“, *eLife*. eLife Sciences Publications, Ltd, 5. doi: 10.7554/eLife.18311.

Berkhout, B. (2017) „A Fourth Generation Lentiviral Vector: Simplifying Genomic Gymnastics.“, *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 25(8), S. 1741–1743. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.06.005.

Bodewes, R. u. a. (2013) „Recurring influenza B virus infections in seals“, *Emerg Infect Dis*, 19(3), S. 511–512. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23750359>.

Boivin, S. u. a. (2010) „Influenza A virus polymerase: structural insights into replication and host adaptation mechanisms.“, *The Journal of biological chemistry*, 285(37), S. 28411–7. doi: 10.1074/jbc.R110.117531.

Bouvier, N. M. und Palese, P. (2008) „The biology of influenza viruses.“, *Vaccine*. NIH Public Access, 26 Suppl 4(Suppl 4), S. D49-53. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19230160> (Zugegriffen: 13. November 2017).

van Bortel, R. A. J. u. a. (2015) „Safety and immunogenicity of influenza whole inactivated virus vaccines: A phase I randomized clinical trial“, *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 11(4), S. 983–990. doi: 10.1080/21645515.2015.1012004.

Brass, A. L. u. a. (2009) „The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus“, *Cell*. 2010/01/13, 139(7), S. 1243–1254. doi: 10.1016/j.cell.2009.12.017.

Breitwieser, T. (2015) *Effect of adenoviral protein expression on influenza virus replication in cell culture-based vaccine production*. Magdeburg.

Bui, M. u. a. (2000) „Role of the influenza virus M1 protein in nuclear export of viral ribonucleoproteins.“, *Journal of virology*. American Society for Microbiology, 74(4), S. 1781–6. doi: 10.1128/JVI.74.4.1781-1786.2000.

Bushman, F. u. a. (2005) „Genome-wide analysis of retroviral DNA integration“, *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 3(11), S. 848–858. doi: 10.1038/nrmicro1263.

Calder, L. J. u. a. (2010) „Structural organization of a filamentous influenza A virus.“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(23), S. 10685–90. doi: 10.1073/pnas.1002123107.

Capua, I. und Cattoli, G. (2007) „Diagnosing avian influenza infection in vaccinated populations by systems for differentiating infected from vaccinated animals (DIVA).“, *Developments in biologicals*, 130, S. 137–43. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18411945> (Zugegriffen: 22. Februar 2018).

Carvajal-Yepes, M. u. a. (2015) „Enhanced production of human influenza virus in PBS-12SF cells with a reduced interferon response“, *Hum Vaccin Immunother*, 11(9), S. 0. doi: 10.1080/21645515.2015.1016677.

Castrucci, M. R. u. a. (1993) „Genetic Reassortment between Avian and Human Influenza A Viruses in Italian Pigs“, *Virology*, 193(1), S. 503–506. doi: 10.1006/viro.1993.1155.

Chare, E. R., Gould, E. A. und Holmes, E. C. (2003) „Phylogenetic analysis reveals a low rate of homologous recombination in negative-sense RNA viruses“, *Journal of General Virology*,

84(10), S. 2691–2703. doi: 10.1099/vir.0.19277-0.

Chen, J. u. a. (1998) „Structure of the hemagglutinin precursor cleavage site, a determinant of influenza pathogenicity and the origin of the labile conformation.“, *Cell*, 95(3), S. 409–17. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9814710> (Zugegriffen: 15. Dezember 2017).

Chen, X. u. a. (2018) „Host Immune Response to Influenza A Virus Infection“, *Frontiers in Immunology*, 9, S. 320. doi: 10.3389/fimmu.2018.00320.

Chou, Y.-C. u. a. (2015) „Variations in genome-wide RNAi screens: lessons from influenza research“, *Journal of Clinical Bioinformatics*, 5(1), S. 2. doi: 10.1186/s13336-015-0017-5.

Chou, Y. u. a. (2013) „Colocalization of different influenza viral RNA segments in the cytoplasm before viral budding as shown by single-molecule sensitivity FISH analysis.“, *PLoS pathogens*. Herausgegeben von S. P. J. Whelan, 9(5), S. e1003358. doi: 10.1371/journal.ppat.1003358.

Clancy, S. (2008) „Genetics of the Influenza Virus“, *Nature Education*, 1, S. 83. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/genetics-of-the-influenza-virus-716>.

Committee for medical products for human use (2005) *Guideline on development and manufacture of lentiviral vectors*.

Cote, J. u. a. (1998) „Serum-free production of recombinant proteins and adenoviral vectors by 293SF-3F6 cells“, *Biotechnol Bioeng*. 1999/04/01, 59(5), S. 567–575. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10099373>.

Cox, M. M. J. und Hollister, J. R. (2009) „FluBlok, a next generation influenza vaccine manufactured in insect cells“, *Biologicals*, 37(3), S. 182–189. doi: 10.1016/j.biologicals.2009.02.014.

Cronin, J., Zhang, X.-Y. und Reiser, J. (2005) „Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping.“, *Current gene therapy*. NIH Public Access, 5(4), S. 387–98. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16101513> (Zugegriffen: 21. Januar 2018).

Davarinejad, H. (ohne Datum) *Quantifications of Western Blots with ImageJ*. Verfügbar unter: <https://www.google.de/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUKEwjpr4e7>

7fzYAhXOalAKHcJ9Do0QFgg6MAA&url=http%3A%2F%2Fwww.yorku.ca%2Fyisheng%2FInternal%2FProtocols%2FImageJ.pdf&usg=AOvVaw0jKwOY_GBCQLvalGlnsZhA
(Zugegriffen: 26. Oktober 2018).

Desmyter, J., Melnick, J. L. und Rawls, W. E. (1968) „Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero).“, *Journal of virology*, 2(10), S. 955–61. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4302013>
(Zugegriffen: 30. Januar 2018).

Doroshenko, A. und Halperin, S. A. (2009) „Trivalent MDCK cell culture-derived influenza vaccine Optaflu (Novartis Vaccines).“, *Expert review of vaccines*, 8(6), S. 679–88. doi: 10.1586/erv.09.31.

Dostert, M. (2016) *Untersuchung der Influenzavirus-Vermehrung in A549-Überexpressionsklonen zur Optimierung der Impfstoffproduktion*. Heinrich Heine Universität Düsseldorf.

Dove, B. K. u. a. (2012) „A quantitative proteomic analysis of lung epithelial (A549) cells infected with 2009 pandemic influenza A virus using stable isotope labelling with amino acids in cell culture“, *Proteomics*. 2012/05/16, 12(9), S. 1431–1436. doi: 10.1002/pmic.201100470.

Drake, J. W. (1993) „Rates of spontaneous mutation among RNA viruses.“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(9), S. 4171–5. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8387212> (Zugegriffen: 11. Dezember 2017).

Dullaers, M. u. a. (2004) „Side-by-Side Comparison of Lentivirally Transduced and mRNA-Electroporated Dendritic Cells: Implications for Cancer Immunotherapy Protocols“, *Molecular Therapy*. Cell Press, 10(4), S. 768–779. doi: 10.1016/J.YMTHE.2004.07.017.

Durocher, Y. und Butler, M. (2009) „Expression systems for therapeutic glycoprotein production“, *Current Opinion in Biotechnology*, 20(6), S. 700–707. doi: 10.1016/j.copbio.2009.10.008.

Duxbury, M. S. u. a. (2004) „CEACAM6 gene silencing impairs anoikis resistance and in vivo metastatic ability of pancreatic adenocarcinoma cells“, *Oncogene*, 23(2), S. 465–473. doi: 10.1038/sj.onc.1207036.

Ehrhardt, C. u. a. (2010) „Interplay between influenza A virus and the innate immune signaling“, *Microbes Infect.* 2009/09/29, 12(1), S. 81–87. doi: 10.1016/j.micinf.2009.09.007.

Eisfeld, A. J., Neumann, G. und Kawaoka, Y. (2015) „At the centre: influenza A virus ribonucleoproteins“, *Nat Rev Microbiol.* Nature Publishing Group, 13(1), S. 28–41. doi: 10.1038/nrmicro3367.

Endter, C. und Dobner, T. (2004) „Cell transformation by human adenoviruses“, *Curr Top Microbiol Immunol*, 273, S. 163–214. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14674602> (Zugegriffen: 15. Januar 2018).

Fernandes, P. u. a. (2013) „Impact of E1 and Cre on adenovirus vector amplification: developing MDCK CAV-2-E1 and E1-Cre transcomplementing cell lines“, *PLoS One.* Herausgegeben von K. Stieger, 8(4), S. e60342. doi: 10.1371/journal.pone.0060342.

Fields, B. N. u. a. (2001) *Fields virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. Verfügbar unter: <http://www.worldcat.org/title/fields-virology/oclc/45500371> (Zugegriffen: 21. Januar 2018).

Fitzgerald, K. A. (2011) „The Interferon Inducible Gene: Viperin“, *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 31(1), S. 131–135. doi: 10.1089/jir.2010.0127.

Forero, L. O. (2013) *Wilcoxon-Mann-Whitney test and a small sample size*. Verfügbar unter: <https://www.blopig.com/blog/2013/10/wilcoxon-mann-whitney-test-and-a-small-sample-size/> (Zugegriffen: 21. Februar 2019).

Fournier, E. u. a. (2012) „A supramolecular assembly formed by influenza A virus genomic RNA segments.“, *Nucleic acids research*, 40(5), S. 2197–209. doi: 10.1093/nar/gkr985.

Francis, T. jr. (1953) „Vaccination against influenza.“, *Bulletin of the World Health Organization.* World Health Organization, 8(5–6), S. 725–41. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13094502> (Zugegriffen: 19. Dezember 2017).

Frensing, T. u. a. (2011) „Efficient influenza B virus propagation due to deficient interferon-induced antiviral activity in MDCK cells“, *Vaccine.* 2011/06/10, 29(41), S. 7125–7129. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.05.069.

Frensing, T. u. a. (2013) „Continuous Influenza Virus Production in Cell Culture Shows a Periodic Accumulation of Defective Interfering Particles“, *PLoS ONE*. Herausgegeben von S. Pöhlmann, 8(9), S. e72288. doi: 10.1371/journal.pone.0072288.

Frensing, T. u. a. (2014) „Impact of defective interfering particles on virus replication and antiviral host response in cell culture-based influenza vaccine production“, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(21), S. 8999–9008. doi: 10.1007/s00253-014-5933-y.

Frensing, T. (2015) „Defective interfering viruses and their impact on vaccines and viral vectors“, *Biotechnology Journal*, 10(5), S. 681–689. doi: 10.1002/biot.201400429.

Furuta, Y. u. a. (2013) „Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor“, *Antiviral Research*. Elsevier, 100(2), S. 446–454. doi: 10.1016/J.ANTIVIRAL.2013.09.015.

Gallo–Ramírez, L. E. u. a. (2015) „Bioreactor concepts for cell culture-based viral vaccine production“, *Expert Review of Vaccines*, 14(9), S. 1181–1195. doi: 10.1586/14760584.2015.1067144.

Garcia-Sastre, A. u. a. (1998) „Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems“, *Virology*, 252(2), S. 324–330. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9878611>.

Garcia-Sastre, A. (2011) „Induction and evasion of type I interferon responses by influenza viruses“, *Virus Res*, 162(1–2), S. 12–18. doi: 10.1016/j.virusres.2011.10.017.

García-Sastre, A. und Biron, C. A. (2006) „Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in détente .“, *Science (New York, N.Y.)*, 312(5775), S. 879–82. doi: 10.1126/science.1125676.

Gasparini, R. u. a. (2014) „Compounds with anti-influenza activity: present and future of strategies for the optimal treatment and management of influenza. Part II: Future compounds against influenza virus.“, *Journal of preventive medicine and hygiene*. Pacini Editore, 55(4), S. 109–29. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26137785> (Zugegriffen: 25. Januar 2019).

Gaur, P. u. a. (2012) „Influenza A virus neuraminidase protein enhances cell survival through interaction with carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (CEACAM6)

protein“, *J Biol Chem*, 287(18), S. 15109–15117. doi: 10.1074/jbc.M111.328070.

Genzel, Y. u. a. (2012) „CAP, a new human suspension cell line for influenza virus production“, *Appl Microbiol Biotechnol*. doi: 10.1007/s00253-012-4238-2.

Genzel, Y. (2015) „Designing cell lines for viral vaccine production: Where do we stand?“, *Biotechnology Journal*, 10(5), S. 728–740. doi: 10.1002/biot.201400388.

Genzel, Y. und Reichl, U. (2009) „Continuous cell lines as a production system for influenza vaccines“, *Expert Rev Vaccines*. Taylor & Francis, 8(12), S. 1681–1692. doi: 10.1586/erv.09.128.

Ghasemi, A. und Zahediasl, S. (2012) „Normality tests for statistical analysis: a guide for non-statisticians.“, *International journal of endocrinology and metabolism*. Kowsar Medical Institute, 10(2), S. 486–9. doi: 10.5812/ijem.3505.

Giard, D. J. u. a. (1973) „In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors.“, *Journal of the National Cancer Institute*, 51(5), S. 1417–23. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4357758> (Zugegriffen: 28. Januar 2018).

Giese, S., Bolte, H. und Schwemmler, M. (2016) „The Feat of Packaging Eight Unique Genome Segments“, *Viruses*, 8(6), S. 165. doi: 10.3390/v8060165.

Gnirß, K. u. a. (2015) „Tetherin Sensitivity of Influenza A Viruses Is Strain Specific: Role of Hemagglutinin and Neuraminidase“, *Journal of Virology*. Herausgegeben von D. S. Lyles, 89(18), S. 9178–9188. doi: 10.1128/JVI.00615-15.

Govorkova, E. A. u. a. (1995) „Replication of influenza A viruses in a green monkey kidney continuous cell line (Vero).“, *The Journal of infectious diseases*, 172(1), S. 250–3. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7797924> (Zugegriffen: 28. September 2018).

Graham, F. L. u. a. (1977) „Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5“, *J Gen Virol*, 36(1), S. 59–74. doi: 10.1099/0022-1317-36-1-59.

Gubareva, L. V. u. a. (2010) „Comprehensive assessment of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus drug susceptibility in vitro“, *Antiviral Therapy*, 15(8), S. 1151–1159. doi:

10.3851/IMP1678.

Guilligay, D. u. a. (2014) „Comparative Structural and Functional Analysis of Orthomyxovirus Polymerase Cap-Snatching Domains“, *PLoS ONE*. Herausgegeben von P. Digard. Public Library of Science, 9(1), S. e84973. doi: 10.1371/journal.pone.0084973.

Gutch, M. J. und Reich, N. C. (1991) „Repression of the interferon signal transduction pathway by the adenovirus E1A oncogene“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(18), S. 7913–7917. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1654549> (Zugegriffen: 15. Januar 2018).

Haller, O. u. a. (2015) „Mx GTPases: dynamin-like antiviral machines of innate immunity“, *Trends in Microbiology*, 23(3), S. 154–163. doi: 10.1016/j.tim.2014.12.003.

Haller, O. und Kochs, G. (2011) „Human MxA Protein: An Interferon-Induced Dynamin-Like GTPase with Broad Antiviral Activity“, *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 31(1), S. 79–87. doi: 10.1089/jir.2010.0076.

Haller, O., Kochs, G. und Weber, F. (2006) „The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses“, *Virology*, 344(1), S. 119–130. doi: 10.1016/j.virol.2005.09.024.

Hao, L. u. a. (2008) „Drosophila RNAi screen identifies host genes important for influenza virus replication“, *Nature*, 454(7206), S. 890–893. doi: 10.1038/nature07151.

Hatakeyama, S. u. a. (2005) „Enhanced expression of an alpha2,6-linked sialic acid on MDCK cells improves isolation of human influenza viruses and evaluation of their sensitivity to a neuraminidase inhibitor.“, *Journal of clinical microbiology*, 43(8), S. 4139–46. doi: 10.1128/JCM.43.8.4139-4146.2005.

Hay, R. J. (1996) „Human cells and cell cultures: availability, authentication and future prospects.“, *Human cell*, 9(3), S. 143–52. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9183642> (Zugegriffen: 3. Januar 2018).

Hayman, A. u. a. (2006) „Variation in the ability of human influenza A viruses to induce and inhibit the IFN-beta pathway.“, *Virology*, 347(1), S. 52–64. doi: 10.1016/j.virol.2005.11.024.

Heaton, B. E. u. a. (2017) „A CRISPR Activation Screen Identifies a Pan-avian Influenza Virus

Inhibitory Host Factor“, *Cell Reports*, 20(7), S. 1503–1512. doi: 10.1016/j.celrep.2017.07.060.

Hegde, N. R. (2015) „Cell culture-based influenza vaccines: A necessary and indispensable investment for the future“, *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. Taylor & Francis, 11(5), S. 1223–1234. doi: 10.1080/21645515.2015.1016666.

Heil, F. u. a. (2004) „Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8.“, *Science (New York, N.Y.)*, 303(5663), S. 1526–9. doi: 10.1126/science.1093620.

Hendrickx, R. u. a. (2014) „Innate Immunity to Adenovirus“, *Human Gene Therapy*, 25(4), S. 265–284. doi: 10.1089/hum.2014.001.

Hochschule Luzern (2019) *Mann-Whitney-U-Test*. Verfügbar unter: <https://www.empirical-methods.hslu.ch/entscheidbaum/unterschiede/zentrale-tendenz/mann-whitney-u/> (Zugegriffen: 21. Februar 2019).

Hoeksema, F. u. a. (2018) „Enhancing viral vaccine production using engineered knockout vero cell lines – A second look“, *Vaccine*, 36(16), S. 2093–2103. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.03.010.

Huang, D. u. a. (2014) „Rational design of medium supplementation strategy for improved influenza viruses production based on analyzing nutritional requirements of MDCK Cells“, *Vaccine*, 32(52), S. 7091–7097. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.10.067.

Iskandar, V. I. u. a. (2018) „Optimization of trypsins for influenza A/H1N1 virus replication in MDCK SI-6 cells, a novel MDCK cell line“, *Journal of Virological Methods*, 252, S. 94–99. doi: 10.1016/j.jviromet.2017.11.006.

Iwai, A., Shiozaki, T. und Miyazaki, T. (2013) „Relevance of signaling molecules for apoptosis induction on influenza A virus replication“, *Biochem Biophys Res Commun*, 441(3), S. 531–537. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.10.100.

Iwasaki, A. und Pillai, P. S. (2014) „Innate immunity to influenza virus infection.“, *Nature reviews. Immunology*. NIH Public Access, 14(5), S. 315–28. doi: 10.1038/nri3665.

Jakubcová, L., Hollý, J. und Varečková, E. (2016) „The role of fusion activity of influenza A viruses in their biological properties.“, *Acta virologica*, 60(2), S. 121–35. Verfügbar unter:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27265461> (Zugegriffen: 9. November 2017).

Kaddar, T. und Carreau, M. (2012) „Fanconi anemia proteins and their interacting partners: a molecular puzzle.“, *Anemia*. Hindawi Limited, 2012, S. 425814. doi: 10.1155/2012/425814.

Kalbfuss, B. u. a. (2008) „Monitoring influenza virus content in vaccine production: precise assays for the quantitation of hemagglutination and neuraminidase activity“, *Biologicals*, 36(3), S. 145–161. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18561375> (Zugegriffen: 28. Januar 2018).

Karlas, A. u. a. (2010) „Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication“, *Nature*, 463(7282), S. 818–822. doi: 10.1038/nature08760.

Keller, D. (2012) *Parametrisch oder nichtparametrisch? Das ist hier die Frage*. Verfügbar unter: <https://statistik-und-beratung.de/2012/09/parametrisch-oder-nichtparametrisch-das-ist-hier-die-frage/> (Zugegriffen: 21. Februar 2019).

Kilbourne, E. D. (1969) „Future influenza vaccines and the use of genetic recombinants.“, *Bulletin of the World Health Organization*, 41(3), S. 643–5. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5309489> (Zugegriffen: 2. Januar 2018).

Killip, M. J., Fodor, E. und Randall, R. E. (2015) „Influenza virus activation of the interferon system“, *Virus Research*, 209, S. 11–22. doi: 10.1016/j.virusres.2015.02.003.

Kim, E.-H. u. a. (2018) „Generation of a High-Growth Influenza Vaccine Strain in MDCK Cells for Vaccine Preparedness.“, *Journal of microbiology and biotechnology*, 28(6), S. 997–1006. doi: 10.4014/jmb.1712.12007.

Kistner, O. u. a. (1998) „Development of a mammalian cell (Vero) derived candidate influenza virus vaccine.“, *Vaccine*, 16(9–10), S. 960–8. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9682344> (Zugegriffen: 20. Dezember 2017).

Klenk, H. D. u. a. (1975) „Activation of influenza A viruses by trypsin treatment.“, *Virology*, 68(2), S. 426–439. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/173078> (Zugegriffen: 3. Januar 2018).

Koch, B. u. a. (2018) „Generation and validation of homozygous fluorescent knock-in cells

using CRISPR-Cas9 genome editing.“, *Nature protocols*, 13(6), S. 1465–1487. doi: 10.1038/nprot.2018.042.

Kochs, G. u. a. (2009) „Strong interferon-inducing capacity of a highly virulent variant of influenza A virus strain PR8 with deletions in the NS1 gene“, *J Gen Virol*, 90(Pt 12), S. 2990–2994. doi: 10.1099/vir.0.015727-0.

Konermann, S. u. a. (2015) „Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex.“, *Nature*, 517(7536), S. 583–8. doi: 10.1038/nature14136.

König, R. u. a. (2010) „Human host factors required for influenza virus replication“, *Nature*. 2009/12/23, 463(7282), S. 813–817. doi: 10.1038/nature08699.

Kozera, B. und Rapacz, M. (2013) „Reference genes in real-time PCR“, *Journal of Applied Genetics*, 54(4), S. 391–406. doi: 10.1007/s13353-013-0173-x.

Kreijtz, J. H., Fouchier, R. A. und Rimmelzwaan, G. F. (2011) „Immune responses to influenza virus infection“, *Virus Res.* 2011/10/04, 162(1–2), S. 19–30. doi: 10.1016/j.virusres.2011.09.022.

Krömmelbein, N. u. a. (2016) „Adenovirus E1A/E1B Transformed Amniotic Fluid Cells Support Human Cytomegalovirus Replication“, *Viruses*, 8(2), S. 37. doi: 10.3390/v8020037.

Kuchipudi, S. V u. a. (2012) „18S rRNA is a reliable normalisation gene for real time PCR based on influenza virus infected cells“, *Virology J*, 9(1), S. 230. doi: 10.1186/1743-422X-9-230.

Kuraoka, I. u. a. (2008) „Isolation of XAB2 complex involved in pre-mRNA splicing, transcription, and transcription-coupled repair“, *J Biol Chem*, 283(2), S. 940–950. doi: 10.1074/jbc.M706647200.

Lakdawala, S. S. u. a. (2014) „Influenza A Virus Assembly Intermediates Fuse in the Cytoplasm“, *PLoS Pathogens*. Herausgegeben von M. T. Heise, 10(3), S. e1003971. doi: 10.1371/journal.ppat.1003971.

Larsen, S. u. a. (2014) „Influenza polymerase encoding mRNAs utilize atypical mRNA nuclear export“, *Virology Journal*, 11(1), S. 154. doi: 10.1186/1743-422X-11-154.

Laske, T. u. a. (2019) „Model-based analysis of influenza A virus replication in genetically engineered cell lines elucidates the impact of host cell factors on key kinetic parameters of virus growth“, *PLOS Computational Biology*.

Ledwith, B. J. u. a. (2006) „Tumorigenicity assessments of Per.C6 cells and of an Ad5-vectored HIV-1 vaccine produced on this continuous cell line.“, *Developments in biologicals*, 123, S. 251-63; discussion 265–6. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16566451> (Zugegriffen: 15. Januar 2018).

Lee, M.-S. und Hu, A. Y.-C. (2012) „A cell-based backup to speed up pandemic influenza vaccine production.“, *Trends in microbiology*, 20(3), S. 103–5. doi: 10.1016/j.tim.2011.12.002.

Li, J. u. a. (2015) „Nucleocytoplasmic Shuttling of Influenza A Virus Proteins“, *Viruses*, 7(5), S. 2668–2682. doi: 10.3390/v7052668.

Li, N. u. a. (2011) „Overexpression of α -2,6 sialyltransferase stimulates propagation of human influenza viruses in Vero cells.“, *Acta virologica*, 55(2), S. 147–53. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21692563> (Zugegriffen: 28. September 2018).

Lieber, M. u. a. (1976) „A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells“, *Int J Cancer*, 17(1), S. 62–70. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/175022>.

Livak, K. J. und Schmittgen, T. D. (2001) „Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.“, *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), S. 402–8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.

Loo, Y.-M. u. a. (2008) „Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity.“, *Journal of virology*, 82(1), S. 335–45. doi: 10.1128/JVI.01080-07.

Ludwig, S. u. a. (2006) „Ringling the alarm bells: signalling and apoptosis in influenza virus infected cells“, *Cell Microbiol.* 2006/02/14, 8(3), S. 375–386. doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00678.x.

Lund, J. M. u. a. (2004) „Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7.“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(15), S. 5598–603. doi: 10.1073/pnas.0400937101.

Ma, W., Kahn, R. E. und Richt, J. A. (2008) „The pig as a mixing vessel for influenza viruses: Human and veterinary implications.“, *Journal of molecular and genetic medicine: an international journal of biomedical research*, 3(1), S. 158–66. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19565018> (Zugegriffen: 15. Dezember 2017).

Maassab, H. F. und Bryant, M. L. (1999) „The development of live attenuated cold-adapted influenza virus vaccine for humans.“, *Reviews in medical virology*, 9(4), S. 237–44. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10578119> (Zugegriffen: 19. Dezember 2017).

Matrosovich, M. u. a. (2003) „Overexpression of the alpha-2,6-sialyltransferase in MDCK cells increases influenza virus sensitivity to neuraminidase inhibitors.“, *Journal of virology*, 77(15), S. 8418–25. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12857911> (Zugegriffen: 28. September 2018).

McSharry, B. P. u. a. (2015) „Abrogation of the interferon response promotes more efficient human cytomegalovirus replication“, *J Virol*, 89(2), S. 1479–1483. doi: 10.1128/JVI.02988-14.

Meliopoulos, V. A. u. a. (2012) „Host gene targets for novel influenza therapies elucidated by high-throughput RNA interference screens“, *The FASEB Journal*, 26(4), S. 1372–1386. doi: 10.1096/fj.11-193466.

Milian, E. und Kamen, A. (2015) „Current and emerging cell culture manufacturing technologies for influenza vaccines“, *Biomed Res Int. Hindawi*, 2015, S. 1–11. doi: 10.1155/2015/504831.

Momose, F. u. a. (2007) „Visualization of microtubule-mediated transport of influenza viral progeny ribonucleoprotein“, *Microbes and Infection*, 9(12–13), S. 1422–1433. doi: 10.1016/j.micinf.2007.07.007.

Mora, R. u. a. (2002) „Apical budding of a recombinant influenza A virus expressing a hemagglutinin protein with a basolateral localization signal.“, *Journal of virology*, 76(7), S. 3544–53. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11884578> (Zugegriffen: 25. Oktober 2018).

Moriya, H. (2015) „Quantitative nature of overexpression experiments.“, *Molecular biology of the cell. American Society for Cell Biology*, 26(22), S. 3932–9. doi: 10.1091/mbc.E15-07-0512.

Mülhardt, C. (2013) *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-642-34636-1.

Nafziger, A. N. und Pratt, D. S. (2014) „Seasonal influenza vaccination and technologies“, *The Journal of Clinical Pharmacology*, 54(7), S. 719–731. doi: 10.1002/jcph.299.

Nayak, D. P. u. a. (2009) „Influenza virus morphogenesis and budding“, *Virus Research*, 143(2), S. 147–161. doi: 10.1016/j.virusres.2009.05.010.

Nayak, D. P., Chambers, T. M. und Akkina, R. K. (1985) „Defective-interfering (DI) RNAs of influenza viruses: origin, structure, expression, and interference.“, *Current topics in microbiology and immunology*, 114, S. 103–51. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3888540> (Zugegriffen: 26. Juli 2018).

Nerome, K. u. a. (1999) „Evaluation of immune responses to inactivated influenza vaccines prepared in embryonated chicken eggs and MDCK cells in a mouse model.“, *Developments in biological standardization*, 98, S. 53-63; discussion 73–4. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10494959> (Zugegriffen: 21. Dezember 2017).

Neumann, G., Noda, T. und Kawaoka, Y. (2009) „Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus.“, *Nature*, 459(7249), S. 931–9. doi: 10.1038/nature08157.

Nieto, A. u. a. (1994) „Complex structure of the nuclear translocation signal of influenza virus polymerase PA subunit“, *Journal of General Virology*. Microbiology Society, 75(1), S. 29–36. doi: 10.1099/0022-1317-75-1-29.

Niklas, J. u. a. (2011) „Quantitative characterization of metabolism and metabolic shifts during growth of the new human cell line AGE1.HN using time resolved metabolic flux analysis“, *Bioprocess Biosyst Eng*, 34(5), S. 533–545. doi: 10.1007/s00449-010-0502-y.

Noda, T. u. a. (2012) „Three-dimensional analysis of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus“, *Nature Communications*, 3, S. 639. doi: 10.1038/ncomms1647.

Noda, T. u. a. (2018) „Importance of the 1+7 configuration of ribonucleoprotein complexes for influenza A virus genome packaging“, *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 9(1), S. 54. doi: 10.1038/s41467-017-02517-w.

Noda, T. und Kawaoka, Y. (2010) „Structure of influenza virus ribonucleoprotein complexes and their packaging into virions“, *Reviews in Medical Virology*, 20(6), S. 380–391. doi: 10.1002/rmv.666.

Noda, T. und Kawaoka, Y. (2012) „Packaging of influenza virus genome: robustness of selection.“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 109(23), S. 8797–8. doi: 10.1073/pnas.1206736109.

Noton, S. L. u. a. (2007) „Identification of the domains of the influenza A virus M1 matrix protein required for NP binding, oligomerization and incorporation into virions.“, *The Journal of general virology*, 88(Pt 8), S. 2280–90. doi: 10.1099/vir.0.82809-0.

Oguin 3rd, T. H. u. a. (2014) „Phospholipase D facilitates efficient entry of influenza virus, allowing escape from innate immune inhibition“, *J Biol Chem*, 289(37), S. 25405–25417. doi: 10.1074/jbc.M114.558817.

Orlich, M., Gottwald, H. und Rott, R. (1994) „Nonhomologous Recombination between the Hemagglutinin Gene and the Nucleoprotein Gene of an Influenza Virus“, *Virology*, 204(1), S. 462–465. doi: 10.1006/viro.1994.1555.

Oymans, J. und te Velthuis, A. J. W. (2017) „A mechanism for prime-realignment during influenza A virus replication“, *Journal of Virology*, S. JVI.01773-17. doi: 10.1128/JVI.01773-17.

Pang, I. K. und Iwasaki, A. (2011) „Inflammasomes as mediators of immunity against influenza virus.“, *Trends in immunology*, 32(1), S. 34–41. doi: 10.1016/j.it.2010.11.004.

Park, F. (2007) „Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis?“, *Physiological Genomics*, 31(2), S. 159–173. doi: 10.1152/physiolgenomics.00069.2007.

Pau, M. G. u. a. (2001) „The human cell line PER.C6 provides a new manufacturing system for the production of influenza vaccines“, *Vaccine*. 2001/03/21, 19(17–19), S. 2716–2721. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11257414> (Zugegriffen: 2. Januar 2018).

Paules, C. und Subbarao, K. (2017) „Influenza“, *Lancet*, 390(10095), S. 697–708. doi: 10.1016/S0140-6736(17)30129-0.

Perdue, M. L. u. a. (2011) „The future of cell culture-based influenza vaccine production“, *Expert Review of Vaccines*, 10(8), S. 1183–1194. doi: 10.1586/erv.11.82.

Perez, J. T. u. a. (2010) „Influenza A virus-generated small RNAs regulate the switch from transcription to replication.“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 107(25), S. 11525–30. doi: 10.1073/pnas.1001984107.

Pérez Rubio, A. und Eiros, J. M. (2018) „Cell culture-derived flu vaccine: Present and future“, *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. Taylor & Francis, 14(8), S. 1874–1882. doi: 10.1080/21645515.2018.1460297.

Petiot, E. u. a. (2011) „Metabolic and kinetic analyses of influenza production in perfusion HEK293 cell culture“, *BMC Biotechnol.* 2011/09/03, 11(1), S. 84. doi: 10.1186/1472-6750-11-84.

Pflug, A. u. a. (2017) „Structural insights into RNA synthesis by the influenza virus transcription-replication machine.“, *Virus research*. Elsevier B.V., 234, S. 103–117. doi: 10.1016/j.virusres.2017.01.013.

Qin, J. Y. u. a. (2010) „Systematic Comparison of Constitutive Promoters and the Doxycycline-Inducible Promoter“, *PLoS ONE*. Herausgegeben von I. A. Hansen. Public Library of Science, 5(5), S. e10611. doi: 10.1371/journal.pone.0010611.

Randall, R. E. und Goodbourn, S. (2008) „Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures“, *Journal of General Virology*. Microbiology Society, 89(1), S. 1–47. doi: 10.1099/vir.0.83391-0.

Rath, D. u. a. (2015) „The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications“, *Biochimie*. Elsevier, 117, S. 119–128. doi: 10.1016/J.BIOCHI.2015.03.025.

Reich, N. u. a. (1988) „Transcription of interferon-stimulated genes is induced by adenovirus particles but is suppressed by E1A gene products“, *J Virol*, 62(1), S. 114–119. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2446013> (Zugegriffen: 15. Januar 2018).

Reich, S. u. a. (2014) „Structural insight into cap-snatching and RNA synthesis by influenza polymerase“, *Nature*. Nature Publishing Group, 516(7531), S. 361–366. doi:

10.1038/nature14009.

Reid, A. H. und Taubenberger, J. K. (2003) „The origin of the 1918 pandemic influenza virus: a continuing enigma“, *Journal of General Virology*, 84(9), S. 2285–2292. doi: 10.1099/vir.0.19302-0.

Roedig, J. V. u. a. (2011) „Impact of host cell line adaptation on quasispecies composition and glycosylation of influenza A virus hemagglutinin.“, *PloS one*. Herausgegeben von A. Moustafa, 6(12), S. e27989. doi: 10.1371/journal.pone.0027989.

Rossman, J. S. und Lamb, R. A. (2011) „Influenza virus assembly and budding“, *Virology*. 2011/01/18, 411(2), S. 229–236. doi: 10.1016/j.virol.2010.12.003.

Le Ru, A. u. a. (2010) „Scalable production of influenza virus in HEK-293 cells for efficient vaccine manufacturing“, *Vaccine*. 2010/03/30. Elsevier, 28(21), S. 3661–3671. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.03.029.

Ryan, E. L., Hollingworth, R. und Grand, R. J. (2016) „Activation of the DNA Damage Response by RNA Viruses.“, *Biomolecules*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 6(1), S. 2. doi: 10.3390/biom6010002.

van der Sanden, S. M. G. u. a. (2016) „Engineering Enhanced Vaccine Cell Lines To Eradicate Vaccine-Preventable Diseases: the Polio End Game“, *Journal of Virology*. Herausgegeben von R. M. Sandri-Goldin, 90(4), S. 1694–1704. doi: 10.1128/JVI.01464-15.

Schwarzer, J. u. a. (2009) „Glycan analysis in cell culture-based influenza vaccine production: influence of host cell line and virus strain on the glycosylation pattern of viral hemagglutinin“, *Vaccine*, 27(32), S. 4325–4336. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.04.076.

Seitz, C. u. a. (2010) „High yields of influenza A virus in Madin-Darby canine kidney cells are promoted by an insufficient interferon-induced antiviral state“, *J Gen Virol*. 2010/04/02, 91(Pt 7), S. 1754–1763. doi: 10.1099/vir.0.020370-0.

Seitz, C. u. a. (2012) „Trypsin promotes efficient influenza vaccine production in MDCK cells by interfering with the antiviral host response“, *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011/09/15, 93(2), S. 601–611. doi: 10.1007/s00253-011-3569-8.

Seok, H. u. a. (2018) „Evaluation and control of miRNA-like off-target repression for RNA interference“, *Cellular and Molecular Life Sciences*. Springer International Publishing, 75(5), S. 797–814. doi: 10.1007/s00018-017-2656-0.

Servant, M. J., Grandvaux, N. und Hiscott, J. (2002) „Multiple signaling pathways leading to the activation of interferon regulatory factor 3.“, *Biochemical pharmacology*, 64(5–6), S. 985–92. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12213596> (Zugegriffen: 4. Januar 2018).

Shao, W. u. a. (2017) „Evolution of Influenza A Virus by Mutation and Re-Assortment.“, *International journal of molecular sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 18(8). doi: 10.3390/ijms18081650.

Shapira, S. D. u. a. (2009) „A physical and regulatory map of host-influenza interactions reveals pathways in H1N1 infection“, *Cell*. 2010/01/13, 139(7), S. 1255–1267. doi: 10.1016/j.cell.2009.12.018.

Shapiro, S. S. und Wilk, M. B. (1965) „An analysis of variance test for normality (complete samples)“, *Biometrika*, 52, S. 591.

Shay, J. W., Wright, W. E. und Werbin, H. (1991) „Defining the molecular mechanisms of human cell immortalization.“, *Biochimica et biophysica acta*, 1072(1), S. 1–7. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1850299> (Zugegriffen: 15. Januar 2018).

Sidorenko, Y. und Reichl, U. (2004) „Structured model of influenza virus replication in MDCK cells.“, *Biotechnology and bioengineering*, 88(1), S. 1–14. doi: 10.1002/bit.20096.

Snijder, B. u. a. (2009) „Population context determines cell-to-cell variability in endocytosis and virus infection.“, *Nature*, 461(7263), S. 520–3. doi: 10.1038/nature08282.

Soema, P. C. u. a. (2015) „Current and next generation influenza vaccines: Formulation and production strategies“, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Elsevier, 94, S. 251–263. doi: 10.1016/J.EJPB.2015.05.023.

Stark, G. R. u. a. (1998) „How cells respond to interferons.“, *Annual review of biochemistry*, 67(1), S. 227–64. doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.227.

Stertz, S. und Shaw, M. L. (2011) „Uncovering the global host cell requirements for influenza virus replication via RNAi screening“, *Microbes Infect.* 2011/02/01, 13(5), S. 516–525. doi: 10.1016/j.micinf.2011.01.012.

Stewart, C. E., Randall, R. E. und Adamson, C. S. (2014) „Inhibitors of the Interferon Response Enhance Virus Replication In Vitro“, *PLoS ONE*. Herausgegeben von S. A. Cormier, 9(11), S. e112014. doi: 10.1371/journal.pone.0112014.

Su, W.-C. u. a. (2013) „Pooled RNAi screen identifies ubiquitin ligase Itch as crucial for influenza A virus release from the endosome during virus entry“, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(43), S. 17516–17521. doi: 10.1073/pnas.1312374110.

Suarez, D. L. u. a. (2004) „Recombination Resulting in Virulence Shift in Avian Influenza Outbreak, Chile“, *Emerging Infectious Diseases*, 10(4), S. 693–699. doi: 10.3201/eid1004.030396.

Tafforeau, L. u. a. (2011) „Generation and comprehensive analysis of an influenza virus polymerase cellular interaction network“, *J Virol.* 2011/10/14, 85(24), S. 13010–13018. doi: 10.1128/JVI.02651-10.

Tapia, F. u. a. (2016) „Bioreactors for high cell density and continuous multi-stage cultivations: options for process intensification in cell culture-based viral vaccine production“, *Applied Microbiology and Biotechnology*. Springer Berlin Heidelberg, 100(5), S. 2121–2132. doi: 10.1007/s00253-015-7267-9.

Thakur, A., Qureshi, A. und Kumar, M. (2017) „vhfRNAi: a web-platform for analysis of host genes involved in viral infections discovered by genome wide RNAi screens“, *Molecular BioSystems*, 13(7), S. 1377–1387. doi: 10.1039/C6MB00841K.

Tijsterman, M. und Plasterk, R. H. . (2004) „Dicers at RISC: The Mechanism of RNAi“, *Cell. Cell Press*, 117(1), S. 1–3. doi: 10.1016/S0092-8674(04)00293-4.

Tong, S. u. a. (2013) „New world bats harbor diverse influenza A viruses“, *PLoS Pathog*, 9(10), S. e1003657. doi: 10.1371/journal.ppat.1003657.

Tran, A. T. u. a. (2013) „Knockdown of specific host factors protects against influenza virus-induced cell death.“, *Cell death & disease*, 4(8), S. e769. doi: 10.1038/cddis.2013.296.

Tran, J. und Kung, S. K. P. (2007) „Lentiviral vectors mediate stable and efficient gene delivery into primary murine natural killer cells.“, *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 15(7), S. 1331–9. doi: 10.1038/sj.mt.6300184.

Tree, J. A. u. a. (2001) „Comparison of large-scale mammalian cell culture systems with egg culture for the production of influenza virus A vaccine strains.“, *Vaccine*, 19(25–26), S. 3444–50. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11348709> (Zugegriffen: 21. Dezember 2017).

Trifonov, V., Khiabani, H. und Rabadan, R. (2009) „Geographic Dependence, Surveillance, and Origins of the 2009 Influenza A (H1N1) Virus“, *New England Journal of Medicine*, 361(2), S. 115–119. doi: 10.1056/NEJMp0904572.

Tripathi, S., White, M. R. und Hartshorn, K. L. (2015) „The amazing innate immune response to influenza A virus infection“, *Innate Immunity*. SAGE PublicationsSage UK: London, England, 21(1), S. 73–98. doi: 10.1177/1753425913508992.

Universität Zürich (2018) *Mann-Whitney-U-Test*. Verfügbar unter: https://www.methodenberatung.uzh.ch/de/datenanalyse_spss/unterschiede/zentral/mann.html (Zugegriffen: 21. Februar 2019).

Velthuis, A. J. W. u. a. (2018) „Mini viral RNAs act as innate immune agonists during influenza virus infection“, *Nature Microbiology*, 3(11), S. 1234–1242. doi: 10.1038/s41564-018-0240-5.

Vigna, E. und Naldini, L. (2000) „Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy“, *The journal of gene medicine*, 2(5), S. 308–316. doi: 10.1002/1521-2254(200009/10)2:5<308::AID-JGM131>3.0.CO;2-3.

Villalón-Letelier, F. u. a. (2017) „Host Cell Restriction Factors that Limit Influenza A Infection.“, *Viruses*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 9(12). doi: 10.3390/v9120376.

Vitenshtein, A. u. a. (2016) „CEACAM1-Mediated Inhibition of Virus Production“, *Cell Reports*, 15(11), S. 2331–2339. doi: 10.1016/j.celrep.2016.05.036.

Vreede, F. T., Jung, T. E. und Brownlee, G. G. (2004) „Model Suggesting that Replication of Influenza Virus Is Regulated by Stabilization of Replicative Intermediates“, *Journal of Virology*, 78(17), S. 9568–9572. doi: 10.1128/JVI.78.17.9568-9572.2004.

Wang, H., La Russa, M. und Qi, L. S. (2016) „CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond“, *Annual Review of Biochemistry*, 85(1), S. 227–264. doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014607.

Wang, L. u. a. (2008) „Characterization of influenza virus variants with different sizes of the non-structural (NS) genes and their potential as a live influenza vaccine in poultry“, *Vaccine*, 26(29–30), S. 3580–3586. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.05.001.

Wang, M. und Veit, M. (2016) „Hemagglutinin-esterase-fusion (HEF) protein of influenza C virus“, *Protein Cell*, 7(1), S. 28–45. doi: 10.1007/s13238-015-0193-x.

Wang, P. u. a. (2009) „Nuclear factor 90 negatively regulates influenza virus replication by interacting with viral nucleoprotein“, *J Virol*, 83(16), S. 7850–7861. doi: 10.1128/JVI.00735-09.

Watanabe, R., Leser, G. P. und Lamb, R. A. (2011) „Influenza virus is not restricted by tetherin whereas influenza VLP production is restricted by tetherin“, *Virology*, 417(1), S. 50–56. doi: 10.1016/j.virol.2011.05.006.

WHO (2007) *A Description of the Process of Seasonal and H5N1 Influenza Vaccine Virus Selection and Development*. Verfügbar unter: http://apps.who.int/gb/pip/pdf_files/Fluvaccvirusselection.pdf?ua=1.

WHO (2018) *Influenza (Seasonal)*. Verfügbar unter: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)) (Zugegriffen: 22. Januar 2019).

van Wielink, R. u. a. (2011) „MDCK cell line with inducible allele B NS1 expression propagates delNS1 influenza virus to high titres“, *Vaccine*, 29(40), S. 6976–6985. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.07.037.

Wiznerowicz, M. und Trono, D. (2003) „Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference.“, *Journal of virology*, 77(16), S. 8957–61. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12885912> (Zugegriffen: 19. Juli 2018).

Wood, J. M. u. a. (1989) „Influenza A (H1N1) vaccine efficacy in animal models is influenced by two amino acid substitutions in the hemagglutinin molecule.“, *Virology*, 171(1), S. 214–21. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2741341> (Zugegriffen: 2. Januar 2018).

World Organisation for Animal Health (2018) *OIE Situation Report for avian influenza (latest update: 31 August 2018)*. Verfügbar unter: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2012/>.

Wressnigg, N. u. a. (2009) „Development of a live-attenuated influenza B DeltaNS1 intranasal vaccine candidate“, *Vaccine*, 27(21), S. 2851–2857. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.02.087.

Wu, W. u. a. (2017) „Development of improved vaccine cell lines against rotavirus“, *Scientific Data*. Nature Publishing Group, 4, S. 170021. doi: 10.1038/sdata.2017.21.

Wurzer, W. J. u. a. (2003) „Caspase 3 activation is essential for efficient influenza virus propagation“, *EMBO J*, 22(11), S. 2717–2728. doi: 10.1093/emboj/cdg279.

Yen, H.-L. (2016) „Current and novel antiviral strategies for influenza infection“, *Current Opinion in Virology*, 18, S. 126–134. doi: 10.1016/j.coviro.2016.05.004.

Yi, E. u. a. (2017) „Enhanced production of enveloped viruses in BST-2-deficient cell lines“, *Biotechnology and Bioengineering*, 114(10), S. 2289–2297. doi: 10.1002/bit.26338.

Young, D. F. u. a. (2003) „Virus replication in engineered human cells that do not respond to interferons“, *J Virol*, 77(3), S. 2174–2181. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12525652> (Zugegriffen: 22. Februar 2018).

Zaiontz, C. (2019) *Mann-Whitney Table, Real Statistics Using Excel*. Verfügbar unter: <http://www.real-statistics.com/statistics-tables/mann-whitney-table/>.

Zhou, A. u. a. (1999) „Interferon action in triply deficient mice reveals the existence of alternative antiviral pathways.“, *Virology*, 258(2), S. 435–440. doi: 10.1006/viro.1999.9738.

Zhou, Z. u. a. (2014) „Fragile X mental retardation protein stimulates ribonucleoprotein assembly of influenza A virus“, *Nat Commun*, 5, S. 3259. doi: 10.1038/ncomms4259.

Zhu, Y., Yongky, A. und Yin, J. (2009) „Growth of an RNA virus in single cells reveals a broad fitness distribution.“, *Virology*, 385(1), S. 39–46. doi: 10.1016/j.virol.2008.10.031.

6.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Aufbau eines Partikels des Influenza-A-Virus	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung des IAV-Replikationszyklus nach dem Viruseintritt..	6
Abbildung 3: vRNP-Verpackungsmodelle.....	10
Abbildung 4: Modell des Knospungsvorganges bei Influenzaviren.	11
Abbildung 5: Übersicht von inaktivierten Influenza-Impfstoffen.	15
Abbildung 6: Herstellung von Virus-Reassortanten für die Influenza-Impfstoffproduktion.	16
Abbildung 7: Schematischer Überblick über die Aktivierung des IFN-Signalwegs durch IAV.	22
Abbildung 8: Vektorkarte für die Herstellung der Knockdownzelllinien.....	43
Abbildung 9: Vektorkarte für die Herstellung der Überexpressionszelllinien.....	43
Abbildung 10: Darstellung der „Kernmaske“	62
Abbildung 11: Darstellung der "Gesamtzellmaske".....	62
Abbildung 12: Aktivierung der antiviralen IFN-Antwort nach IFN- β -Stimulation.....	67
Abbildung 13: Aktivierung der IRF7- und ISG15-Genexpression nach IFN- β -Stimulation.	68
Abbildung 14: Aktivierung der antiviralen Genexpression durch die Infektion mit Influenzavirus A/PR/8/34.....	69
Abbildung 15: Replikation von Influenzavirus A/PR/8/34 in den verwendeten Zelllinien.....	70
Abbildung 16: MxA-Genexpression in E1A- und E1B-Knockdownzelllinien nach IFN- Stimulation.	73
Abbildung 17: Infektion von E1A-Knockdownzellen mit Influenzavirus delNS1.	75
Abbildung 18: Vermehrung von IFN-sensitiven Viren in Ad _t - und nicht-Ad _t Zelllinien.	76
Abbildung 19: Vergleich der Überexpressionskontrollen.....	83
Abbildung 20: Gesamtvirustiterscreening von Überexpressionszelllinien.....	84

Abbildung 21: Gesamtvirustiterscreening von Knockdownzelllinien.	85
Abbildung 22: Gesamtvirustiterscreening von Überexpressionszelllinien.	86
Abbildung 23: Gesamtvirustiterscreening von Knockdownzelllinien.	87
Abbildung 24: Gesamtvirustiter der frühen Infektionsphase von Überexpressionszelllinien. .	88
Abbildung 25: Gesamtvirustiter der frühen Infektionsphase von Knockdownzelllinien.	89
Abbildung 26: Gesamtvirustiter der frühen Infektionsphase von Überexpressionszelllinien. .	90
Abbildung 27: Gesamtvirustiter der frühen Infektionsphase von Knockdownzelllinien.	90
Abbildung 28: Bestimmung der C6orf1- und GRAMD4-Genexpression in Knockdown- und Überexpressionszelllinien.	94
Abbildung 29: Influenzavirus-Produktion in den C6orf1- und GRAMD4-Kontrollzelllinien.....	95
Abbildung 30: Infektioser Virustiter der frühen Infektionsphase von Überexpressionszelllinien.	102
Abbildung 31: Gesamtvirustiter bei einer Infektion mit Influenzavirus A/PR/8/34 und einer MOI von 1.	103
Abbildung 32: GFP-Messung ausgewählter Überexpressionszelllinien mittels Durchflusszytometrie.	105
Abbildung 33: Gesamtvirustiter der frühen und späten Infektionsphase der erzeugten Einzelzell-basierten Zellpopulationen.	108
Abbildung 34: Gesamtvirustiter der frühen und späten Infektionsphase der erzeugten Einzelzell-basierten Zellpopulationen.	109
Abbildung 35: Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Erzeugung der Kombinations-Überexpressionszelllinien.	111
Abbildung 36: Gesamtvirustiter der frühen und späten Infektionsphase der generierten Kombinations-Überexpressionszelllinien.	113
Abbildung 37: Schlüsselreaktionen der Influenzavirus-Replikation.	115
Abbildung 38: Untersuchung der vRNP-Importrate in Überexpressionszelllinien.	116

Abbildung 39: Untersuchung der vRNP-Exportrate in Überexpressionszelllinien.....	117
Abbildung 40: Untersuchung der viralen RNA-Synthese.....	119
Abbildung 41: Virale Proteinexpression in den Überexpressionszelllinien CEACAM6 high und FANCG low.	120

6.3 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Genomstruktur von IAV am Beispiel des Influenzavirus-Stammes A/PuertoRico/8/1934 (A/PR/8/34).....	4
Tabelle 2: Auflistung und Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien.....	30
Tabelle 3: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen.....	31
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Zellkultivierungssysteme.....	32
Tabelle 5: ViCell™ XR Messprotokolle.....	34
Tabelle 6: Verwendete Virusstämme.....	36
Tabelle 7: Eingesetzte Zellzahlen für Infektionen.....	37
Tabelle 8: Eingesetzte Volumina für die Zellzahlbestimmung.....	37
Tabelle 9: Verwendete Trypsinaktivität für die Infektion.....	38
Tabelle 10: Liste der verwendeten siRNA-Sequenzen.....	41
Tabelle 11: Eingesetzte Volumina für die klonale Expansion.....	45
Tabelle 12: Verwendete Primersequenzen.....	48
Tabelle 13: Zusammensetzung RevT-Ansatz Teil 1.....	49
Tabelle 14: Zusammensetzung RevT-Ansatz Teil 2.....	49
Tabelle 15: Zusammensetzung des <i>real-time</i> PCR-Ansatzes.....	50
Tabelle 16: Temperaturprofil der <i>real-time</i> PCR.....	50
Tabelle 17: Verwendete Primersequenzen.....	52
Tabelle 18: Zusammensetzung des RevT-Ansatzes für Proben Teil 1.....	52
Tabelle 19: Zusammensetzung des RevT-Ansatzes für die Standardreihe Teil 1.....	53
Tabelle 20: Zusammensetzung des RevT-Ansatzes für Proben und Standardreihe Teil 2.....	53
Tabelle 21: Temperaturprofil der qPCR von viralen RNAs.....	53

Tabelle 22: Zusammensetzung des RIPA-Stocks.....	55
Tabelle 23: Zusammensetzung RIPA-Lysepuffer.....	56
Tabelle 24: List der verwendeten Antikörper.....	57
Tabelle 25: Zusammensetzung Waschpuffer.....	60
Tabelle 26: Zusammensetzung Blockierungspuffer	61
Tabelle 27: Verwendete Antikörper	61
Tabelle 28: Bestimmung der E1A- und E1B-Genexpression in Ad _t - und nicht-Ad _t -Zelllinien (Einzelexperiment).	72
Tabelle 29: Liste der Überexpressions- und Knockdownkandidaten.	80
Tabelle 30: Ermittlung der mittleren spezifischen Zellwachstumsraten	98
Tabelle 31: Auswirkung der prozentualen Steigerung auf den Gesamtvirustiter	99
Tabelle 32: Bewertung der Überexpressionszelllinien hinsichtlich ihrer Steigerung des Gesamtvirustiters	100
Tabelle 33: Liste der vielversprechenden Überexpressionszelllinien	101
Tabelle 34: GFP-Expression in den Einzelzell-basierten Zellpopulationen.....	105
Tabelle 35: Liste der generierten Kombinations-Überexpressionszelllinien.....	111
Tabelle 36: Bestimmung der GOI-Genexpression in den Kombinations-Überexpressionszelllinien.....	112
Tabelle 37: Formelzeichen / Symbole und Einheiten	162
Tabelle 38: Liste der verwendeten Geräte.....	165
Tabelle 39: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien	166
Tabelle 40: Verwendete Chemikalien und Kits	168
Tabelle 41: Kritische U-Werte.....	170
Tabelle 42: Kleinstmögliche p-Werte (zweiseitig).....	171

Tabelle 43: Übersicht möglicher statistischer Testverfahren172

6.4 FORMELN, SYMBOLE UND EINHEITEN

Formel 1: Gleichung der spezifischen Zellwachstumsrate	35
Formel 2: Gleichung nach Trennung der Variablen und Integration.....	35
Formel 3: Linearisierung der Differentialgleichung.....	35
Formel 4: Berechnung des Saatvirusvolumens	38
Formel 5: Berechnung der benötigten Trypsinmenge	38
Formel 6: Berechnung der Viruspartikel-Konzentration.....	46
Formel 7: Berechnung der relativen Genexpression.....	51
Formel 8: Berechnung der Molekülanzahl	54
Formel 9: Berechnung der Molekülanzahl pro Zelle.....	54
Formel 10: Berechnung der Teststatistik W	64
Formel 11: Berechnung der Prüfgröße U_1	65
Formel 12: Berechnung der Prüfgröße U_2	65

Tabelle 37: Formelzeichen / Symbole und Einheiten

Formelzeichen / Symbole	Beschreibung	Einheit
ϑ	Grad Celsius	[°C]
(v/v)	Volumen in Volumen	[-]
(w/v)	Gewicht in Volumen	[-]
$10^{\frac{CT-b}{m}}$	Moleküle in der <i>real-time</i> PCR	[Moleküle]
a	Aktivität	[U] = [μ mol/min]
b	y-Achsenabschnitt	[-]
b^2	Varianz der Stichprobe unter Normalverteilung	[-]
c (= M)	Stoffmengenkonzentration	[mol/L]
c_{ER}	Konzentration der Erythrozyten	[Zellen/mL]
CT	Schwellenwert	[-]
CT_1	Trypsinaktivität in der Lösung	[U/Zelle]

Formelzeichen / Symbole	Beschreibung	Einheit
CT ₂	Ausgangsaktivität der Trypsinlösung	[U/mL]
CT _{GOI}	CT-Wert des Zielgens in behandelter Probe	[-]
CT _{GOI, Kal}	CT-Wert des Zielgens in Kalibratorprobe	[-]
CT _{REF}	CT-Wert des Referenzgens in behandelter Probe	[-]
CT _{REF, Kal}	CT-Wert des Referenzgens in Kalibratorprobe	[-]
C _{Vit}	Konzentration Lebendzellzahl	[Zellen/mL]
C _{VP}	Konzentration der Gesamtviruspartikel	[Viren/100 µL]
F _{Eluat}	Verdünnungskoeffizient Eluat	[-]
F _{RT}	Verdünnungskoeffizient RevT	[-]
g	Gravitationsfeldstärke	[N/kg] bzw. [m/s ²]
g/L	Gramm pro Liter	[g/L]
g/L	Gramm pro Liter	[g/L]
HA	Gesamtvirustiter	[log HAU/100 µL]
k	Molekulargewicht einer ssRNA-Base	[Da/bp]
m	Atomare Masse	[Da] = [g/mol]
m	Anstieg	[-]
m	Masse	[kg] [kg] = 10 ³ [g] 1 [kg] = 10 ⁶ [mg] 1 [kg] = 10 ⁹ [µg] 1 [kg] = 10 ¹² [ng]
MOI	Multiplizität der Infektion	[Viren/Zelle]
m _{Standard}	eingesetzte Standard-Menge	[ng]
NA	Avogadro Konstante	[mol ⁻¹]
N _{Basen}	Fragmentlänge	[bp]
nm	Nanometer	[nm]
n _{1,2}	Anzahlen der Werte pro Stichprobe	[-]
n _{Moleküle}	Anzahl viraler RNA-Moleküle	[-]
N _{Zellen}	Lebendzellzahl im Kulturgefäß	[Zellen]
n _{ZelleN}	Anzahl der Zellen	[Zellen]
pfu/mL	plaque forming units pro mL	[pfu/mL]
R _{1,2}	Jeweilige Summen aller Rangreihen pro Stichprobe	[-]
SQ _{Probe}	Anzahl der Moleküle pro Zelle	[Moleküle/Zelle]
s _x ²	Nicht korrigierte Stichprobenvarianz	[-]

Formelzeichen / Symbole	Beschreibung	Einheit
t	Zeit	[s] 60 [s] = 1 [min] 3600 [s] = 1 [h]
TCID _{50(SV)}	Konzentration infektiöser Viruspartikel im Saatvirus	[Viren/mL]
U _{1,2}	Prüfgröße U	[-]
v	Volumenaktivität	[U/mL]
V	Volumen	[L] 1 [L] = 10 ³ [mL] 1 [L] = 10 ⁶ [μL]
V _{1xTrypsin/EDTA}	Volumen der 1xTrypsin/EDTA-Lösung	[mL]
V _{ges. Kultivierung}	Gesamtvolumen in dem Kulturgefäß	[mL]
Viren/mL	Infektiöse Viren (TCID ₅₀) pro mL	[Viren/mL]
V _{Medium Stopp}	Volumen des Stopp-Mediums	[mL]
V _{Saatvirus}	Volumen Saatvirus	[mL]
V _{Trypsin}	Volumen Trypsin	[mL]
W _{Probe}	W-Wert der Grundgesamtheit	
λ	Wellenlänge	[m] 1 [m] = 10 ¹ [dm] 1 [m] = 10 ² [cm] 1 [m] = 10 ³ [mm] 1 [m] = 10 ⁶ [μm] 1 [m] = 10 ⁹ [nm]
μ	Spezifische Wachstumsrate	[h ⁻¹]

7 ANHANG

7.1 VERWENDETE GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN

Tabelle 38: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller	Modell
Aufnahmeplatte für PCR Probegefäße	Qiagen Thermo Scientific	Loading Block 96 x 0,2 mL Tubes
Ausschwingrotoren für Kühlzentrifugen	Thermo Scientific	#7591
Ausschwingrotoren für Kühlzentrifugen	Thermo Scientific	#75006444
Ausschwingrotoren für Kühlzentrifugen	Beckman Coulter	JS 4.3
Cell Viability Analyzer	Beckman Coulter	Vi-cell™ XR
Chemoluminiszenz-Imager	Intas	Intas ChemoCam HR 16 3200
CO ₂ -Inkubator	Thermo Scientific	Heracell 150i
DNA/RNA-Elektrophorese - Kamera	Herolab	Easy 429K
DNA/RNA-Elektrophorese - Kammer	Biometra	Agagel Maxi Biometra
DNA/RNA-Elektrophorese - Netzgerät	VWR	Power Source 300V
DNA/RNA-Elektrophorese - UV- Lampe	Gibco	BRL UV Transluminator
Durchflusszytometer	Amnis	Image Stream ^x Mark II
Durchflusszytometer Software	Amnis	INSPIRE
Durchflusszytometer Software	Amnis	IDEAS
Elektrische Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte	Pipetus®
Ex-Kühlschrank (-20°C)	Liebherr	Comfort KKA-G2713-Ex
Festwinkelrotor für Mikrozentrifuge	Thermo Scientific	#75003424
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss	Axio Observer
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Scientific	Hera Freeze
Inversmikroskop	Zeiss	Axio Vert
Kühl-Gefrier-Kombination (4°C, -20°C)	Liebherr	CN 3613 Comfort
Kühlzentrifuge	Thermo Scientific	Heraeus Biofuge Primo R
Kühlzentrifuge	Thermo Scientific	Heraeus Multifuge 3SR+

Gerät	Hersteller	Modell
Kühlzentrifuge	Beckman Coulter	Avanti J20 XP
Mikroliterpipetten, Einkanal	Eppendorf	10 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL, 5000 µL
Mikroliterpipetten, Einkanal	Gilson	Pipetman® 10 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL
Mikroliterpipetten, Mehrkanal	Eppendorf	10 µL, 100 µL, 1200 µL
Mikrozentrifuge	Thermo Scientific	Heraeus Fresco 17
Multipipette	Eppendorf	Multipipette® M4
PCR-Cycler	Qiagen	Rotor-Gene Q
PCR-Cycler Software	Qiagen	Rotor-Gene Qiagen Software
Pipettierroboter	Qiagen	QIAgility
Pipettierroboter Software	Qiagen	QIAgility Software
Plattenphotometer	Tecan	NanoQuant Infinite M200
Plattenphotometer Software	Tecan	i-control 1.6
Protein-Elektrophorese	Biorad	Mini-PROTEAN Electrophoresis System
Reinstwasseranlage	Millipore	Milli-Q® Advantage A10
Rotor-Disc®-Aufnahmeblock	Qiagen	Rotor-Disc® 100 Loading Block
Schlauchpumpe	Neolab	KNF Lab Laboport
Sicherheitswerkbank Klasse II	Thermo Scientific	SAFE 2020
Thermocycler	Biometra	T3000
Versiegelungsgerät für Rotor-Disc®	Qiagen	Rotor-Disc® Heat Sealer
Vortexer	Scientific Industries	Vortex-Genie 2
Western-Blot Equipment	Biorad	Mini Trans-Blot System

Tabelle 39: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Modell
Combitips	Eppendorf	Combitips advanced® 5 mL, 10 mL, 25 mL
Corning® Erlenmeyer Shake Flasks	Corning	125 mL, 250 mL
Einweg- Serologische Pipettenspitzen	Greiner bio-one	CELLSTAR® 1 ml, 2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL

7 ANHANG – VERWENDETE GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Modell
Einweg- Mikroliterpipettenspitzen	Eppendorf	10 µL, 200 µL, 1000 µL, 5000 µL
Einweg- Mikroliterpipettenspitzen	Gilson	Diamond® TiPack 10 µL, 30 µL, 200 µL, 1000µL
Filterspitzen für Pipettierroboter QIAgility	Qiagen	Filter-Tips, 50 µL (960)
Greiner tissue culture treated multiwell plates	Greiner	384-Well
Kryo Lagerungsgefäße, steril	Greiner bio-one	CRYO.S™ 2,0 mL
Pasteurpipetten	Carl Roth	Pasteurpipetten
PCR-Platten	Thermo Scientific	PCR Plate 96 Well 0,2 mL Rundboden
Probenaufnahmering (PCR)	Qiagen	Rotor-Disc™100
Probengefäße für das Vi- Cell™XR	Beckman Coulter	Vi-Cell™ Sample Cups
Reaktionsgefäße mit Klippverschluss, steril	Greiner bio-one	1,5 mL, 2,2 mL
Reaktionsgefäße mit Klippverschluss, steril	Sarstedt	Multiply® 0,2 mL
Reaktionsgefäße mit Schraubverschluss, steril	Greiner bio-one	CELLSTAR® 15 mL, 50 mL
Schottflaschen	Duran Group	Duran® 100 ml, 250 mL, 500 mL, 1000 mL, 2000 mL
Schutzfolie für Rotor-Disc™	Qiagen	Rotor-Disc™ Heat Sealing Film
TubeSpin® Bioreactors	TPP	TubeSpin® Bioreactor 50
Verschlusskappen für PCR- Platten	Thermo Scientific	Flat 8 Cap Strips
Verschlussring für Rotor-Disc™	Qiagen	Rotor-Disc™ 100 Locking Ring
Zellkulturflaschen	Greiner bio-one	CELLSTAR® 25 cm², 75 cm², 175 cm²
Zellkulturplatten	Greiner bio-one	CELLSTAR® 6-Well, 12-Well, 24-well, 96-Well (Rundboden, Flachboden)

7.2 VERWENDETE CHEMIKALIEN UND KITS

Tabelle 40: Verwendete Chemikalien und Kits

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
Acrylamid 30% (Mix 37, 5:1)	Applichem	A3626,1000
Agarose	AppliChem	A2114,1000
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Merck	2300
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific	23227
Bovine Serum Albumine (BSA)	AppliChem	A1391,0100
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Merk	105109
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck	106566
DNA Ladepuffer (6x)	Fermentas	R0611
dNTPs	Fermentas	R0191
EDTA	Sigma-Aldrich	EDS-100g
Essigsäure	Carl Roth	3738,1
Ethanol	Carl Roth	9065,4
FCS	Pan Biotech	10270-106
GeneRuler™ DNA Ladder Mix, ready to use	Fermentas	SM0333
Glycerol	Carl Roth	3783,1
Isopropanol	Merck	1096342511
Kaliumchlorid	Merck	1049355000
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	104872
L-Glutamin	Merck	1002891000
Lipofecatamie LTX	Invitrogen/Life Technologies	15338-100
MagicMarker®Protein Ladder	Invitrogen	LC5602
Methanol	Carl Roth	CP43.1
Milchpulver	Carl Roth	T145.1
N,N,N',N',-Tetramethylethane-1,2-Diamin (TEMED)	GE Healthcare	17-1312-01
Natriumchlorid	Carl Roth	P029.3
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich	S7920
NTP Set, 100 mM	Fermentas	R0481
NucleoSpin® RNA II	Macherey-Nagel	740955250
NucleoSpin® RNA Virus	Macherey-Nagel	740956250
Pepton	Lab M limited	LAB204
Proteaseinhibitor Mix	Roche	11697498001
PVDF-Membran	Millipore	IPVH00010
Random Hexamer Primer	Fermentas	SO142

7 ANHANG – VERWENDETE CHEMIKALIEN UND KITS

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
RevertAid™ H Minus Reverse Transkriptase	Fermentas	EP0451
RiboLock™ RNase Inhibitor	Fermentas	EO0382
Roti-Safe GelStain	Carl Roth	3865
Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit	Qiagen	204076
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem	A2263,0100
SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrat	Thermo Scientific	34075
Tris-Cl	Applichem	A3452
Trypsin	Gibco	1188797
Tween 20	Merck	655204-100ML
β-Mercaptoethanol	Merck	444203

7.3 ANLAGEN STATISTIK

7.3.1 KRITISCHE U-WERTE

Tabelle 41: Kritische U-Werte (Zaiontz, 2019)

$n_1 \backslash n_2$	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
2							0	0	0	0	1	1	1	1	1	2	2	2	2
3				0	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	8
4			0	1	2	3	4	4	5	6	7	8	9	10	11	11	12	13	14
5		0	1	2	3	5	6	7	8	9	11	12	13	14	15	17	18	19	20
6		1	2	3	5	6	8	10	11	13	14	16	17	19	21	22	24	25	27
7		1	3	5	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34
8	0	2	4	6	8	10	13	15	17	19	22	24	26	29	31	34	36	38	41
9	0	2	4	7	10	12	15	17	20	23	26	28	31	34	37	39	42	45	48
10	0	3	5	8	11	14	17	20	23	26	29	33	36	39	42	45	48	52	55
11	0	3	6	9	13	16	19	23	26	30	33	37	40	44	47	51	55	58	62
12	1	4	7	11	14	18	22	26	29	33	37	41	45	49	53	57	61	65	69
13	1	4	8	12	16	20	24	28	33	37	41	45	50	54	59	63	67	72	76
14	1	5	9	13	17	22	26	31	36	40	45	50	55	59	64	69	74	78	83
15	1	5	10	14	19	24	29	34	39	44	49	54	59	64	70	75	80	85	90
16	1	6	11	15	21	26	31	37	42	47	53	59	64	70	75	81	86	92	98
17	2	6	11	17	22	28	34	39	45	51	57	63	69	75	81	87	93	99	105
18	2	7	12	18	24	30	36	42	48	55	61	67	74	80	86	93	99	106	112
19	2	7	13	19	25	32	38	45	52	58	65	72	78	85	92	99	106	113	119
20	2	8	14	20	27	34	41	48	55	62	69	76	83	90	98	105	112	119	127

21	3	8	15	22	29	36	43	50	58	65	73	80	88	96	103	111	119	126	134
22	3	9	16	23	30	38	45	53	61	69	77	85	93	101	109	117	125	133	141
23	3	9	17	24	32	40	48	56	64	73	81	89	98	106	115	123	132	140	149
24	3	10	17	25	33	42	50	59	67	76	85	94	102	111	120	129	138	147	156
25	3	10	18	27	35	44	53	62	71	80	89	98	107	117	126	135	145	154	163
26	4	11	19	28	37	46	55	64	74	83	93	102	112	122	132	141	151	161	171
27	4	11	20	29	38	48	57	67	77	87	97	107	117	127	137	147	158	168	178
28	4	12	21	30	40	50	60	70	80	90	101	111	122	132	143	154	164	175	186
29	4	13	22	32	42	52	62	73	83	94	105	116	127	138	149	160	171	182	193
30	5	13	23	33	43	54	65	76	87	98	109	120	131	143	154	166	177	189	200
31	5	14	24	34	45	56	67	78	90	101	113	125	136	148	160	172	184	196	208
32	5	14	24	35	46	58	69	81	93	105	117	129	141	153	166	178	190	203	215
33	5	15	25	37	48	60	72	84	96	108	121	133	146	159	171	184	197	210	222
34	5	15	26	38	50	62	74	87	99	112	125	138	151	164	177	190	203	217	230
35	6	16	27	39	51	64	77	89	103	116	129	142	156	169	183	196	210	224	237
36	6	16	28	40	53	66	79	92	106	119	133	147	161	174	188	202	216	231	245
37	6	17	29	41	55	68	81	95	109	123	137	151	165	180	194	209	223	238	252
38	6	17	30	43	56	70	84	98	112	127	141	156	170	185	200	215	230	245	259
39	7	18	31	44	58	72	86	101	115	130	145	160	175	190	206	221	236	252	267
40	7	18	31	45	59	74	89	103	119	134	149	165	180	196	211	227	243	258	274

7.3.2 KLEINSTMÖGLICHE P-WERTE (ZWEISEITIG)

Tabelle 42: Kleinstmögliche p-Werte (zweiseitig) (Forero, 2013)

	n2 = 2	n2 = 3	n2 = 4	n2 = 5	n2 = 6	n2 = 7	n2 = 8	n2 = 9	n2 = 10
n1 = 2	0.3333								
n1 = 3	0.2000	0.1000							
n1 = 4	0.1333	0.0571	0.0286						
n1 = 5	0.0952	0.0357	0.0159	0.0079					
n1 = 6	0.0714	0.0238	0.0095	0.0043	0.0022				
n1 = 7	0.0556	0.0167	0.0061	0.0025	0.0012	0.0006			
n1 = 8	0.0444	0.0121	0.0040	0.0016	0.0007	0.0003	0.0002		
n1 = 9	0.0364	0.0091	0.0028	0.0010	0.0004	0.0002	0.0001	0.0000	
n1 = 10	0.0303	0.0070	0.0020	0.0007	0.0002	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000
n1 = 11	0.0256	0.0055	0.0015	0.0005	0.0002	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000
n1 = 12	0.0220	0.0044	0.0011	0.0003	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
n1 = 13	0.0190	0.0036	0.0008	0.0002	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
n1 = 14	0.0167	0.0029	0.0007	0.0002	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
n1 = 15	0.0147	0.0025	0.0005	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

7.3.3 ÜBERSICHT MÖGLICHER STATISTISCHER TESTVERFAHREN

Tabelle 43: Übersicht möglicher statistischer Testverfahren (Keller, 2012)

	Parametrisch	Nichtparametrisch
Daten	normalverteilt	nicht normalverteilt
Vergleich von 2 unabhängigen Stichproben	t-Test	Mann-Whitney-U Test
Vergleich von 2 abhängigen Stichproben	gepaarter t-Test	Wilcoxon Paarvergleichstest
Vergleich von mehr als 2 unabhängigen Stichproben	einfaktorielle Varianzanalyse	Kruskal-Wallis-Test
Vergleich von mehr als 2 abhängigen Stichproben	Varianzanalyse mit Messwiederholungen	Friedman-Test
Korrelation zwischen 2 Stichproben	Pearson-Korrelation	Spearman-Korrelation

7.4 ARBEITSANWEISUNGEN

SOP V/05 HEMAGGLUTINATION ASSAY (HA ASSAY)

Datum: 04.12.2006 Autor: Bernd Kalbfuß

SOP V/08: BESTIMMUNG DES TCID50

Datum: 02.06.2008 Autor: Ilona Behrendt

geändert: 23.03.2010 Autor: Verena Lohr

SOP MoBi/01: WESTERN BLOT MIT ANSCHLIEßENDER IMMUNDETEKTION

Datum: 13.02.2009 Autor: Nancy Wynserski

geändert: 07.07.2010 Autor: Björn Heynisch

SOP MoBi/02: PREPARATION OF RNA STANDARDS

Datum: 30.03.2016 Autor: Mandy Bachmann