

**Aus dem Institut für  
Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Vorstand: Prof. Dr. Manfred Stangassinger

Arbeit angefertigt unter der Leitung von

Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

# **Der Einfluss des Interferonsystems bei der Infektion mit aviärer Influenza im Haushuhn**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Carsten Krohmann  
aus Hoppenwalde

München 2010

Gedruckt mit Genehmigung der tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Referent: Univ.-Prof. Dr. Kaspers

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Korbel

Tag der Promotion: 13. Februar 2010

*Meiner Familie*

## INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VIII
<b>I EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II ZIELSETZUNG .....</b>	<b>3</b>
<b>III LITERATURÜBERSICHT.....</b>	<b>4</b>
1. INFLUENZA: ÜBERSICHT.....	4
2. INFLUENZA BEIM VOGEL.....	9
2.1 <i>Influenza in Gänsevögeln → Ordnung Anseriformes</i> .....	11
2.1.1 Klinische Symptome:.....	11
2.1.2 Pathologie.....	12
2.2 <i>Influenza in Tauben → Ordnung Columbiformes</i> .....	12
2.2.1 Klinische Symptome:.....	12
2.2.2 Pathologie:.....	13
2.3 <i>Influenza bei Papageienvögeln → Ordnung Psittaciformes</i> .....	13
2.4 <i>Influenza in Laufvögeln → Ordnung Struthioniformes</i> .....	14
2.4.1 Klinische Symptome:.....	14
2.5 <i>Influenza in Hühnervögeln → Ordnung Galliformes</i> .....	14
2.5.1 Klinische Symptome:.....	14
2.5.2 Läsionen:.....	15
2.6 <i>HPAIV im Huhn</i> .....	15
3. CHRONOLOGIE DER AIV.....	19
4. DAS ANGEBORENE IMMUNSYSTEM UND VIREN, IM BESONDEREN INFLUENZA-VIREN.....	27
5. DAS INTERFERON-SYSTEM.....	32
5.1 <i>Das IFN-System von Vögeln</i> .....	34
6. DIE ROLLE DES INTERFERON-SYSTEMS IN DER INFLUENZA-VIRUSINFEKTION BEIM HUHN.....	36
<b>IV MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>39</b>
1. TIERE UND HALTUNG.....	39
2. GEWINNUNG VON LEUKOZYTEN AUS DER MILZ.....	39
3. GEWINNUNG VON LEUKOZYTEN AUS DEM BLUT.....	40
4. GEWINNUNG VON GEWEBEPROBEN FÜR DEN IFN-PROTEINNACHWEIS.....	40
5. GEWINNUNG VON PLASMAPROBEN FÜR DEN IFN-PROTEINNACHWEIS.....	41
6. KULTIVIERUNG DER ZELLEN.....	41
6.1 <i>Medien und Zusätze</i> .....	41
6.2 <i>Zelllinie CEC32</i> .....	42
6.3 <i>Zelllinie CEC511</i> .....	42
7. VERWENDETE TLR-LIGANDEN.....	42

7.1	<i>Peptidoglycan von Staphylococcus aureus (PGN-SA)</i> .....	42
7.2	<i>CpG-Motive Typ B (ODN 2006)</i> .....	42
7.3	<i>Synthetisches Analogon von doppelsträngiger RNA (Poly I:C)</i> .....	42
7.4	<i>Gereinigtes Lipopolysaccharid von Escherichia coli (LPS)</i> .....	42
7.5	<i>Gereinigtes Flagellin von Staphylococcus thymurium</i> .....	42
7.6	<i>Synthetischer Ligand für TLR7/8 (R848)</i> .....	43
7.7	<i>Endotoxinfreie bakterielle DNA von Escherichia coli</i> .....	43
7.8	<i>Muramyl dipeptide - MDP</i> .....	43
8.	VERWENDETE ANTIKÖRPER .....	43
9.	VERWENDETE VIREN .....	43
9.1	<i>Vesikulostomatitisvirus</i> .....	43
9.2	<i>Newcastle Disease-Virus (Attenuiertes Impfvirus)</i> .....	43
9.3	<i>Influenza Viren</i> .....	43
9.3.1	Anzucht der Viren .....	43
9.3.2	R65wt –Virus und rec. R65wt-Virus .....	44
9.3.3	R65delNS1-Mutante .....	44
10.	BIOLOGISCH AKTIVE PROTEINE .....	44
10.1	<i>Interferon</i> .....	44
10.2	<i>Kontrollprotein</i> .....	45
11.	LISTE DER PUFFER UND REAGENZIEN .....	45
11.1	<i>n-Heptan</i> .....	45
11.2	<i>Heparin</i> .....	45
11.3	<i>0,5M NaOH-Lösung</i> .....	45
11.4	<i>Ethanol 75%</i> .....	45
11.5	<i>Biocoll Separating Solution 500mL</i> .....	45
11.6	<i>Luciferase Assay Reagent 1000 Assays</i> .....	45
11.7	<i>Neutralrotlösung</i> .....	45
11.8	<i>Basal Iscove Medium</i> .....	46
11.9	<i>DMEM High Glucose</i> .....	46
11.10	<i>RPMI 1640 with Glutamax</i> .....	46
11.11	<i>Chicken Serum New Zealand</i> .....	46
11.12	<i>FBS Superior</i> .....	46
11.13	<i>Penicillin/Streptomycin</i> .....	46
11.14	<i>G418 BC Lösung</i> .....	46
11.15	<i>Trypanblau 0,5%</i> .....	46
11.16	<i>PBS</i> .....	46
11.17	<i>Guanidinhydrochlorid 3M</i> .....	47
11.18	<i>Einfriermedium</i> .....	47

11.19	Trypsin-EDTA .....	47
12.	ANTIVIRALER BIOASSAY AUF CEC32-ZELLEN (SIEHE IV6.2) .....	47
13.	IFN-REPORTERGENASSAY AUF CEC511-ZELLEN (SIEHE IV6.3) .....	48
13.1	Messung im Lumat LB 9501 .....	49
13.2	Messung im Glomax 96 Microplate Luminometer .....	49
13.3	Auswertung Reporteragenassay .....	49
14.	DURCHFÜHRUNG DER INTRATRACHEALEN APPLIKATION .....	50
15.	DURCHFÜHRUNG DER OCULONASALEN APPLIKATION .....	50
16.	DURCHFÜHRUNG DER INTRAVENÖSEN APPLIKATION .....	50
16.1	Applikation über die Vena jugularis .....	50
16.2	Applikation über die Vena basilica .....	51
17.	DURCHFÜHRUNG DER LUNGENLAVAGE .....	51
18.	TIERVERSUCHSGENEHMIGUNGEN .....	52
18.1	Tierversuche in München .....	52
18.2	Tierversuche auf Riems .....	52
<b>V</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>53</b>
1.	IN VITRO UNTERSUCHUNGEN .....	53
1.1	Titration des Standards auf CEC511-Zellen .....	53
1.2	Messung verschiedener Interferone im Reporteragenassay .....	55
1.3	Untersuchungen zur Spezifität des Reporteragenassays .....	56
1.4	Induktion der Interferon-Synthese durch Toll-like-Rezeptor-Liganden und Newcastle Disease-Virus in vitro .....	57
1.5	Titration von Newcastle Disease-Virus auf Milzleukozyten .....	59
1.6	Analyse der Kinetik der IFN-Bildung durch Milzleukozyten nach einer NDV-Infektion ....	60
1.7	Prüfung einer virusbedingten Aktivierung der Reporteragenzellen .....	61
1.8	Untersuchung zur Mindesteinwirkzeit von Typ-I-Interferonen zur Aktivierung eines antiviralen Schutzes .....	63
2.	IN VIVO UNTERSUCHUNGEN .....	64
2.1	Versuch zur Induktion der Interferonbildung nach Stimulation mit Newcastle Disease- Virus in vivo .....	64
2.2	Kinetik der Interferon-Synthese nach Infektion mit NDV .....	69
2.3	Prüfung des Nachweises von Interferonen in Lungenlavageflüssigkeit .....	71
2.4	Versuch zur Ermittlung der Ausscheidungskinetik extern zugeführten Interferons .....	72
3.	UNTERSUCHUNGEN ZUR ROLLE DES IFN-SYSTEMS BEI DER INFLUENZA-INFektion .....	73
3.1	Krankheitsverlauf bei Hühnern nach Infektion mit dem R65-Virus .....	73
3.2	Versuch zur Induktion der Interferonbildung nach Stimulation mit dem R65-Virus in vivo 74	
3.2.1	Charakterisierung des gebildeten Interferons .....	77

3.3	Versuche zur Induktion eines antiviralen Status durch Behandlung mit Typ-I-Interferonen 78	
3.3.1	Vorbehandlung durch intratracheale Applikation von Interferon .....	78
3.3.2	Behandlung durch intravenöse Applikation von Interferon.....	80
3.4	Untersuchungen zur Rolle des NS1-Proteines.....	82
<b>VI</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>86</b>
1.	GRUNDLAGEN ZUR UNTERSUCHUNG DES IFN-SYSTEMS ( <i>IN VIVO</i> UND <i>IN VITRO</i> ).....	86
2.	REAKTION DES HUHNES AUF INFESTIONEN MIT HPAIV .....	90
3.	BEHANDLUNG MIT IFN .....	91
4.	UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES DES NS1-PROTEINS .....	94
<b>VII</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>97</b>
<b>VIII</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>99</b>
<b>IX</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>101</b>
<b>X</b>	<b>LISTE DER VERWENDETEN GERÄTE UND MATERIALIEN .....</b>	<b>118</b>
1.	KÜHLSCHRÄNKE .....	118
2.	GEFRIERSCHRÄNKE .....	118
3.	STERILWERKBÄNKE.....	118
4.	ABZÜGE .....	118
5.	CO <sub>2</sub> -INKUBATOREN.....	118
6.	ZENTRIFUGEN.....	119
7.	VORTEXER .....	119
8.	WASSERBÄDER .....	119
9.	MIKROSKOPE .....	119
10.	PIPETTEN.....	119
11.	ABSAUGPUMPE.....	120
12.	WAAGEN.....	120
13.	HOMOGENISATOREN .....	120
14.	MEßGERÄTE.....	120
15.	SONSTIGE .....	120
16.	VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	120
<b>XI</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>123</b>
<b>XII</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>127</b>
<b>XIII</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>128</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
2'-5' OAS	2'-5' oligoadenylate synthetase
AG	Antigen
AI	Aviäre Influenza
AIV	Aviäres Influenza-Virus
AK	Antikörper
APOBEC 3G	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like editing complex 3G
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
CCL2 (MCP-1)	Chemokine (C-C motif) ligand 2
CEC32-Zellen	Wachtelfibroblastenlinie
CEC511-Zellen	Wachtelfibroblastenlinie mit Luciferase-Gen
CEF	chicken embryo fibroblasts
ch	chicken
chS	Hühnerserum
chTLR7	chicken toll-like-receptor-7
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CPE	cytopathischer Effekt
CpG-Motive	nicht methylierte DNA-Sequenzen, welche im Zentrum ein CG-Dinukleotid aufweisen
DAI	DNA-dependent activator of IRFs
del.	deletiert
dest.	destilliert
DIC	disseminierte intravasale Koagulopathie
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium, standardisiertes Nährmedium für die Zellkultur
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease, ein Enzym zur Katalyse der Hydrolyse von Desoxyribonukleinsäure-Molekülketten
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EID <sub>50</sub>	Eiinfektiöse Dosen 50, Konzentration an Virus bei der 50% der infizierten Eier darauf reagieren
eIF2 $\alpha$	eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$
EMCV	Encephalomyocarditis-Virus
Eppi	Laborkurzbezeichnung für ReagiergefäÙe in verschiedenen Größen
FBS	fetales Kälberserum
FLI	Friedrich-Löffler-Institut oder Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit (Greifswald - Insel Riems)
Fv	Friend Virus Komplex
g	Konstante der Fallbeschleunigung
GCN2	general control non derepressible 2
ggf.	gegebenenfalls
GTPasen	Guanisintriphosphat spaltende Enzyme
h	Stunde
H5N1-Virus	Influenza-Virus vom Subtyp Haemagglutinin 5 und Neuraminidase 1
H7N7-Virus	Influenza-Virus vom Subtyp Haemagglutinin 7 und Neuraminidase 7
HA	Haemagglutinin
HPAI	Hochpathogene Aviäre Influenza
HPAIV	Hochpathogenes Aviäres Influenza-Virus
hu	human
i. d. R.	in der Regel
i.t.	intratracheal
i.v.	intravenös
IFN	Interferon
IL 1 $\beta$ /4/6/8/15/18	Interleukin 1 $\beta$ /4/6/8/15/18
IP-10 (CXCL10)	interferon-gamma-induced protein 10
IRF 1/3/7/10	interferon regulatory factor 1/3/7/10
IVI	Institut für Viruskrankheiten und Immunprophylaxe (Mittelhäusern, Schweiz)
JAK	Janus kinase
L3+	Sicherheitsstufe in Laboratorien
LD <sub>50</sub>	Letaldosis 50, Dosis an Virus bei der 50% der Tiere sterben
LPAIV	Niedrigpathogenes Aviäres Influenza-Virus
LPS	Lipopolysaccharide
Lsg.	Lösung
M	Molar
M11	Hühnerlinie

M2	Protonenpumpe von Influenza-Viren
MAB	monoklonaler Antikörper
MALP	MyD88 adapter-like protein(= TIRAP= TIR-domain containing adaptor protein )
max.	maximal
MDA-5	melanoma differentiation-associated gene-5
MDP	Muramyldipeptide
MgCL <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
Min	Minuten
min.	mindestens
MIP 1 $\alpha$ /1 $\beta$	Macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$ /1 $\beta$
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOI	multiplicity of infection
MW	Mittelwert
Mx-Protein	Protein mit antiviralen Eigenschaften welches bei Vorhandensein von IFN exprimiert wird
MyD88	myeloid differentiation primary response gene (88)
NA	Neuraminidase
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NDV	Newcastle Disease-Virus
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor $\kappa$ B
nm	Nanometer
nM	Nano-Molar
NP	Nucleoprotein
Nr.	Nummer
NS 1/2	Nichtstrukturprotein 1/2
OD	optische Dichte
OIE	Office International des Epizooties (World organisation for animal health)
p.i.	post infectionem
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
part.	partiell
PB1/2	Polymerasekomplex 1/2
PB1-F2	spezielle Form des Polymerasekomplex 1
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
Pen / Strep	Penicillin/Streptomycin
PGN-SA	Peptidoglycan von Staphylococcus aureus
pH-Wert	potentia Hydrogenii

PKR	Proteinkinase R
pmol	Pico-mol
Poly(I:C)	synthetisches Analogon von doppelsträngiger RNA
PRR	pattern recognition receptors
qRT-PCR	quantitative Realtime-Polymerasekettenreaktion
R65-Virus	FLI-Bezeichnung für spezielles Influenza-Virus (HPAIV A/Cygnus cygnus/Ruegen-Germany/2006) (H5N1)
R848	Imidazoquinoline Resiquimod, TLR-Ligand
RANTES ( CCL5)	Regulated on Activation Normal T Expressed and Secreted
rec.	rekombinant
RIG-I	retinoic acid-induceable gene
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease, ein Enzym zur Katalyse der Hydrolyse von Ribonukleinsäure-Molekülketten
RNase L	interferon-induced ribonuclease L
rpm	Runden in der Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SARS-CoV	severe acute respiratory syndrome-Corona-Virus
SC35-Virus	allgemeine Bezeichnung für spezielles Influenza-Virus (Influenza A/Seal/Massachussets/1/80) (H7N7)
SFV	Semliki Forrest-Virus
SPF	speziell pathogenfrei
spp.	species pluralis
STABW	Standardabweichung
STAT	signal transducer and activator of transcription
TLR 3/7/8/9	Toll-Like-Rezeptoren-3/7/8/9
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TRAM	TRIF-related-adaptor-molecule
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$
TRIM	Tripartite Motif
U	Units
u. a.	unter anderem
USA	United Staates of America
VSV	Vesikulostomatitisvirus
WHO	World Health Organisation
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

## I Einleitung

Virale Infektionserkrankungen haben große ökonomische Bedeutung in der Geflügelwirtschaft. Dies gilt insbesondere für Zoonoseerreger wie den Influenza-Viren. Die 2006 erstmals in Deutschland aufgetretenen Infektionen mit dem hochpathogenen H5N1-Influenza-Virus haben gezeigt, dass unser Wissen über die Interaktion dieser Viren mit dem Immunsystem des Huhns sehr begrenzt ist. Infektionen mit diesem Virus verlaufen akut. Entsprechend kann davon ausgegangen werden, dass insbesondere die Mechanismen der unspezifischen Abwehr eine Rolle im Abwehrgeschehen spielen und dass diese möglicherweise auch Ziel einer Immunevasionsstrategie des Virus sind.

Interferone (IFNs) wurden erstmals 1957 beim Huhn als ein Faktor beschrieben, der Embryonen vor einer Virusinfektion schützen kann. Die Forschung über das Interferonsystem hat sich aber rasch auf das Mausmodell verlagert. So konnte in den letzten Jahren klar gezeigt werden, dass dieses für die frühe Kontrolle von Influenza-Virusinfektionen von zentraler Bedeutung ist. Mäuse, denen der Typ I-Interferonrezeptor fehlt, sind hochgradig empfänglich für Influenza-Virusinfektionen. Entsprechend gelingt es auch, Mäuse durch Behandlung mit Interferon vor Infektionen mit hochpathogenen Influenza-Viren vollständig zu schützen. Auch Vögel besitzen ein den Säuger-Interferonen vergleichbares System. Beschrieben wurden bisher sowohl Typ-I-IFNs, Typ-II-IFNs als auch Typ-III-IFNs, für welche *in vitro* antivirale Aktivitäten nachgewiesen werden konnten. Für das zu den Typ-I-Interferonen zählende IFN- $\alpha$  wurden zudem *in vivo* Studien durchgeführt, die dessen funktionelle Relevanz bei Newcastle Disease-Virus und Rous-Sarcoma-Virus-Infektionen aufzeigten. Kürzlich wurden auch Arbeiten publiziert, die sich mit der Induktion der IFN-Gene nach Influenza-Virusinfektionen beschäftigen. Die Ergebnisse sind bisher uneinheitlich. Während einige Arbeitsgruppen eine deutliche Induktion von IFN auf transkriptionaler Ebene zeigen konnten, fanden andere nur eine schwache Geninduktion. Diese Daten sagen aber nur wenig über die tatsächliche Funktion von IFN im Huhn aus.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Reaktion und die Funktion des Interferonsystems beim Huhn umfassender zu untersuchen. Dabei sollte nicht der Nachweis von Transkripten, sondern die Quantifizierung des biologisch aktiven

IFNs im Vordergrund der Arbeit stehen. Um grundlegende Parameter erarbeiten zu können, sollten zunächst *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen durchgeführt werden. Diese sollten im Weiteren durch Untersuchungen an mit H5N1-Virus infizierten Hühnern ergänzt werden. Analog zu den Arbeiten an Mäusen und Frettchen sollte auch geklärt werden, ob IFN- $\alpha$  in der Lage ist, Hühner vor einer Infektion mit dem hochpathogenen H5N1-Virus zu schützen.

## **II Zielsetzung**

Wie zuvor aufgeführt, existieren in der Literatur nur vereinzelte Berichte zur Rolle des Typ-I-IFN-Systems bei Influenza-Virusinfektionen des Huhns. Dies gilt insbesondere für Infektionen mit dem HPAIV H5N1. Die publizierten Arbeiten beschränken sich zudem auf den Nachweis von Genexpressionsunterschieden. Biologisch aktives IFN und seine Wirkung im Huhn wurde bisher nicht untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher Methoden zu etablieren und anzuwenden, welche weiteren Aufschluss über die IFN-Funktion im Huhn liefern. Da Arbeiten mit HPAIV nur unter höchsten Sicherheitsstandards möglich sind, sollten grundlegende Fragen zur IFN-Reaktion des Huhns und zum Nachweis biologisch aktiven IFNs in Plasma und Organen mit Hilfe eines NDV Lebendimpfstoffes erarbeitet werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten diese Verfahren dann bei H5N1-Virus infizierten Tieren zur Anwendung kommen. Die folgenden Fragestellungen sollten bearbeitet werden:

- Induziert das H5N1-Virus eine IFN-Reaktion im Huhn?
- Wie ist der Verlauf einer solchen Reaktion?
- Welche IFN-Induktionskinetik zeigen Infektionen mit einem H5N1-Virus mit deletiertem NS1-Protein?
- Kann IFN Hühner vor einer AIV-Infektion schützen?

### III Literaturübersicht

#### 1. Influenza: Übersicht

Bei den Influenza-Viren handelt es sich um Einzelstrang-RNA-Viren der Familie Orthomyxoviridae, welche in drei (A, B, C) sowohl phylogenetisch als auch antigenetisch verschiedene Gattungen unterteilt werden. Von diesen drei Gattungen kommt den Influenza-A-Viren das größte Gefährdungspotential zu. Sie besitzen die größte genetische Vielfalt, sind in der Lage ein breiteres Wirtsspektrum zu infizieren und sind die Ursache für die meisten humanen Influenza-Virusinfektionen.

Jedes Jahr aufs Neue treten Epidemien bei Menschen, Säugetieren und auch Vögeln auf. So werden für die USA jährlich Zahlen von 200 000 Krankenhausaufenthalten und rund 41 000 Todesfällen aufgrund von humanen Influenza-Virusinfektionen genannt [1]. Darüber hinaus gab es im 20. Jahrhundert drei große Influenza-Pandemien, die „Spanische Grippe“ von 1918, bei der mehr als 20 Millionen Menschen weltweit ihr Leben verloren, die „Asiatische Grippe“ von 1957 und die „Hongkong-Grippe“ von 1968, an denen alleine in den USA mehr als eine halbe Million Menschen starben. Die Ursache für die starke Virulenz einiger Influenza-Viren im Vergleich zu anderen liegt in vier der acht Gene begründet.

1. Das Oberflächenprotein Haemagglutinin (HA), an Hand dessen man 16 Subtypen von Influenza-Viren unterscheidet.
2. Das Oberflächenprotein Neuraminidase (NA), durch welches 9 Subtypen unterschieden werden.
3. Der Polymerasekomplex der Viren (PB1 und PB2).
4. Die Nichtstrukturproteine (NS1 und NS2).

Die große Vielfalt von Influenza-A-Viren beruht auf zwei Mechanismen, durch welche diese Viren sich ständig verändern und mit ihnen auch ihre Pathogenität gegenüber den verschiedenen Wirtsspezies:

1. Antigen-Shift oder Reassortment: Diese Begriffe bezeichnen den Austausch einzelner Gensegmente zwischen verschiedenen Influenza-Viren, wodurch z.B. eigentlich vogeladaptierte Viren zu humanpathogenen Viren werden können. Dafür ist es jedoch erforderlich, dass verschiedene Viren gleichzeitig in ein und derselben Zelle eines Wirtsorganismus replizieren.
2. Antigen-Drift: Die Ursache dieser ständigen Veränderung der Influenza-Viren ist eine eigentlich fehlerhaft arbeitende RNA-Polymerase, durch welche ständig Punktmutationen im gesamten Genom der Influenza-Viren auftreten. Diese Mutationen sind die Ursache der permanenten Veränderung von Influenza-Viren und können letztlich dazu führen, dass ein bis dahin schwach pathogenes Virus auf einmal hochpathogen wird, so wie es z.B. 1983 in Pennsylvania mit einem H5N2 Influenza-Virus der Fall war, welches zu Beginn lediglich milde respiratorische Erkrankungen in Hühnern auslöste und durch eine Punktmutation, zu einem für Hühner hochpathogenen Virus wurde.

Durch die eben beschriebenen Vorgänge können auch die aviären Subtypen H2, H5, H7 und H9 zu humanpathogenen Viren werden, was Ihnen nach Einschätzung einiger Wissenschaftler höchstes Pandemie-Potenzial einräumt [2-6].

Die beiden bedeutendsten Influenza-Virusinfektionen der letzten Jahre waren die „Vogelgrippe“ (H5N1) zu Beginn unseres Jahrhunderts und die „Schweinegrippe“ (H1N1), welche im Jahr 2009 erstmals aufgetreten ist. Während die Influenza-Viren der Subtypen H1N1, H2N2 und H3N2 [7] als humanadaptiert gelten, werden alle anderen Subtypen eher als vogeladaptiert eingeordnet [4].

Was das H5N1-Virus aus dem Jahre 2002 so gefährlich machte, war eine Kombination aus Genen humaner Influenza-Viren und hochpathogener aviärer Influenza-Viren (HPAIV) [8, 9], wodurch es nicht nur ein großes Problem für Geflügelbestände darstellte, sondern auch dem Menschen gefährlich wurde. Bis zum 29. Juni 2009 wurde dieses Virus laut WHO-Angaben in 63 Ländern nachgewiesen und insgesamt waren 433 humane Infektionen bestätigt worden, von denen 262 tödlich endeten [8]. Bei fast all diesen Infektionen konnte nachgewiesen werden, dass eine direkte Übertragung vom Geflügel auf den

Menschen stattgefunden hatte und das Virus somit keine Fähigkeit zur Übertragung von Mensch zu Mensch besitzt. Allerdings wird weiterhin für einen Fall die Möglichkeit eines solchen Infektionsweges diskutiert [8]. Zu einem Zeitpunkt, als weltweit die Bekämpfung der H5N1-Viren auf Hochtouren lief, entstand durch Antigen-Shift ein neues Virus, welches im März 2009 in Mexiko zu humanen Influenza-Virusinfektionen führte. Dieses Virus weist noch mehr Gensegmente verschiedener Influenza-Viren auf, es vereint nämlich Gene von drei verschiedenen Viren in sich (Abbildung 1) [10].

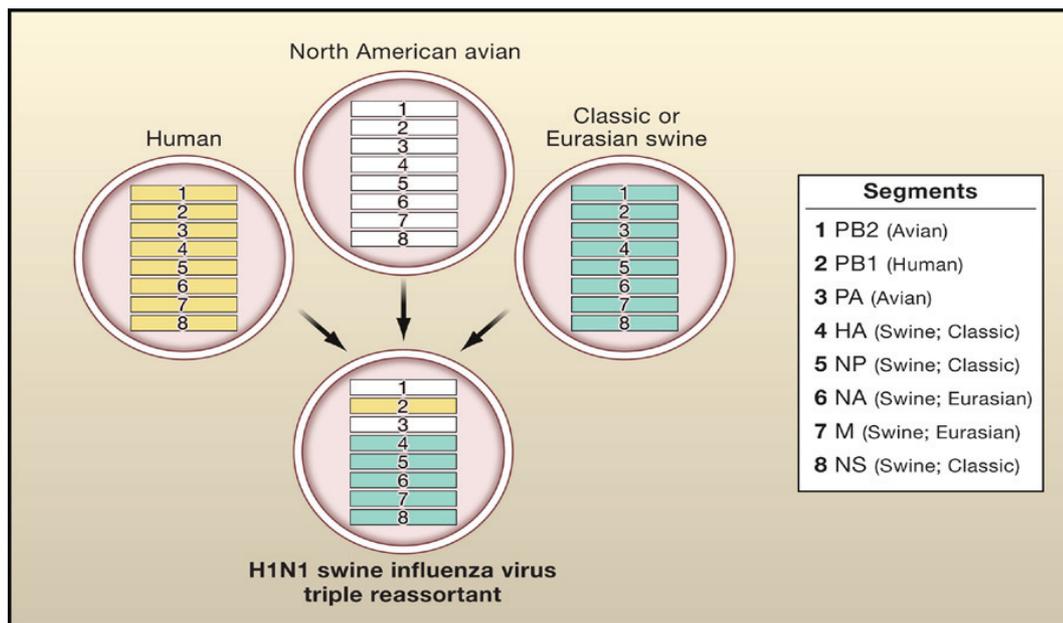


Abbildung 1: Herkunft der Gensegmente des H1N1-Virus von 2009, übernommen aus [10]

Innerhalb von zwei Monaten konnte das Virus, nach Angaben der WHO, in 110 Ländern nachgewiesen werden und war mit 58 000 Human-Infektionen deutlich besser an den Menschen angepasst, als das H5N1-Virus. Am 11. Juni 2009 wurde diese Erkrankung durch die WHO zur Pandemie erklärt [11]. Und bis zum 30. August 2009 waren nach WHO-Angaben bereits 254 206 Human-Infektionen zu verzeichnen, von denen 2 837 tödlich endeten. (Tabelle 1).

Region	Infektionen	Todesfälle
Regionalbüro für Afrika	3 872	11
Regionalbüro für Amerika	116 046	2 234
Regionalbüro für die Region Ostmediteraner Raum	5 031	21
Regionalbüro für Europa	>46 000	>104
Regionalbüro für Südost-Asien	19 362	188
Regionalbüro für die Region Westpazifik	63 895	279
Total:	254 206	2 837

*Tabelle 1: Angaben zur Anzahl an Infektionen und Todesfällen mit dem H1N1-Virus in einzelnen Regionalbüros der WHO bis zum 30. August 2009, modifiziert übernommen von ([http://www.who.int/csr/don/2009\\_09\\_04/en/index.html](http://www.who.int/csr/don/2009_09_04/en/index.html)).*

Die Forschung der letzten 30 Jahre hat zur Identifizierung von Faktoren geführt, welche helfen, die Pathogenität von Influenza-Viren einschätzen zu können [10]:

1. Die Anwesenheit eines bestimmten Genabschnittes für PB1-F2, welches das kleinste der Influenza-Proteine ist und als ein Bestandteil der viralen Polymerase auftritt. Bisher ist in hochpathogenen Viren sehr häufig dieser spezielle Genabschnitt gefunden worden und in klinischen Studien wurde bestätigt, dass es sich bei dem exprimierten Protein um einen Virulenzfaktor in Mäusen handelt.
2. Der Grad der Übereinstimmung des HA eines neuen Virus mit dem HA von bereits bekannten humanen Influenza-Viren. Je höher der Grad der Übereinstimmung ist, desto wahrscheinlicher ist die Möglichkeit einer Übertragung von Mensch zu Mensch.
3. Das Vorkommen einer polybasischen Schnittstelle im HA. Hierbei handelt es sich um die Spaltstelle zwischen HA1 und HA2. Je mehr basische Aminosäuren in der Schnittstelle lokalisiert sind, desto mehr Proteasen sind in der Lage, das HA dort zu spalten, sodass die Bindung an die Wirtszelle und die Aufnahme von Viruspartikeln in die Zelle stattfinden kann. Je weniger basische AS diese Spaltstelle enthält, desto wahrscheinlicher ist es, dass nur Trypsin dazu in der Lage ist, diese Spaltung durchzuführen. Daher zeigen Viren ohne polybasische Schnittstelle einen Gewebetropismus zu Trypsin synthetisierenden Geweben.

An diesem Punkt setzen viele Forschungsprojekte an und es gibt mittlerweile verschiedene Strategien diese Erkrankung aufzuhalten oder wenigstens einzudämmen.

1. In den letzten Jahren wurden 2 Arten von Notfallmedikamenten gegen Influenza-Virusinfektionen entwickelt. Bei dem Einen handelt es sich um Neuraminidasehemmer (Oseltamivir), welche die Freisetzung der Viruspartikel aus der infizierten Zelle beeinträchtigen. Bei dem Anderen handelt es sich um M2-Hemmer (Amantadine), welche die Protonenpumpen (M2), die auf der Oberfläche der Influenza-Viren sitzen, blocken, wodurch die Schutzfunktion des HA vor niedrigen pH-Werten nicht mehr gegeben ist [10].
2. Ein anderer Ansatzpunkt ist die Entwicklung von Vakzinen, was jedes Jahr mit der Gripeschutzimpfung erfolgreich umgesetzt wird, jedoch kann dadurch nie ein Schutz gegen alle Influenza-Viren gewährleistet werden und aufgrund der starken genetischen Variabilität ist auch bis jetzt kein lang anhaltender Impfschutz gegeben.
3. Ein dritter Ansatzpunkt ist das bessere Verständnis von immunologischen Mechanismen, welche bei einer Infektion mit Influenza-Viren ablaufen. Hier gibt es eine Vielzahl von Informationen, welche man in den letzten Jahren sammeln konnte [12].

Immer wieder wurde bei Infektionsversuchen ein sogenannter „Zytokinsturm“ beobachtet. Hierbei handelt es sich um eine starke Akkumulation von proinflammatorischen Zytokinen als Antwort des Körpers auf die Infektion mit Influenza-Viren. Es wird diskutiert, ob nicht diese Reaktion mitverantwortlich ist für den rapiden Verlauf der Infektionen [13, 14]. Bei vergleichenden Infektionen von primären humanen Makrophagen-Kulturen mit H5N1-Viren und mit humanadaptierten H3N2-Viren und H1N1-Viren war eine deutliche Steigerung der Expressionsrate verschiedener Zytokine, darunter TNF- $\alpha$ , RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  und CCL2 zu Gunsten der Infektion mit H5N1-Viren zu beobachten [13]. Kulturen von Epithelialzellen aus humanen Bronchien und Alveolen zeigten eine Steigerung von IP-10, IL-6 und RANTES bei der Infektion mit H5N1 im Vergleich zu H1N1-Viren [15]. Mäuse und Makaken wiesen ebenfalls eine

Steigerung der Expression proinflammatorischer Zytokine nach der Infektion mit einem Influenzastamm der „Spanischen Grippe“ auf [16]. Ferner wird das Mx-Protein, welches unter der Kontrolle von IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  exprimiert wird, sowohl beim Menschen als auch in Mäusen als erfolgreich gegenüber Infektionen mit Influenza-A-Viren aufgeführt [17-21]. In Versuchen mit RIG-I defizienten Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass RIG-I ein Rezeptor für Influenza-RNA ist und antivirale Abwehrmechanismen aktiviert, unter anderem auch die Synthese und Freisetzung von IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$ . Es wurden aber auch Mechanismen gefunden, die zeigen, wie die Viren die Immunreaktion zu ihren Gunsten beeinflussen. So konnte nachgewiesen werden, dass das Nichtstrukturprotein 1 (NS1-Protein) unter anderem dazu dient, einen Komplex mit RIG-I zu bilden und somit die Freisetzung von IFN zu verhindern [22]. Doch gerade auf diesem Gebiet gibt es noch dringenden Forschungsbedarf, da die Viren über weitere, nach wie vor unbekannte Mechanismen verfügen, das Immunsystem des Wirtes zu umgehen. Für ein besseres Verständnis des gesamten Aufbaus und der Funktionsweise von Influenza-Viren sei an dieser Stelle auf die Publikation [23] verwiesen.

Während der Verlauf von Infektionen mit H5N1-Viren in Mäusen, Frettchen und nichtmenschlichen Primaten schon näher untersucht wurde [24], ist der Verlauf der Erkrankung und das Wissen über Abwehrmechanismen im Huhn, erst in Ansätzen verstanden.

## **2. Influenza beim Vogel**

Bei der Betrachtung der Zahlen über Infektionen mit Aviären Influenza-Viren (AIV) kann die wirtschaftliche Bedeutung dieser Infektionskrankheit beim Geflügel abgeschätzt werden. Nach Kalkulationen von Capua und Alexander [25] waren in der Zeit von 1959-1998 rund 23 Millionen Vögel von Erkrankungen mit AIV betroffen, während es alleine im Zeitraum 1999-2004 schon mehr als 200 Millionen Vögel waren. Während dieser 5 Jahre wurde beobachtet, dass Infektionen mit deutlicher klinischer Symptomatik immer von Viren des Subtypes H5 und H7 ausgelöst wurden. Daher erfolgt auch eine Einstufung aller Subtypen, die das H5- oder H7-Haemagglutinin tragen, zu den Hochpathogenen Aviären Influenza-A-Viren (HPAIV A), obwohl nicht alle diese Viren auch wirklich hoch

virulent sind [25]. Weiterhin konnte auch für Infektionen im Geflügel bestätigt werden, dass die multibasische Schnittstelle im HA-Molekül von großer Bedeutung für die Virulenz der Influenza-Viren ist. Während alle Niedrigpathogenen Aviären Influenza-Viren (LPAIV) eine sehr kurze Schnittstelle haben, mit nur einem einzelnen Arginin und höchstens einer weiteren basischen Aminosäure (AS), besitzen HPAIV Schnittstellen mit einer Vielzahl basischer AS, wodurch deren HA auch durch andere in der Zelle vorhandene Endoproteasen, in erster Linie Furin, aktiviert werden kann. Dieser Vorteil ermöglicht es den HPAIV auch Organe zu besiedeln, deren Zellen kein Trypsin exprimieren, somit können die HPAIV vielmehr Organe als die LPAIV befallen [25].

Der Wirtstropismus von AIV hin zu Vögeln beruht auf der Anwesenheit von 2,3-glykosidisch gebundener Sialinsäure, welche ein Rezeptor für HA darstellt und auf Vogelzellen sehr stark verbreitet ist [25]. Man konnte in der Zwischenzeit nachweisen, dass Hühner auch über Zellen verfügen, welche 2,6-glykosidisch gebundene Sialinsäure tragen [26]. Damit kommen dem Vogel und dem Schwein, die beide sowohl Zellen mit der 2,3- als auch Zellen mit der 2,6-glykosidisch gebundenen Sialinsäure besitzen, große Bedeutung für das Reassortment von Genen zwischen HPAIV und humanen Influenza-Viren zu. Denn humane Influenza-Viren zeigen einen Tropismus zu Zellen mit 2,6-glykosidisch gebundener Sialinsäure.

Seit Mitte der 70er Jahre wurden immer wieder Wildvögel systematisch auf das Vorhandensein von AIV untersucht, wobei ein großer Pool an verschiedenen Viren nachgewiesen werden konnte und dies vor allem bei Vertretern der Ordnung Anseriformes und Charadriiformes [25, 27]. In der Literatur findet sich allerdings bis zum Auftreten der aktuellen H5N1-Stämme nur ein einziger dokumentierter Fall, in dem von einer Erkrankung unter Wildvögeln durch Influenza-Virusinfektionen berichtet wird. Dabei handelt es sich um eine Infektion von 1300 Seeschwalben in Südafrika im Jahr 1961. Daher wurde wiederholt postuliert, dass HPAIV ein Problem von domestiziertem Geflügel sind, während Wildvögel lediglich ein Reservoir für LPAIV darstellen [25]. Denn normalerweise kommt es lediglich zu einer symptomfreien Durchseuchung aller Wildvögel des gleichen Ökosystems, wenn sie Kontakt zu sogenannten

Reservoirtieren haben. Dabei ist von entscheidender Bedeutung, wie gut das Virus an die Wirte angepasst ist, denn je höher der Grad der Anpassung an den Wirt ist, desto kleiner ist die für die Infektion benötigte Dosis. Gleiches gilt auch für die Infektion von Wirtschaftsgeflügel. Für eine „erfolgreiche“ Infektion müssen zwei Punkte gewährleistet sein. Erstens muss eine Exposition gegeben sein, das heißt, das Virus muss die Möglichkeit haben, vom klinisch inapparent infizierten Wildvögel in einen Geflügelbestand zu gelangen, was z.B. durch Freilandhaltung, durch Volierenhaltung, durch die Verwendung von kontaminiertem Oberflächenwasser oder aber auch durch den Menschen als Vektor der Fall ist. Zweitens muss das Virus an die Geflügelspezies angepasst sein, um eine Krankheit auszulösen. Je nach Anpassungsgrad können drei Möglichkeiten des Ablaufes unterschieden werden [27]:

1. eine klinisch inapparente Durchseuchung des Bestandes
2. Aussterben des Virus im Bestand, da der Grad der Anpassung an die neue Wirtsspezies oder aber die Infektionsdosis für eine Infektion nicht ausreichend sind
3. Durchseuchung des Bestandes mit mehr oder weniger stark auftretenden klinischen Symptomen, welche abhängig sind vom Grad der Pathogenität des Virus. Im schlimmsten Fall kann dies zu Mortalitätsraten von bis zu 100% führen

## **2.1 Influenza in Gänsevögeln → Ordnung Anseriformes**

Wie bereits erwähnt, fallen vor allem die Vertreter dieser Ordnung als Reservoir für AIV auf, wobei das sowohl für Wildvögel als auch für domestizierte Vertreter dieser Ordnung zutrifft [25, 28].

### **2.1.1 Klinische Symptome:**

Vor 2001 wurden keine klinischen Symptome im Zusammenhang mit Influenza-Virusinfektionen in Gänsevögeln beschrieben. Erst 2002 lassen sich in der Literatur erstmals Daten finden, die eine erhöhte Mortalität nach der Infektion mit AIV widerspiegeln [29]. Nach 2004 wurden, teils durch Infektionsversuche, teils durch die gestiegene Aufmerksamkeit, deutliche klinische Anzeichen bei

Vertretern dieser Ordnung beschrieben. Demnach gehen Infektionen mit hohem Fieber, Dyspnoe, Diarrhöe [30, 31] und zentralnervösen Symptomen (Ataxie, fehlendes Koordinationsvermögen, Krämpfen), [31, 32], aber auch mit Mortalitätsraten von 20-100% einher.

### **2.1.2 Pathologie**

Vielfach wurde von Ekchymosen und Zyanosen an Ständern und Kopf, Petechien im Bereich des Herzens, Aszitis und von deutlichen histopathologischen Befunden in der Lunge berichtet. So war in der Lunge i. d. R. ein deutliches Ödem nachweisbar, aber auch eine Blutanstauung und perivaskuläre Entzündungserscheinungen.

Es wird aber auch darauf hingewiesen, dass die Wahl des Infektionsstammes entscheidend ist für die Ausprägung von klinischen Symptomen und der pathologischen Veränderungen, da Stämme die vor 1999 isoliert wurden, nicht zu einer deutlichen Symptomatik führen, was in Experimenten mehrfach nachgewiesen wurde [28].

## **2.2 Influenza in Tauben → Ordnung Columbiformes**

Nachdem in der Literatur lange Zeit keine Informationen zu Infektionen von Tauben publiziert waren, galt die Taube allgemein als resistent gegenüber Influenza-Viren. Daher durften in Deutschland auch Wettflüge mit Tauben stattfinden, während für alle anderen Geflügelarten eine Aufstallung angeordnet wurde.

### **2.2.1 Klinische Symptome:**

Oculonasale Infektion von Tauben mit HPAIV H5N1 führte in einer klinischen Studie des FLI [33] bei 35% der infizierten Tiere zu deutlichen neurologischen Symptomen, die mit dem Tod der Tiere einhergingen, während der Rest der Tiere unauffällig war. Am Tag 19, dem Ende des Versuches, wurde bei diesen unauffälligen Tauben ein deutlicher Antikörper (AK)-Spiegel gegen H5 gemessen.

### 2.2.2 Pathologie:

Histopathologische Veränderungen im Gehirn konnten lediglich bei den Tieren mit neurologischer Symptomatik nachgewiesen werden. Es handelte sich hauptsächlich um diffuse Läsionen in der grauen Substanz und im Hirnstamm, aber auch um multifokale Nekrosen in den Neuronen und Gliazellen des Kleinhirns.

Interessanterweise reichten die Mengen an ausgeschiedenem Virus trotz klinischer Symptomatik der Tauben nicht aus, um Sentinelhühner, welche über den ganzen Versuchszeitraum mit in der Voliere untergebracht waren, zu infizieren. Diese wurden am Tag 19 nach der Infektion der Tauben ebenfalls getötet und untersucht, ohne dass auffallende Symptome beobachtet werden konnten. Als entscheidendes Ergebnis dieses Versuches lässt sich zusammenfassen, dass Tauben sich sehr wohl mit HPAIV infizieren und ausgeprägte klinische Symptome entwickeln können. Dies gilt zumindest für die Infektion mit dem hier verwendeten Virusstamm. Diese Symptome sind bei der Taube vor allem neurologischer Natur und führen innerhalb von 5-19 Tagen zum Tod der Tiere. Bei den überlebenden Tauben konnte lediglich die Serokonversion nachgewiesen werden, was jedoch bedeutet, dass diese auf jeden Fall infiziert waren, aber mit dieser Infektion zurechtgekommen sind und das Virus bekämpfen konnten. Auch wenn die Menge an ausgeschiedenem Virus nicht zur Infektion von Sentineltieren ausreichte, wird ausdrücklich darauf verwiesen, dass erkrankte und an der Erkrankung gestorbene Tauben solche Mengen an Virus im ZNS hatten, dass eine Infektion von Fleischfressern nicht ausgeschlossen werden kann [34].

### 2.3 Influenza bei Papageienvögeln → Ordnung Psittaciformes

In der Literatur finden sich wenige Daten zu Versuchen bei Tieren dieser Ordnung. Bei Wellensittichen, die mit HPAIV infiziert wurden, wurde eine Mortalitätsrate von 75% beobachtet und die größte Menge an Virus konnte in diesen Tieren im Gehirn, dem Ort der deutlichsten Veränderungen gefunden werden. Aber auch aus der Lunge und der Niere konnte HPAIV reisoliert werden [35].

## **2.4 Influenza in Laufvögeln → Ordnung Struthioniformes**

Die ersten Informationen zu Influenza-Virusinfektionen in Laufvögeln stammen aus dem Jahr 1991, in denen von einer Infektion in Nigeria berichtet wird [28].

### **2.4.1 Klinische Symptome:**

Es sind lediglich Berichte von einer einzigen Feldinfektion von Straußen mit HPAIV in der Literatur zu finden. Darin wird berichtet, dass sich die Tiere kurz vor dem Tod in sternaler Bauchlage befunden hätten und eine Mortalitätsrate von 4% auftrat [36]. Des Weiteren gibt es Berichte über eine experimentelle Infektion mit HPAIV in zwei Emus, bei welchen hauptsächlich neurologische Dysfunktionen (Torticollis, Inkoordination, Übererregbarkeit) festgestellt werden konnte [31].

## **2.5 Influenza in Hühnervögeln → Ordnung Galliformes**

Der Grad der Pathogenität von Influenza-Viren, wird aufgrund der Anfälligkeit von Speziell Pathogenfreien (SPF)-Hühnern gegenüber dem AIV festgelegt. Um als HPAIV eingestuft zu werden, muss das Virus eine Mortalitätsrate von mehr als 75% bei der intravenösen Applikation von 4-8 Wochen alten Hühnern, oder aber einen intravenösen Pathogenitätsindex von mehr als 1,2 bei 6 Wochen alten Hühnern aufweisen. Ansonsten handelt es sich um ein LPAIV [28].

### **2.5.1 Klinische Symptome:**

Bei der Infektion mit LPAIV im Feld und bei kontrollierten Infektionen werden als auffälligste Symptome Niesen, Rasselgeräusche auf der Lunge und auch verstärkter Tränenfluss genannt. Ferner wird bei Legehennen auch noch von Eigelbperitonitiden berichtet [37, 38].

Das auffälligste Merkmal bei der Infektion von Hühnervögeln mit HPAIV ist jedoch eindeutig die extrem hohe Mortalitätsrate, welche sehr häufig bei 100% liegt. Des Weiteren wird von Multiorganversagen, Haemorrhagien im Respirations- und im Verdauungstrakt, von Ödemen an Kopf und Ständern, von Zyanosen an Kamm und Kehllappen und auch von Unterhautblutungen berichtet.

Wenn Hühner die ersten Tage der Infektion überstanden hatten, konnten unter

Versuchsbedingungen auch neurologische Symptome festgestellt werden, was für andere Vertreter der Ordnung Hühnervögel häufiger berichtet wird. Zu diesen Vertretern gehören: Wachteln (sowohl japanische Wachtel als auch Baumwachtel), Truthähne und Fasane [28].

### **2.5.2 Läsionen:**

Die Läsionen bei LPAIV sind hauptsächlich auf die Epithelien des Respirations- und des Verdauungstraktes beschränkt, während die HPAIV-Infektionen auch eine Vielzahl weiterer Organe und Gewebe befallen können. Eines der Hauptprobleme bei der Infektion mit HPAIV wird ausgelöst durch den Befall von Epithelien des Blutkreislaufsystems, wodurch die Gefäßwände durchlässiger werden und es vermehrt zu Petechien, Unterhautblutungen oder einfach auch zur Ausbildung von Ödemen kommt. Der Körper versucht mit Hilfe der Gerinnungskaskade diese Lücken in den Wänden des Blutkreislaufsystems wieder zu verschließend, wodurch es letzten Endes zum Syndrom einer Disseminierten Intravasalen Koagulopathie (DIC) kommt, welche bei diesen Tieren in einer hochgradigen Blutungsneigung und Multiorganversagen endet. Wenn die Tiere diese Phase der Infektion überleben, breitet sich das Virus weiter aus und befällt unter anderem Herz, Nebenniere, Pankreas und Gehirn. In Milz, Thymus und Bursa kann eine Depletion von Lymphozyten beobachtet werden [28].

## **2.6 HPAIV im Huhn**

In der Literatur findet man eine Vielzahl von Veränderungen, welche nur bei einer einzigen Infektion von Hühnern festgestellt werden konnten und wieder andere, die sich regelrecht häufen. Was jedoch immer beschrieben wird, ist eine sehr hohe Morbidität und eine hohe Mortalität bei Hühnern, welche innerhalb eines oder zweier Tage auf 100% steigen kann. Aufgrund des rapiden Verlaufes der Infektion, kommt es mitunter zu einem völligen Ausbleiben von klinischen Symptomen. Züchter von Broiler-Hühnern auf einer Farm in Korea konnten jedoch folgende Symptome der Erkrankung ihrer Hühner mit HPAIV H5N1 wiedergeben [39]:

1. verminderter Futtermittelverbrauch
2. milde Anzeichen einer Atemwegserkrankung
3. steiler Abfall der Legeerate (>60%)
4. steiler Anstieg der Mortalitätsrate

In Infektionsstudien konnten die Symptome einer Infektion mit HPAIV in Hühnern detailliert untersucht werden und es konnten folgende zusätzliche Symptome beobachtet werden:

1. gestäubtes Gefieder [40-42]
2. Niedergeschlagenheit [27, 40-43]
3. deutliche Senkung des Geräuschpegels im Bestand [41]
4. bucklige Körperhaltung [44]
5. Dyspnoe [28, 40]
6. Fieber [42]
7. Ödeme an den Augenlidern oder generell im Bereich des Kopfes oder auch hämorrhagische Konjunktiven [28, 40-47]

Häufig finden sich jedoch keine Berichte über Symptome während der Phase der akuten Erkrankung, sondern eher Berichte aus der Sektion. Die folgenden Diagnosen konnten bei der Untersuchung von Hühnern nach Feldinfektionen, aber auch nach kontrollierten Infektionen in klinischen Studien erhoben werden:

Pathologische Veränderungen:

1. Nekrosen und Ödeme an Kämmen und Ständern [27, 28, 39-43, 45-48]
2. Blutanstauung in den Venen der Bauchorgane [39]
3. Ansammlung seröser Flüssigkeiten in den Körperhöhlen [46, 49]
4. Flüssigkeitsansammlung in Müllerschen Gängen [50]
5. ödematöse und/oder hämorrhagische Veränderungen der Trachea [28, 39, 40, 47, 48]

6. Splenomegalie [41, 46, 49]
7. Renomegalie [44, 46]
8. Hepatomegalie [39]
9. Blutanschoppungen, Hämorrhagien und/oder Ödeme in der Lunge [27, 28, 39, 41, 46-49]
10. Petechien des koronarem Fettpolsters, abdominalem Fettgewebes und in der Mucosa vom Drüsenmagen und vom Zwölffingerdarm [27, 39, 40, 44-48]
11. Hämorrhagien in der Skelettmuskulatur [49]

Histopathologische Veränderungen und immunhistochemische Beobachtungen:

1. Läsionen vor allem in Leber, Lunge, Pankreas, Darm und/oder Gehirn [39, 41, 46, 48-51]
2. multiple Herde koagulativer Nekrosen mit leichter Anhäufung von Entzündungszellen in Leber, Herz, Lunge, Pankreas und/oder Gehirn [39, 44, 45, 48, 51]
3. Vielzahl kleiner Lymphozyten und einiger Makrophagen im Bereich der portalen Trias der Leber [39]
4. multifokale Nekroseherde einhergehend mit heterophiler Infiltration im Pankreas [39]
5. diffuse Nekrose des Epithels, Ödeme und Einwanderung mononuklearer Zellen in die Submucosa der Trachea [39]
6. interstitielle Pneumonie der Lunge, bestehend aus fibrinösen Thromben, fibrinös-eitrigem Exsudat und Ödemflüssigkeit [39, 45]
7. Nekrose des Myokards einhergehend mit Hämorrhagien und Einwanderung mononuklearer Zellen [39, 44]
8. Lymphozytendepletion und Nekrosen in der Milz und dem darmassoziierten lymphatischen Gewebe (Peyerplatten, Caecaltonsillen) [39, 50]

9. vereinzelte Glioseherde und ganz vereinzelt perivaskuläre Ödeme im Gehirn [39, 45, 46, 50, 51]
10. Nachweis von Virus-Antigen: im Tracheal-, renalem Tubulus-, Pankreasepithel, Lungenendothel, Herzmuskel und/oder in Neuronen, Purkinje-Zellen, Ependymzellen des Gehirns [39, 44, 46, 49, 50]
11. zu Beginn ist Virus-Antigen lediglich in einer Vielzahl von Epithelien nachweisbar und nicht im Parenchym von Organen [41, 49-51]

Wie dem oberen Abschnitt zu entnehmen ist, treten Ödeme an der unbefiederten Haut und da vor allem im Bereich des Kopfes und der Ständer, aber auch Unterhautblutungen bei der Infektion von Hühnern mit HPAIV H5N1 auf. Das liegt sehr wahrscheinlich daran, dass das Virus zu Beginn der Infektion einen Tropismus zu Epithelen des Blutgefäßsystems zeigt, wodurch diese durchlässig werden [28]. In einem Versuch von Muramoto, wurden Hühnerblutproben zu Beginn einer Infektion und mehrfach während des Fortschreitens der Infektion entnommen und auf das Vorhandensein von Thrombozyten untersucht und es wurde auch die Prothrombinzeit gemessen. Mit diesem Versuch konnte bestätigt werden, dass es innerhalb von 24h zu einem Absinken der Thrombozytenzahl auf 18% des Wertes vor der Infektion kommt und sich die Prothrombinzeit um 7,8s verlängert [51].

Für ein besseres Verständnis des Ablaufes der Infektion mit HPAIV im Huhn, wurde von Swayne *et al.* ein interessanter Versuch durchgeführt, bei dem Hühner intranasal mit einem HPAIV infiziert wurden und anschließend 1h, 2h, 4h, 8h, 16h, 24h, 36h und 48h p.i. beprobt wurden. Erst 16h nach der Infektion war das Virus nachweisbar und zwar in dem Epithel der mittleren Nasenhöhle. 24h p.i. ging die Infektion mit starker Rhinitis und Ulzerationen des Epithels einher. Das Virus war zu dem Zeitpunkt bereits im Kapillarendothel und in geringem Maße auch schon im Gehirn und in der Milz nachweisbar. 48h p.i. war das Virus in den Bauchorganen und im Parenchym vieler anderer Organe nachweisbar. Da nicht nachweisbar war, dass das Virus den Weg ins Gehirn über die olfaktorischen Nerven gefunden hatte, wurde eine Absiedlung ins Gehirn über das Blutgefäßsystem postuliert [27].

Um ein besseres Verständnis des natürlichen Infektionsweges zu erlangen wurden Experimente mit AIV an Hühnern durchgeführt, bei denen sowohl ein LPAIV als auch ein HPAIV auf zwei verschiedene Arten verabreicht und anschließend die Lokalisation von Läsionen im Huhn betrachtet wurde [27]:

1. intranasale Infektion mit LPAIV → Die Läsionen sind auf den oberen Respirationstrakt beschränkt und das Virus konnte lediglich aus Epithelzellen reisoliert werden.
2. intravenöse Applikation mit LPAIV → Die Läsionen treten in den Nieren, dem Pankreas und der Lunge auf.
3. intranasale Infektion mit HPAIV → Die Läsionen finden sich in einer Vielzahl von Organen wieder und das Virus konnte in diesen Organen aus nahezu allen Zellen reisoliert werden.
4. intravenöse Infektion mit HPAIV → Das Bild entsprach weitestgehend dem Bild bei der intranasalen Infektion mit HPAIV.

Der Gewebetropismus, welcher in diesem Versuch zum Ausdruck kommt, ist einmal mehr eine Bestätigung, dass aufgrund der größeren Anzahl an basischen AS in der HA-Schnittstelle darüber entschieden wird, welche Zellen die Viren infizieren können. Die LPAIV, die nur ganz wenig basische AS in dieser Schnittstelle tragen, sind auf Zellen angewiesen, die Trypsin exprimieren, damit das HA gespalten werden kann. Daher sind die LPAIV bei intranasalen Infektionen auf die Epithelien des Respirationstraktes beschränkt und befallen bei systemischen Infektionen hauptsächlich Epithelien und eher selten das Parenchym von Organen. Während die HPAIV aufgrund ihrer größeren multibasischen Schnittstelle im HA-Molekül nicht auf Trypsin angewiesen sind, sondern durch jede beliebige Protease, in erster Linie Furin, gespalten werden können [27, 52-54].

### **3. Chronologie der AIV**

Um eine Vorstellung darüber zu vermitteln, wie lange Menschen sich schon mit der AI auseinandersetzen und um zu verdeutlichen, dass die AI schon immer zu Problemen in Geflügelhaltungen geführt hat, sind im folgendem Abschnitt

mehrere Tabellen aufgeführt, aus denen diese Daten entnommen werden können. In Tabelle 2 sind wichtige Ereignisse in der Geschichte der aviären Influenza wiedergegeben.

Tabelle 3 fasst Daten zu Infektionen mit HPAIV der letzten 50 Jahre zusammen und spiegelt Zahlen der getöteten Tiere während der Dauer dieser Infektionen wieder. Diesen Zahlen ist zu entnehmen, dass es zwar immer wieder zu Ausbrüchen von HPAIV in Geflügelbeständen gekommen ist, jedoch durch die intensiveren Haltungsbedingungen von Geflügel heutzutage immer dramatischere Infektionszahlen gemeldet werden. Dies stellt für die Geflügelbranche eine enorme Belastung dar.

Durch das Reservoir an AIV in Wildgeflügelbeständen und dem Vermögen der Viren sich ständig zu verändern, wodurch immer wieder HPAIV entstehen, kam es in der Geschichte immer wieder zu epidemieartigen Infektionen in Geflügelbeständen. Zuletzt konnte dies bei der weltweiten Ausbreitung des H5N1-Virus beobachtet werden. Die Länder, aus denen Fälle einer H5N1-Infektion von Geflügelbeständen gemeldet wurden, chronologisch sortiert nach der Erstinfektion, spiegelt Tabelle 4 wieder.

Tabelle 5 listet die Häufigkeit von Infektionen mit HPAIV H5N1 in Geflügelbeständen verschiedener Länder zwischen Ende 2003 und Juli 2009 auf.

Da diese Form der HPAIV nicht nur ein Problem von Geflügelbeständen, sondern auch von wildlebenden Vögeln ist, konnten während der H5N1-Problematik in Eurasien eine Reihe von Wildvögeln gefunden werden, die an diesen Viren zugrunde gegangen sind. Die Angaben über Vorkommen von Infektionen bei wildlebenden Vögeln und die befallene Vogelspezies, welche der OIE zwischen Januar 2004 und April 2006 gemeldet wurde, spiegelt Tabelle 6 wieder.

<b>Jahr</b>	<b>Ereignis</b>
<b>1878</b>	Berichte von einer sehr ansteckenden Geflügelkrankheit, welche sich aus Italien über den Rest von Europa ausbreitete. Damals noch unter der Bezeichnung Geflügelpest
<b>1880</b>	Differenzierung der Geflügelpest von der Geflügelcholera
<b>1901</b>	Identifikation eines Virus als Erreger der Geflügelpest
<b>1901-1930</b>	Berichte über eine Vielzahl von Ausbrüchen der Geflügelpest in der gesamten Welt
<b>1918/1919</b>	„Spanische Grippe“
<b>1931</b>	erste Isolation von einem Influenza-Virus (aus einem Schwein) [55]
<b>1934</b>	Titration von AIV und NDV anhand des Vermögens Hühnerembryonen zu töten [56]
<b>1936</b>	Vermehrung von AIV mit Hilfe von Hühnereiern [56]
<b>1941</b>	Entdeckung der Hämagglutination durch Influenza-Viren [57]
<b>1942</b>	Nachweis der Hämagglutination von Roten Blutkörperchen durch HPAIV und NDV, bei gleichzeitiger serologischer Unterscheidung.
<b>1955</b>	Nachweis, dass es sich bei HPAIV ausschließlich um Influenza-A-Viren handelt
<b>1957</b>	„Asien-Grippe“
<b>1961</b>	Erster Bericht einer Erkrankung durch Influenza-Viren bei Wildvögeln (Seeschwalben in Afrika) [25, 56]
<b>1968</b>	„Hongkong-Grippe“
<b>1970er</b>	Beginn der Intensiven Überwachung von Wildvögeln auf das Vorhandensein von AIV
<b>1977-1981</b>	Erkenntnis darüber, dass die Virulenz und der Gewebetropismus von AIV davon abhängt, wie viele basische AS in der Schnittstelle zwischen HA1 und HA2 angeordnet sind [58, 59]
<b>1978</b>	Nachweis, dass die Viren der „Asien-Grippe“ (H2N2) und der „Hongkong-Grippe“ (H3N2) durch Reassortment aus AIV hervorgegangen sind [60]
<b>1980</b>	Klassifikation von Influenza-Viren nach NP (Typen), HA und NA (Subtypen), ungeachtet der Tierart aus der sie isoliert wurden, so wie es heute noch Gültigkeit hat
<b>1981</b>	Erstes internationales AI-Symposium (Beltsville, Maryland) [61]
<b>1981</b>	Die Bezeichnung Geflügelpest wird durch die Bezeichnung Hochpathogene Aviäre Influenza (HPAI) ersetzt
<b>1994-1999</b>	Infektionen in Geflügelbeständen mit Viren vom Subtyp H9 (1994 China; 1994 und 1996 Italien; 1995 Südafrika; 1995 und 1996 USA; 1995/1996 und 1998 Deutschland; 1996 Korea; 1997 Irland) [62]
<b>1999-2001</b>	Humane Infektionen mit AIV vom Subtyp H9N2
<b>1997-2009</b>	Humane Infektionen mit HPAIV vom Subtyp H5N1
<b>2000er</b>	Erkenntnis über das endemische Vorkommen des AIV vom Subtyp H9N2 in Asien
<b>2003-2009</b>	HPAIV H5N1 Infektionen weltweit und Erkenntnis darüber, dass H5N1 endemisch in Asien ist

Tabelle 2: Eckpunkte zur Aviären Influenza, modifiziert übernommen aus [56]

HPAIV	Subtyp	Betroffene Spezies	Anzahl getöteter Tiere
A/chicken/Scotland/59	H5N1	Hühner	Keine Angaben
A/tern/SouthAfrica/61	H5N3	Seeschwalben	1 300
A/turkey/England/63	H7N3	Truthähne	29 000
A/turkey/Ontario/7732/66	H5N9	Truthähne	8 000
A/chicken/victoria/76	H7N7	Hühner, Enten	58 000
A/chicken/germany/79	H7N7	Hühner, Gänse	Keine Angaben
A/turkey/England/199/79	H7N7	Truthähne	9 000
A/chicken/pennsylvania/1370/83	H5N2	Hühner, Truthähne	17 000 000
A/turkey/Ireland/1378/83	H5N8	Truthähne	307 000 Hühner, Truthähne, Enten
A/chicken/victoria/85	H7N7	Hühner	240 000
A/turkey/England/50-92/91	H5N1	Truthähne	8 000
A/chicken/victoria/1/92	H7N3	Hühner	18 000 Broiler und Enten
A/chicken/Queensland/667-6/94	H7N3	Hühner	22 000
A/chicken/mexiko/8623-607/94	H5N2	Hühner	Mehrere Mio
A/chicken/Pakistan/447/94	H7N3	Hühner	>6 000 000
A/chicken/NSW/97	H7N4	Hühner	160 000 Hühner, Emus
A/chicken/HongKong/97	H5N1	Hühner, Enten	1 500 000
A/chicken/Italy330/97	H5N2	Hühner	8 000 Perl-, Hühner, Fasane, Truthähne, Enten, Wachteln, Tauben, Gänse
A/turkey/Italy/99	H7N1	Truthähne	14 000 000 Perl-, Hühner, Fasane, Truthähne, Wachteln, Enten
A/chicken/Chile/02	H7N3	Hühner	700 000 Hühner, Truthähne
A/greyheron/HongKong/861.1/02	H5N1	Wildvögel	>800 000 domestizierte Vögel getötet
A/chicken/Netherlands/03	H7N7	Hühner	>34 000 000
A/chicken/Asia, Europe and Africa/03-07	H5N1	Hühner, Enten	>100 000 000
A/chicken/Texas/04	H5N2	Hühner	6 600
A/chicken/Canada/04	H7N3	Hühner	16 000 000
A/ostrich/SouthAfrica/04	H5N2	Strauße	30 000
A/chicken/NorthKorea/05	H7N7	Hühner	219 000
A/turkey/England/07	H5N1	Truthähne	160 000

Tabelle 3: Daten zu weltweiten Ausbrüchen von HPAIV in Geflügelbeständen seit dem Jahre 1959, modifiziert übernommen aus [56]

<b>Land</b>	<b>Tierart</b>	<b>1. Fall aufgetreten</b>
Korea	Hühner, Enten	12.12.2003
Vietnam	Hühner, Enten	08.01.2004
Japan	Hühner	13.01.2004
Thailand	Hühner, Enten	23.01.2004
Kambodscha	Hühner, Enten	24.01.2004
Laos	Hühner	27.01.2004
China	Hühner, Enten, etc.	27.01.2004
Indonesien	Hühner	02.02.2004
Malaysia	Hühner, Enten	19.08.2004
Russland	Hühner	23.07.2005
Kasachstan	Gänse	02.08.2005
Rumänien	Hühner	07.10.2005
Türkei	Hühner	10.10.2005
Ukraine	Hühner	05.12.2005
Irak	Hühner, Gänse, Truthähne, Enten	02.02.2006
Nigeria	Hühner	08.02.2006
Indien	Hühner	18.02.2006
Ägypten	Hühner	19.02.2006
Aserbaidshan	Hühner	24.02.2006
Frankreich	Truthähne	25.02.2006
Niger	Hühner	28.02.2006
Pakistan	Hühner	02.03.2006
Burkina Faso	Perlhühner	03.03.2006
Albanien	Hühner	07.03.2006
Kamerun	Enten	12.03.2006
Myanmar	Hühner	12.03.2006
Israel	Truthähne, Hühner	17.03.2006
Afghanistan	Hühner, Truthähne	20.03.2006
Schweden	Enten	20.03.2006
Jordanien	Truthähne	24.03.2006
Deutschland	Truthähne	06.04.2006

*Tabelle 4: Zeitpunkt der Erstinfektion von Geflügelbeständen mit HPAIV H5N1 im Zeitraum zwischen 12/03 und 04/06, Tabelle modifiziert übernommen aus [63]*

<b>Land</b>	<b>Anzahl gemeldeter Ausbrüche in Geflügelbeständen</b>
Vietnam	2 544
Thailand	1 141
Ägypten	1 084
Bangladesch	323
Indonesien	261
Türkei	219
Rumänien	163
Russland	149
Volksrepublik China	98
Myanmar	93
Indien	78
Nigeria	65
Korea	59
Pakistan	51
Ukraine	42
Saudi-Arabien	29
Afghanistan	22
Kambodscha	21
Kuwait	20
Sudan, Laos	18
Malaysia	16
Polen, Israel	10
Japan, Ungarn, Hongkong	9
Palästinensische Autonomiegebiete, Deutschland	8
Ghana, Benin	6
Togo, Tschechische Republik, Elfenbeinküste, Burkina Faso	4
Großbritannien, Irak, Albanien	3
Niger, Nepal, Aserbaidshan	2
Schweden, Frankreich, Dschibuti, Iran, Serbien und Montenegro, Kasachstan, Jordanien, Dänemark, Kamerun	1

*Tabelle 5: Der OIE gemeldete Anzahl an Infektionen mit HPAIV H5N1 in Geflügelbeständen verschiedener Länder. Tabelle erstellt nach Angaben der OIE. ([http://www.oie.int/download/AVIAN%20INFLUENZA/Graph%20HPAI/graphs%20HPAI%2015\\_07\\_2009.pdf](http://www.oie.int/download/AVIAN%20INFLUENZA/Graph%20HPAI/graphs%20HPAI%2015_07_2009.pdf))*

Land	Befallener Wildvogel	Datum des Erstfundes
Hongkong	Wanderfalke	19.01.2004
	Fischreiher	04.11.2004
	Bacchusreiher	08.01.2005
	Dajaldrossel	08.01.2006
Volksrepublik China	Streifengans	30.04.2005
	Möwen spp.	30.04.2005
Mongolei	Streifengans	02.08.2005
	Singschwan	02.08.2005
Kroatien	Höckerschwan	19.10.2005
Russland	Schwan spp.	07.12.2005
	Enten spp.	09.02.2006
	Krähen spp.	09.02.2006
Aserbaidshon	Wildvögel	29.01.2006
Griechenland	Höckerschwan	30.01.2006
	Rothalsgans	30.01.2006
Bulgarien	Höckerschwan	31.01.2006
Iran	Schwan spp.	02.02.2006
Italien	Höckerschwan	02.02.2006
Ungarn	Höckerschwan	04.02.2006
Deutschland	Höckerschwan, Habicht	08.02.2006
Slowenien	Höckerschwan	11.02.2006
Österreich	Höckerschwan	13.02.2006
Frankreich	Tafelente	13.02.2006
Rumänien	Taube	14.02.2006
Bosnien	Höckerschwan	16.02.2006
Slowakische Republik	Wanderfalke	18.02.2006
Georgien	Schwan spp.	23.02.2006
Schweden	Enten spp.	24.02.2006
Schweiz	Gänsesäger	26.02.2006
Serbien und Montenegro	Höckerschwan	28.02.2006
Polen	Schwan spp.	02.03.2006
Kasachstan	Schwan spp.	10.03.2006
Dänemark	Mäusebussard	14.03.2006
	Singschwan	17.03.2006
	Reiherente	20.03.2006
Tschechische Republik	Höckerschwan	20.03.2006
Großbritannien	Singschwan	30.03.2006

*Tabelle 6: Daten von infizierten Wildvögeln, welche der OIE zwischen 01/2003 und 03/2006 gemeldet wurden, Tabelle modifiziert übernommen aus [63]*

Die Tabellen spiegeln wieder, dass es sich bei dieser HPAIV-Infektion um eine Erkrankung handelt, wie sie vorher noch nicht beschrieben wurde. Das Virus ist durch Mutation und Reassortment in die Lage versetzt worden, nicht nur die eigentlich immer empfindlichen Hühnervögel zu befallen und im Laufe der Infektion zu töten, sondern auch eine Vielzahl anderer, von Menschenhand

gehaltener Geflügelspezies. Darüber hinaus ist auch eine ganze Reihe von Wildvögeln hochempfindlich für dieses Virus. Besonders problematisch sind jedoch die Infektionen beim Menschen [64]. Humane Infektionen mit dem HPAIV H5N1 sind i. d. R. auf Übertragungen vom Geflügel auf den Menschen bedingt und nicht direkt von Mensch zu Mensch möglich, sodass auch die Morbidität eher gering ist, jedoch zeigt sich unter den Infizierten eine erschreckend hohe Mortalitätsrate. Wie aus Daten der WHO hervorgeht, waren im Zeitraum 01/2003 bis 09/2009 442 humane Infektionen mit HPAIV H5N1 gemeldet worden, von denen 262 tödlich endeten. Dies entspricht einer Mortalitätsrate von rund 60%.

Sicher erscheint mittlerweile, dass die H5N1-Infektion ihren Ursprung im Süden Chinas hatte, da bereits im Jahre 1996 in der Provinz Guangdong bei domestizierten Gänsen dieses Virus isoliert werden konnte. Der nächste beschriebene Fall, bei dem dieses H5N1-Virus isoliert werden konnte, ist eine Humaninfektion in Hongkong im Jahre 2002 und danach fortschreitend in großen Teilen Südostasiens [64, 65]. Von Südostasien wurde das Virus durch Wildvögel, und auch durch Wirtschaftsgeflügel über Zentralasien nach Europa und Afrika verbreitet. Auf diesem Weg wurden eine Vielzahl von infizierten und auch toten Wildvögeln gefunden, darunter vor allem Höckerschwäne, Singschwäne und Reiherenten, aber auch Gänsesäger, Habichtartige, Möwen, Weißstörche und Fischreiher. Da Schwäne sehr schnell an der Infektion mit diesem Virus sterben, kann man sie als eine Art Sentineltier ansehen, um festzustellen, an welchen Gewässern große Mengen des Virus vorhanden sind. Das ähnelt dem Einsatz von Hühnern in Wassergeflügelzuchten in Deutschland, da Hühner durch ihre hohe Anfälligkeit gegenüber dem Virus ein Indikator für vorhandene Infektionen sind [64].

#### 4. Das angeborene Immunsystem und Viren, im Besonderen Influenza-Viren

Immer wenn ein Säugetierorganismus von einem Virus befallen wird, muss sich das Virus als erstes mit dem angeborenen Immunsystem auseinandersetzen. Da dieser Teil des Immunsystems sehr schnell reagieren muss, damit genug Zeit bleibt das hochspezialisierte erworbene Immunsystem zu aktivieren, darf es selber nicht sehr spezialisiert sein, sondern muss „Eindringlinge“ anhand einfacher Strukturen erkennen und auf sie reagieren. Da das angeborene Immunsystem die erste aktive Barriere des Körpers darstellt, wird es gerne als „First Line of Defense“ bezeichnet [66].

Die Zellen des angeborenen Immunsystems reagieren dabei über sogenannte PRR (Pattern Recognition Receptors) auf die Anwesenheit des Virus und veranlassen entweder die Expression von proinflammatorischen Zytokinen und/oder von Typ-I-Interferonen. Um die Anwesenheit von viralen Bestandteilen überhaupt zu detektieren, nutzen die Zellen drei Mitglieder der Familie der PRR, die Toll-like Rezeptoren (TLR), die intrazytoplasmatischen RNA-Helikasen (RIG-I + MDA-5) und die intrazytoplasmatischen DNA-Sensoren (DAI) [66].

TLRs spielen eine zentrale Rolle in der Unterscheidung von körpereigenen und körperfremd. Wenn TLRs mikrobielle Produkte erkennen, wird über eine Signalkaskade, welche MyD88, TRIF, TRAM und MALP beinhaltet, die Transkription von Zytokin-Genen aktiviert. Aufgrund ihrer Lokalisation kann man verschiedene TLRs unterscheiden. So sind alle TLRs, welche für die Erkennung von Viren zuständig sind intrazellulär gelegen, während sich alle anderen TLRs extrazellulär befinden. Darüber hinaus unterscheidet man verschiedene Klassen von TLRs, welche auf verschiedene molekulare Muster (PAMPs) reagieren. So erkennt der TLR3 das Vorhandensein von doppelsträngiger RNA, welche in dieser Form im Genom von Säugetieren nicht existiert. Die TLR7 und TLR8 reagieren auf virale Einzelstrang-RNA. Während der TLR9 unmethylierte CpG-DNA, einem Hauptbestandteil von Bakterien, aber auch von Viren, wie dem Herpes-Simplex-Virus, erkennt [66].

Als wichtige Vertreter der RNA-Helikasen-Familie seien hier RIG-I (retinoic acid inducible gene I) und MDA-5 (melanoma differentiation-associated protein 5) genannt, welche durch das Vorhandensein von doppelsträngiger RNA aktiviert werden. Darüber hinaus wird RIG-I auch noch durch virale 5'-Triphosphat-RNA (einzelssträngig) aktiviert [67, 68].

Wie schon erwähnt, werden nach der Aktivierung dieser Rezeptoren verschiedene Kinasen (MyD88, TRIF, TRAM und MALP) zur Aktivierung (Phosphorylierung) von Transkriptionsfaktoren genutzt. Dazu gehören in erster Linie die interferon-regulating-factors IRF1, IRF3 und IRF7, welche nach ihrer Aktivierung zum Kern der Zelle wandern und dort die IFN-Produktion regulieren. Dabei ist zu unterscheiden, dass IRF1 und IRF3 nur die Synthese von IFN- $\beta$  steigern können während IRF7 es sowohl für IFN- $\alpha$  als auch für IFN- $\beta$  kann [66, 67]. Der oben beschriebene Kontext ist Abbildung 4 zu entnehmen.

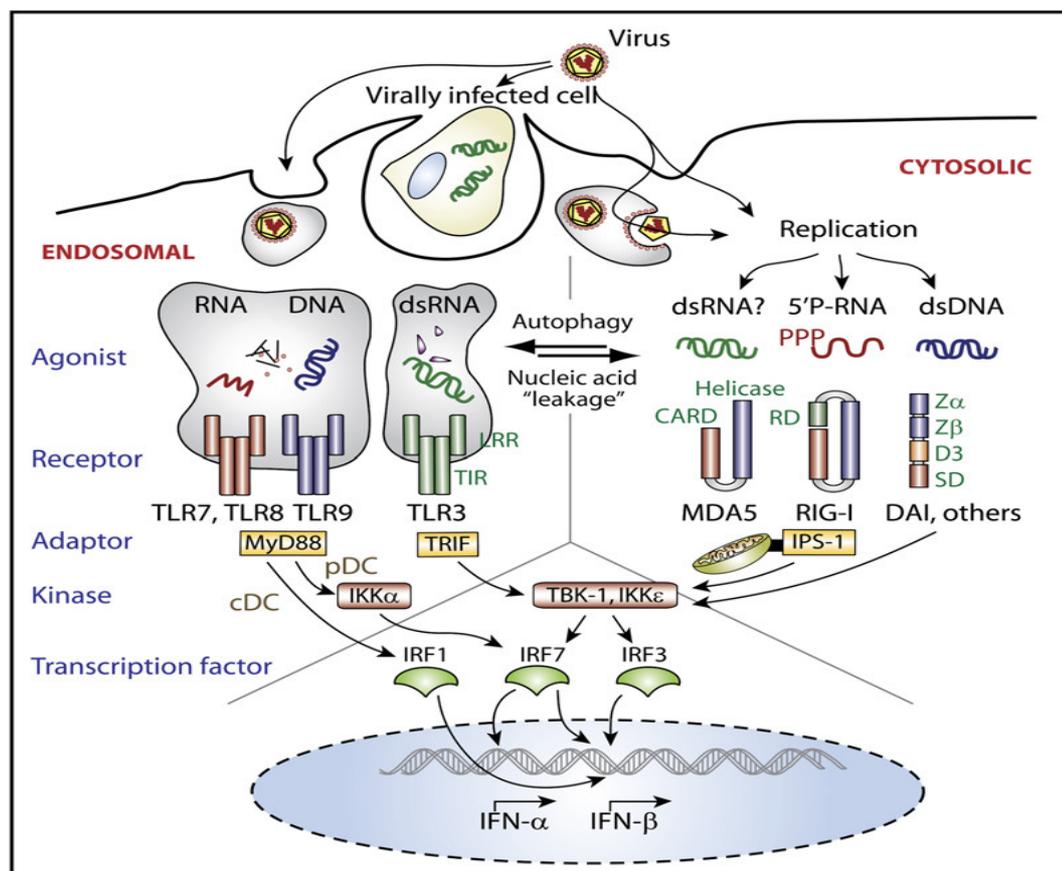


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Erkennung von viralen Bestandteilen und der Signaltransduktionswege bis hin zur Aktivierung von Typ-I-Interferonen, übernommen aus [69]

Die so exprimierten IFNs werden von der virusinfizierten Zelle freigesetzt, um benachbarten Zellen zu signalisieren, dass eine virale Infektion vorliegt.

Alle drei Typen von IFN werden über verschiedene Rezeptoren erkannt, jedoch ist ihnen gleich, dass der Rezeptor den sogenannten JAK-STAT-Pathway (Janus kinases; signal transducer and activator of transcription) nutzt, um das Signal an den Kern weiterzuleiten. Abbildung 3 schematisiert die dabei ablaufenden Vorgänge. Aufgrund der starken Ähnlichkeit der Rezeptoren für Typ-I-IFN und Typ-III-IFN liegt die Hauptaufgabe dieser beiden IFN-Typen in der Stimulation des angeborenen Immunsystems, während die Hauptaufgabe des Typ-II-IFN die Stimulation des erworbenen Immunsystems ist [70].

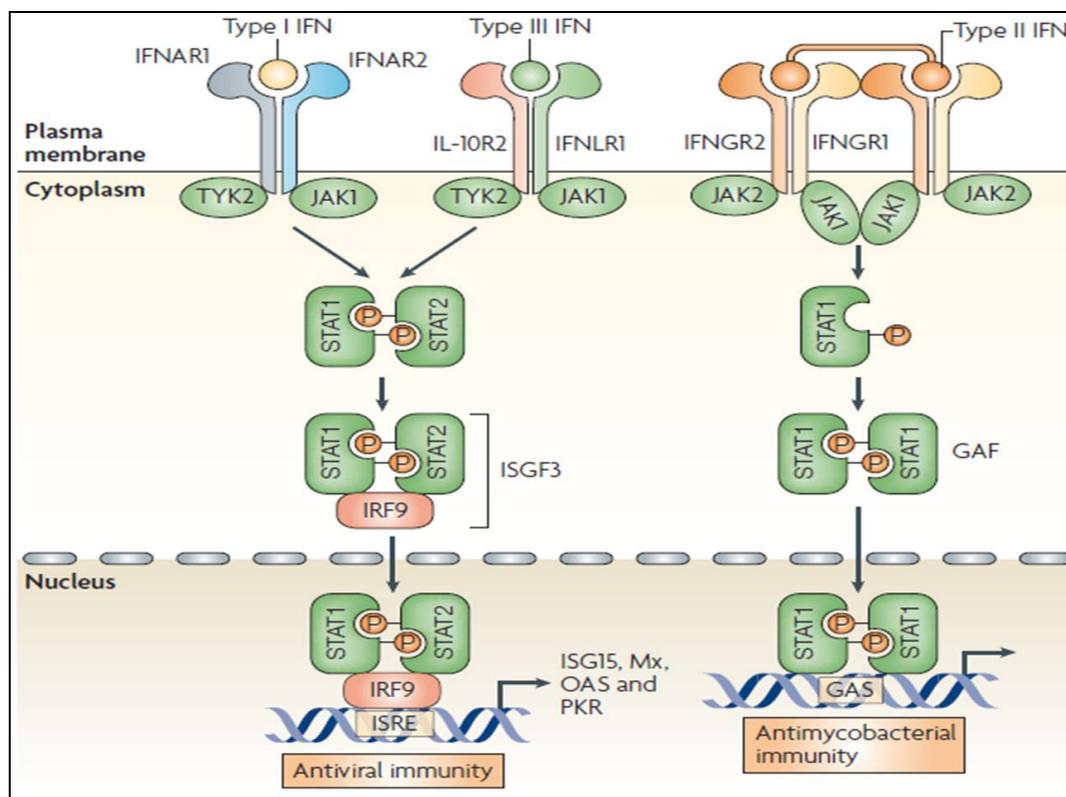


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Rezeptoren und des Aktivierungsweges der verschiedenen IFN-Typen, übernommen aus [71]

Die gebildeten Typ-I-IFNs und zusätzlich auch noch die viralen Bestandteile steigern die Expression einer Reihe von intrinsischer Immunitätsproteine, zu welchen Trim, Fv, Mx und APOBEC3G gehören [69]. Darüber hinaus werden Signalmoleküle, die bereits synthetisiert aber noch inaktiv vorliegen, aktiviert [68]. Zu diesen Molekülen gehören PKR, GCN2 und 2'-5' OAS [69]. Aber auch eine Aktivierung des adaptiven Immunsystems gehört zu den Aufgaben des

gebildeten IFN [69].

Die Hauptaufgabe von Trim (tripartite motif protein 5 $\alpha$ ) genauso wie von Fv (friend-virus-susceptibility factor) ist es, das Viruskapsid abzubauen [69].

Das Mx-Protein (myxovirus resistance protein), welches zur Familie der IFN-induzierten GTPasen gehört, versucht das Nukleoprotein von Bunya- und Orthomyxoviren abzubauen [69].

Die Aktivierung von APOBEC 3G (Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like editing complex 3G) hat eine Desaminierung des viralen Genoms zur Folge, wodurch die Virusreplikation entscheidend beeinflusst wird [69].

Die Kinasen PKR (protein kinase R) und GCN2 (general control non derepressible 2) aktivieren den eIF-2 $\alpha$  (translation initiator factor 2  $\alpha$ ) durch Phosphorylierung, wodurch dieser wiederum die Translation der mRNA herunterreguliert [69].

Die Aufgabe der 2'-5'OAS (2'-5' oligoadenylate synthetase) liegt in der Aktivierung der RNase L, welche ihrerseits die Degradation von RNA bewirkt [69].

Die Aufgabe dieser Effektorproteine ist es, die Translation zu senken, die Apoptose von Zellen und auch die RNA-Degradation zu steigern, was für die Zellen des befallenen Organismus selber problematisch ist. Daher wird dieses sensible System auch nur aktiviert, wenn wirklich ein Virus eine Zelle befallen hat [69]. Eine Zusammenfassung des gesamten Ablaufes liefert Abbildung 4.

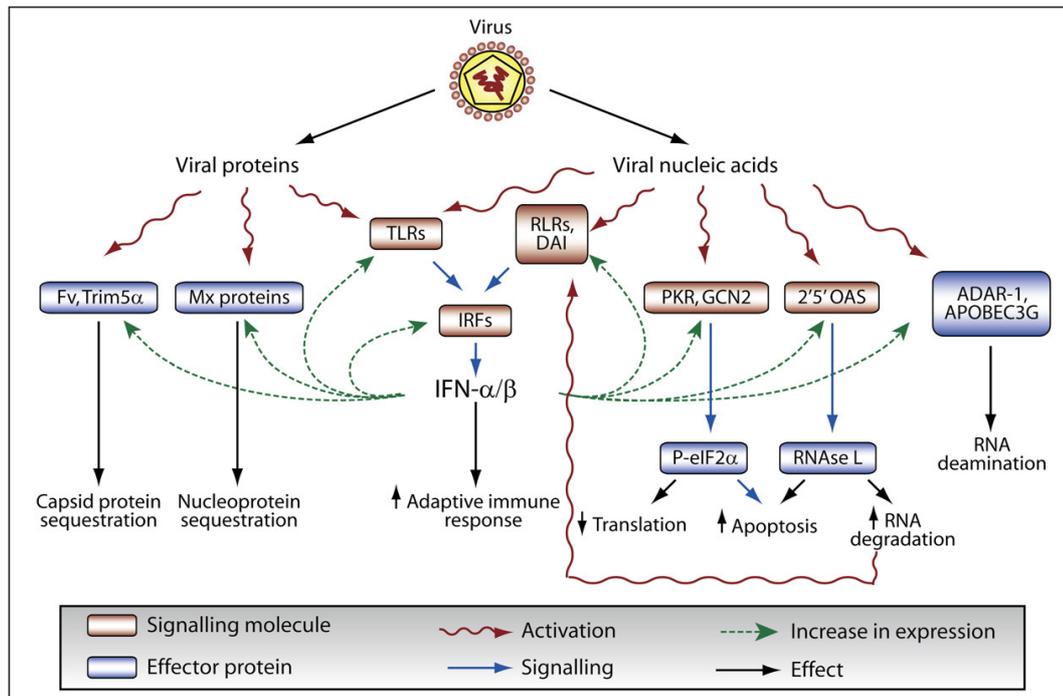


Abbildung 4: Übersicht über die Reaktion des Immunsystems auf das Vorhandensein von Viren, mit Hauptaugenmerk auf die Wirkung, welche die gebildeten IFN entfalten, übernommen aus [69]

An all den Stellen an denen der Körper Viren erkennt oder auch bekämpft, haben die Viren Mechanismen entwickelt, das Immunsystem zu umgehen oder zu blockieren. Auf deren detaillierte Beschreibung soll an dieser Stelle jedoch verzichtet und stattdessen auf zwei umfassende Übersichtsarbeiten [67, 68] verwiesen werden.

Lediglich der wichtigste Mechanismus von Influenza-Viren, welche als Einzelstrangviren in erster Linie durch TLR3 und TLR7 erkannt werden und wegen ihrer freien 5'-Triphosphatenden auch durch RIG-I, sei hier erwähnt. Diese bilden das sogenannte NS1-Protein aus, welches einen Komplex mit RIG-I bildet und somit die Erkennung durch RIG-I und die daraus resultierende Aktivierung der antiviralen Mechanismen verhindert [66, 67]. Aber auch die Synthese von NF- $\kappa$ B und IRF3 wird durch die Anwesenheit des NS1-Proteins inhibiert, darüber hinaus auch noch die Synthese einer Reihe anderer antiviraler Moleküle, für welche die genauen Mechanismen jedoch vielfach noch nicht bekannt sind [72, 73].

## 5. Das Interferon-System

Bereits 1956 beschrieben Mayr und Wittmann die Beobachtung des sogenannten Ringzonenphänomens auf der Chorionallantoismembran von Hühnerküken [74]. Jedoch erst Isaacs und Lindenmann vermuteten bei ihren Versuchen zur Virusinterferenz einen in der Chorionallantoisflüssigkeit enthaltenen löslichen Stoff, welchen sie mit einem interessanten Experiment nachwiesen. Sie infizierten Hühnerembryonen mit hitzeinaktivierten Viren, entnahmen diesen Hühnerembryonen anschließend Chorionallantoisflüssigkeit, welche sie auf andere Hühnerembryonen übertrugen, die sie anschließend ebenfalls infizierten. Bei dieser Infektion konnten sie eine Interferenz der Virusvermehrung in den Hühnerembryonen feststellen, sodass sie einen löslichen Stoff definierten, welchem sie den Namen Interferon gaben, da sie ihn als Mediator der Interferenz vermuteten. [75-78].

Da sich zu diesem Zeitpunkt fast ausschließlich Virologen mit dem neu entdeckten Stoff beschäftigten, wurden umfassende Erkenntnisse zur antiviralen Wirkung des Interferons gewonnen.

Erst 1969 gelang Gresser der Nachweis der antitumoralen Wirkung von Interferon in Mäusen [79-84], wodurch ein neuer Forschungsschwerpunkt geschaffen wurde.

Bereits zwei Jahre später konnte Strander IFN aus menschlichen Blutzellen gewinnen [85]. Jedoch waren enorme Mengen an Blut für relativ kleine Interferonmengen von Nöten. Mit dem so gewonnenen IFN konnte er jedoch bereits 1973 eine Phase I-Studie zur antitumoralen Wirkung im Menschen durchführen [86].

Anfang der 80er Jahre gelang es Weissmann, die Sequenz für humanes IFN- $\alpha$  zu entschlüsseln und mit Hilfe von *E. coli* rekombinantes humanes IFN herzustellen [87].

Es dauerte jedoch noch bis 1994, bis Marcus und Mitarbeiter das Gen für IFN- $\alpha$  des Huhnes klonieren konnten [88].

Heute werden drei Gruppen oder besser Typen von Interferonen unterschieden [69]:

1. Typ-I-IFN : IFN- $\alpha$  (alpha) (mit 13 humanen Subtypen [68, 89]); IFN- $\beta$  (beta) (1-3 Subtypen [68]); IFN- $\epsilon$  (epsilon); IFN- $\kappa$  (kappa); IFN- $\omega$  (omega); IFN- $\delta$  (delta); IFN- $\tau$  (tau); IFN- $\zeta$  (zeta)

Diese Gruppe von Interferonen, mit Ausnahme von IFN- $\tau$  (tau), kann von allen Körperzellen, welche einen Zellkern besitzen, bei der Anwesenheit von Viren synthetisiert werden [73].

2. Typ-II-IFN: IFN- $\gamma$  (gamma)

Dieses Interferon kann nur von Immunzellen (T-Lymphozyten und NK-Zellen) nach dem Kontakt mit AG-präsentierenden Zellen gebildet werden [73].

3. Typ-III-IFN: IFN- $\lambda$ 1 (lambda1); IFN- $\lambda$ 2 (lambda2); IFN- $\lambda$ 3 (lambda3) auch bezeichnet als IL-28A; IL-28B; IL-29 [90]

Diese Gruppe von Interferonen wird von speziellen introntragenden Genen codiert und wird genau wie die Typ-I-Interferone als direkte Antwort auf virale Infektionen gebildet [68].

Welche enorme Bedeutung den IFNs bei der Bekämpfung viraler Infektionen zukommt, lässt sich [91] entnehmen. In dieser Publikation wird beschrieben, welchen Einfluss die vom Körper gebildeten Typ-I-IFN auf die Replikation von H5N1-Viren besitzen. Bereits aus den 60er Jahren sind Versuche von Finter *et al.* bekannt, in denen Mäuse durch die Gabe von IFN erfolgreich vor der Infektion mit sowohl Encephalomyocarditis-Virus (EMCV) als auch Semliki Forest-Virus (SFV) geschützt werden konnten [92]. In Zellkultur-Versuchen konnte auch ein Schutz vor wesentlich gefährlicheren Viren, z. B. dem Severe acute respiratory syndrome-Corona-Virus (SARS-CoV) durch Vorbehandlung mit IFN induziert werden [93]. Aber auch für Influenza-Virusinfektionen sind Versuche beschrieben, bei denen ein Schutz vor den Viren durch eine Behandlung mit IFN induziert werden konnte. Dieser Schutz vor Influenza-Viren konnte nicht nur in der Zellkultur beobachtet werden, sondern ist auch aus *in vivo*-Versuchen bekannt. So gelang es sowohl Körner *et al.* [94] als auch Szretter *et al.* [91] durch

eine Vorbehandlung mit IFN einen Schutz in Mäusen zu induzieren. Van Hoesen *et al.* beschäftigten sich mit den Möglichkeiten, welche eine Vorbehandlung mit IFN vor AIV-Infektionen im Meerschweinchen bietet [95]. Aber auch im Frettchen konnten dazu bereits erste Beobachtungen publiziert werden [96]. Bei all diesen Versuchen konnten die klinischen Symptome abgemildert und auch die Virusausscheidung deutlich gesenkt werden. Auch wenn die Infektion selber nie vollständig verhindert werden und die Mortalitätsrate häufig lediglich gesenkt werden konnte, stellt die Behandlung mit IFN doch einen ersten Ansatzpunkt zur Bekämpfung von Influenza-Virusinfektionen dar. Aber nicht nur bei viralen Infektionen spielen Interferone eine Rolle, sondern ebenso bei der Behandlung von Tumoren. Auch bei der Multiplen Sklerose werden Interferone mittlerweile standardmäßig eingesetzt. Eine Zusammenfassung der wichtigsten Fakten ist in [97] beschrieben.

### 5.1 Das IFN-System von Vögeln

Bisher konnte man bei Vögeln noch nicht alle Interferone nachweisen, die man auch im Säuger gefunden hat. Eine Übersicht der bisher beschriebenen Interferone spiegelt Tabelle 7 wieder.

Spezies	Nachgewiesene Interferone	Quelle
Hühner	IFN- $\alpha$ (10 Gene); IFN- $\beta$ (1 Gen); IFN- $\gamma$ (1 Gen); IFN- $\lambda$	[88, 98-103]
Truthahn	IFN- $\alpha$ ; IFN- $\gamma$	[104, 105]
Fasan	IFN- $\gamma$	[104]
Wachtel	IFN- $\gamma$	[104]
Perlhuhn	IFN- $\gamma$	[104]
Ente	IFN- $\alpha$ (1 Gen); IFN- $\gamma$	[101, 104, 106-108]

Tabelle 7: Übersicht über bisher nachgewiesene IFNs bei Vögeln, Tabelle übernommen aus [101], modifiziert und ergänzt

Die Interferone von Vögeln haben aber in etwa die gleiche Bedeutung, wie die Interferone, die beim Säuger nachgewiesen wurden. So konnten sowohl *in vitro* [107, 109-112], als auch *in vivo* [110, 113] die antiviralen Eigenschaften von Interferonen im Vogel dokumentiert werden und auch die antitumorale Wirkung konnte *in vivo* bestätigt werden [114], zumindest bei virusinduzierten Tumoren.

Seit im März 2004 das komplette Hühnergenom entschlüsselt wurde [115], konnten auch verschiedene Zytokine und Chemokine sowie deren Rezeptoren gezielt gesucht und teilweise kloniert werden. Expressionsänderungen dieser Gene im Verlauf von verschiedenen Infektionen wurden gezielt durch Microarray-Analysen untersucht [116]. Aus dem Säuger weiß man um die Bedeutung der TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 zur Erkennung von viralen Infektionen. Im Huhn konnten jedoch bisher nicht alle diese TLRs gefunden werden. Nur die Existenz von TLR3 und TLR7 als Sensoren für virale Bestandteile konnte bestätigt werden [116]. Aber in verschiedenen Versuchen konnten auch Reaktionen mit PAMPs, welche typischerweise von TLR9 erkannt werden, gemessen werden [115]. Daraufhin wurde, nach der Entschlüsselung der Sequenz vom chTLR7, dieser mit allen huTLRs der TLR9-Subfamilie verglichen. Das chTLR7 besitzt 63,7% Ähnlichkeit mit dem huTLR7, 41,4% mit dem huTLR8 und 36,4% mit dem huTLR9, was die Reaktion auf die Stimulation durchaus erklären könnte [115]. Darüber hinaus wurde auf Zellen, welche im Säugerorganismus den TLR9 tragen (z.B. Leukozyten, Heterophile, Monozyten), im Huhn die Expression des chTLR7 bestätigt [115], was ein weiteres Indiz für die Vereinigung der kompletten TLR9-Subfamilie im chTLR7 darstellt. Es wurde mittlerweile aber noch ein weiterer TLR entdeckt, welcher die Bezeichnung chTLR21 trägt [117-120] und als homolog zum TLR9 der Säuger beschrieben wird [117] und damit ebenso eine Reaktion auf CpG-Motive erklären würde.

Der Signalweg, der zwischen der Erkennung von viralen Infektionen durch die TLRs und der Expression von IFN liegt, ist im Huhn noch relativ unklar. Zwar ist es sehr wahrscheinlich, dass auch dort eine Homologie zum Säuger besteht, jedoch müssen die Beweise dafür erst noch erbracht werden.

## 6. Die Rolle des Interferon-Systems in der Influenza-Virusinfektion beim Huhn

Nachdem die Immunantwort des Körpers bei der Infektion mit Influenza-Viren jahrelang nur im Säugerorganismus betrachtet wurde, ist diese in den letzten Jahren auch im Vogelorganismus untersucht worden. Aus diesen Versuchen ergaben sich von der Erkennung möglicher PAMPs bis hin zur Aktivierung von antiviralen Mechanismen kleine Bruchstücke, aus denen man zukünftig ein komplettes Bild über die Vorgänge im Vogel erhalten könnte.

So konnte bei der Infektion von Monozyten/Makrophagen mit HPAIV H7N2 eine Herunterregulation der Expressionsrate von Interferon-Rezeptorgen gemessen werden [116], aber auch infrage kommende Signalweg-Moleküle waren herunterreguliert [116].

In anderen Versuchen wurde die direkte Reaktion des IFN-Systems untersucht und man beobachtete eine Senkung der Expression der Gene für IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  in Hühnern, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* [121-123]. Um untersuchen zu können, ob diese Verringerung der Expression auf das Vorhandensein vom NS1-Protein zurückzuführen ist, wurden Viren mutiert, sodass bei den Viren das NS1-Protein vollständig oder aber teilweise fehlte. Die Viren, welche gar kein NS1-Protein hatten, konnten die Produktion von IFN in Hühnerzellen nicht länger unterdrücken [121-124] und deren Replikationsfähigkeit war im Wirt stark herabgesetzt [123]. Eine anschließende Infektion mit diesen Viren in Mäusen mit einem Knockout im IFN-System zeigte, dass diese Viren sich ohne Probleme replizieren konnten [123]. Viren, in denen das Gen fürs NS1-Protein nur verkürzt war, konnten die IFN-Synthese in den Zellen nicht vollständig unterdrücken, aber dennoch besser als die Viren mit vollständig fehlendem Gen fürs NS1-Protein [123].

In einem Versuch von Sarmiento *et al.* wurde die RNA-Expression von Hühnerembryofibroblasten nach 4-stündiger Infektion mit zwei verschiedenen HPAIV vergleichend mit Hilfe von Microarrays gemessen. Dabei wurden 191 Gene identifiziert, bei denen der Expressionsunterschied mindestens zweifach war. Zehn dieser Gene stehen im Zusammenhang mit dem Immunsystem [125]. Zu den signifikant höher, wenn auch nicht mindestens zweifach höher

exprimierten Genen gehören unter anderem auch IRF10, STAT3 und JAK. In diesem Versuch wurde darüber hinaus mit Hilfe der qRT-PCR eine Steigerung der Expression von Mx1 und IFN- $\alpha$  24h nach der Infektion von Hühnerembryofibroblasten gemessen. Das Vorhandensein von IFN- $\alpha$  in den Überständen dieses Versuches, konnte zusätzlich mittels Elisa bestätigt werden [125].

Darüber hinaus wurde auch viel Arbeit in die Untersuchung des Mx-Proteins investiert, welches im Säuger essentiell in der antiviralen Abwehr ist [17-21]. Die antivirale Wirkung des Mx-Proteins ist im Vogel jedoch etwas umstritten, da im Vogel unterschiedliche Ergebnisse erarbeitet wurden. So waren transfizierte Hühnerzellen, welche Mx exprimierten, keineswegs vor einer Infektion mit Influenza geschützt [126]. *In vivo* konnte für einige Hühnerlinien ein Schutz durch das Mx-Protein beobachtet werden, für andere wieder nicht [127].

Bei einem weiteren Versuch, bei dem die Reaktion des angeborenen Immunsystems untersucht wurde, wurden Hühner mit drei verschiedenen Influenza-Viren infiziert. Zwei dieser Viren waren als HPAIV eingestuft, wovon eines eine Mortalität von 100% binnen zwei Tagen erreichte (Virus A), das andere binnen sechs Tagen (Virus B). Das dritte Virus (Virus C), eingestuft als LPAIV, wies nach zehn Tagen eine Mortalität von 0% auf. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Tiere getötet und die Lungen mittels qRT-PCR auf das Vorhandensein von mRNA für Zytokine untersucht.

Virus A: bereits nach 12h war ein deutlicher Anstieg für IFN- $\alpha$ ; IFN- $\beta$ ; IL-6; IL-8; IL-15 und IL-18 zu beobachten, mit einem Maximum bei 24h. 32h nach der Infektion war schon wieder ein deutlicher Abfall der Menge an mRNA für diese Zytokine zu messen. Auch für IFN- $\gamma$  und IL-4 konnte ein Anstieg 12h p.i. gemessen werden, jedoch war der Abfall der Menge an mRNA hier bereits nach 24h messbar.

Virus B: 12h nach der Infektion wurde hier lediglich ein Anstieg für IFN- $\alpha$ ; IFN- $\beta$ ; IL-6; IL-8 und IL-15 gemessen, ebenfalls mit einem Maximum zum Zeitpunkt 24h nach der Infektion.

Virus C: Bei Hühnern, welche mit diesem Virus infiziert wurden, war lediglich ein moderater Anstieg für IFN- $\alpha$ ; IL-4; IL-6; IL-15 und IL-18 zu messen und das

auch erst 24h bzw. 48h nach der Infektion [42].

In einem anderen Versuch wurde der Respirationstrakt von Hühnern in mehrere Teile gegliedert. Um anschließend Expressionsunterschiede von Zytokinen beurteilen zu können, wurde verglichen, in welchen Anteilen mehr RNA von LPAIV zu isolieren ist. Im oberen Anteil der Trachea konnte signifikant mehr virale RNA nachgewiesen werden als im unteren Anteil. In der Lunge war in den Arealen, die Primär und Sekundärbronchien enthalten, eindeutig mehr virale RNA nachweisbar, als in Arealen die Tertiärbronchien enthalten [128]. Bei den gemessenen Zytokinen verhielt es sich wie folgt: Bei der Kontrollgruppe wurden zwischen oberen und unteren Tracheaarealen keine Unterschiede beobachtet. Aber bei der Infektionsgruppe war eine Steigerung von 6 Ct-Werten für IL-1 $\beta$  und IL-6 sowie von immerhin 2 Ct-Werten für IFN- $\beta$  im Vergleich zur Expression dieser Zytokine in der Kontrollgruppe nachzuweisen. Die Lungen reagierten dafür bereits bei der Kontrollgruppe, welche Salzlösung als Aerosol verabreicht bekamen, mit einer Steigerung der RNA-Menge für IL-6 in den Bereichen von Primär- und Sekundärbronchien im Vergleich zu den Bereichen mit Tertiärbronchien. Bei der Infektionsgruppe bildeten diese Bereiche nicht nur mehr IL-6, sondern auch mehr IL-1 $\beta$ . Darüber hinaus war in der Infektionsgruppe auch insgesamt mehr RNA für IL-6 und IL-1 $\beta$  nachweisbar als in der Kontrollgruppe [128].

## **IV Material und Methoden**

### **1. Tiere und Haltung**

#### **Hühner**

Die Versuche in München wurden mit Hühnern der Linien M11 und LSL durchgeführt, die Eier der Linie M11 stammten aus dem Institut für Tierzucht des Friedrich-Löffler-Instituts (Mariensee) und wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Steffen Weigend zur Verfügung gestellt. Tiere der Linie LSL wurden von der Firma Lohmann Tierzucht aus dem Gut Heinrichsruh (Freising) bezogen. Die Eier wurden unter Standardbedingungen am Institut ausgebrütet und die Tiere anschließend in Volieren aufgestellt. Wasser und handelsübliches Alleinfutter wurden ad libitum zur Verfügung gestellt.

Für die Versuche am Friedrich-Löffler-Institut wurden SPF-Hühner der Linien Lohmann Valo im Alter von fünf Wochen von der Firma Lohmann Tierzucht (Ringstedt) auf die Insel Riems geliefert und dort in Käfigen oder in Bodenhaltung in den L3+-Stallungen aufgestellt. Auch diese Tiere bekamen Wasser und ein handelsübliches Alleinfutter ad libitum zur Verfügung gestellt.

### **2. Gewinnung von Leukozyten aus der Milz**

Für die Organentnahme wurden die Tiere mittels Genickschlag betäubt und durch Eröffnung der Vena jugularis ausgeblutet. Die Milz wurde steril herauspräpariert und sofort in eisgekühltes PBS verbracht. Unter einer Sterilwerkbank wurde die Milz in eine Petrischale mit eisgekühltem PBS überführt und ihre Kapsel eröffnet. Mit dem Stempel einer 20ml-Spritze wurde das Milzgewebe dann vorsichtig durch ein steriles Metallsieb gedrückt, sodass die Zellen aus dem Gewebe gelöst wurden. Die Zellsuspension wurde in ein 50ml Falcon-Röhrchen überführt, mit kaltem PBS aufgefüllt und für 10min in einen Behälter mit Eis gestellt, damit sich noch enthaltene Gewebereste absetzen konnten. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt, in ein neues 50ml Falcon-Röhrchen überführt und anschließend bei 4°C mit einer Geschwindigkeit von 225 x g für 10min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Zellpellet mit frischem PBS resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:2 vorsichtig auf Ficoll geschichtet,

anschließend bei Raumtemperatur für 12min bei einer Geschwindigkeit von 650 x g für 20min zentrifugiert. Danach wurde die Interphase abpipettiert und in ein neues 50ml Falcon-Röhrchen überführt, welches zum Waschen mit PBS aufgefüllt und erneut bei 4°C mit einer Geschwindigkeit von 225 x g für 10min zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet mit Medium resuspendiert. Anschließend wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer die Leukozytenzahl quantifiziert und die Suspension auf die gewünschte Zellzahl eingestellt.

### **3. Gewinnung von Leukozyten aus dem Blut**

Den Hühnern wurde mit einer 5ml Spritze, in welcher rund 20I.E. Natrium-Heparin vorgelegt waren, eine Blutprobe aus der Vena jugularis oder aus der Vena basilica entnommen. Anschließend wurde die Blutprobe mit der gleichen Menge an PBS verdünnt und im Verhältnis 1:2 vorsichtig auf Ficoll geschichtet und dann bei Raumtemperatur für 20min bei einer Geschwindigkeit von 650 x g zentrifugiert. Die dann zu gewinnenden Zellen der Interphase wurden genauso wie unter IV2 beschrieben gewaschen, gezählt und auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

### **4. Gewinnung von Gewebeproben für den IFN-Proteinnachweis**

In den Versuchen wurden regelmäßig Organproben für die Messung der IFN-Konzentration entnommen. Dabei wurde besonders darauf geachtet, jeweils die gleichen Stellen in Lunge, Milz und Gehirn zur Beprobung auszuwählen, um ein möglichst homogenes Material zu erhalten. Die Gewebeproben wurden unmittelbar nach der Entnahme in Kryo-Röhrchen überführt, das Gewicht der Probe bestimmt und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Bearbeitung bei -70°C gelagert.

Am Friedrich-Löffler-Institut musste dieser Arbeitsablauf abgeändert werden. Dort wurden die Gewebeproben in trockeneisgekühltem n-Heptan schockgefroren und anschließend ebenfalls in Kryo-Röhrchen bei -70°C gelagert.

Zur Weiterverarbeitung wurden die Proben in PBS als Pufferlösung homogenisiert. In München und Mittelhäusern wurde dafür ein Stabhomogenisator und am FLI ein Schüttelhomogenisator für 2ml Reagiergefäße verwendet. Anschließend wurden die Gefäße bei 4°C und 300 x g 10min zentrifugiert, damit sich eventuell noch vorhandene Gewebereste auf dem Boden absetzen konnten, der flüssige Überstand wurde abpipettiert, aliquotiert und anschließend bis zur Messung bei einer Temperatur von -70°C gelagert.

Um die Gefahr einer Kontamination der Proben, welche mit dem Stabhomogenisator verarbeitet wurden, zu minimieren, wurde nach jeder Probe ein spezielles Reinigungsprotokoll beachtet. Der Aufsatz des Homogenisators wurde immer mit destilliertem Wasser gereinigt, um grobe Verschmutzungen zu entfernen, anschließend mit einer 0,5M NaOH-Lösung gespült und danach zweimalig mit destilliertem Wasser nachgespült und mit Zellstofftüchern trockengetupft. Beim Schüttelhomogenisator musste dieser Aufwand nicht betrieben werden, da die Organproben in den 2ml Reagiergefäßen homogenisiert wurden und somit getrennt voneinander waren.

## **5. Gewinnung von Plasmaproben für den IFN-Proteinnachweis**

Den Hühnern wurde eine Blutprobe aus der Vena jugularis oder der Vena basilica entnommen und sofort in ein Lithium-Heparin-Röhrchen gegeben, dieses wurde kurz geschwenkt und sofort auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Röhrchen bei 4°C und einer Geschwindigkeit von 300 x g für 10min zentrifugiert, sodass sich die zellulären von den flüssigen Blutbestandteilen trennten. Die flüssige Phase wurde abpipettiert, in mehrere Fraktionen aliquotiert und bei einer Temperatur von -70°C bis zur Messung gelagert.

## **6. Kultivierung der Zellen**

### **6.1 Medien und Zusätze**

Beide unten aufgeführten Zelllinien wurden in DMEM High Glucose mit 8% FBS, 2%ChS und 1% Pen/Strep kultiviert. Zum Lösen von adhärennten Zellen aus der Zellkulturflasche wurde einfach konzentriertes Trypsin-EDTA verwendet, für die Waschschrirte ausschließlich PBS. Für die Milz- und Blutlymphozyten wurde

RPMI 1640 mit 10% FBS und 1% Pen/Strep verwendet.

## **6.2 Zelllinie CEC32**

Bei diesen Zellen handelt es sich um eine Fibroblastenzelllinie, welche, anders als ursprünglich beschrieben [129], nicht vom Huhn, sondern von der Wachtel stammt [130].

## **6.3 Zelllinie CEC511**

Zur Erstellung dieser Reporterzelllinie wurden CEC32-Zellen stabil mit einem Plasmid transfiziert, welches die Expression des Luciferase-Gens des Glühwürmchens unter der Kontrolle des Mx-Promotors erlaubt [111, 131]. Die Zellen wurden nach jeder dritten Passage in normalem Medium einmal in Medium mit dem Zusatz von G418 in einer Konzentration von 250µg/ml kultiviert.

## **7. Verwendete TLR-Liganden**

### **7.1 Peptidoglycan von Staphylococcus aureus (PGN-SA)**

- InvivoGen (tlrl-pgnsa)

### **7.2 CpG-Motive Typ B (ODN 2006)**

- InvivoGen (tlrl-hodnb)

### **7.3 Synthetisches Analogon von doppelsträngiger RNA (Poly I:C)**

- InvitroGen (tlrl-pic)

### **7.4 Gereinigtes Lipopolysaccharid von Escherichia coli (LPS)**

- InvivoGen (tlrl-eklps)

### **7.5 Gereinigtes Flagellin von Staphylococcus thyphimurium**

- InvivoGen (tlrl-stfla)

## **7.6 Synthetischer Ligand für TLR7/8 (R848)**

- InvivoGen (tlrl-r848)

## **7.7 Endotoxinfreie bakterielle DNA von Escherichia coli**

- InvivoGen (tlrl-ednarf)

## **7.8 Muramyl dipeptide - MDP**

- InvivoGen (tlrl-mdp)

## **8. Verwendete Antikörper**

Alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper stammen aus diesem Institut. Die Beschreibung der Herstellung und Gewinnung ist vorhergehenden Dissertationen zu entnehmen [132].

## **9. verwendete Viren**

### **9.1 Vesikulostomatitisvirus**

- Stomatitis vesicularis-Virus, Serotyp indiana

### **9.2 Newcastle Disease-Virus (Attenuiertes Impfvirus)**

- Lohmann Animal Health GmbH (AviPro ND C131)

### **9.3 Influenza Viren**

Alle Viren für die Influenza-Versuche wurden uns freundlicherweise von Nicola Penski und Antje Reuter aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Stäheli, von der Abteilung für Virologie, der Universität Freiburg angezüchtet und in den gewünschten Konzentrationen zur Verfügung gestellt.

#### **9.3.1 Anzucht der Viren**

MDCK-NS1-GFP-Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit Zellmedium (DMEM + 10% FBS + 1% Pen/Strep + 4M Glutamin) ausgesät und mit einer MOI von 0,001 in PBS mit 0,3% BSA infiziert. Die Zellkulturflaschen wurden dann für 1h

bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend wurde das Inokulum entfernt und durch Infektionsmedium (DMEM + 2% FBS + 1% Pen/Strep + 4M Glutamin) ersetzt. Die Flaschen wurden dann weiter bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, bis ein zytopathischer Effekt (CPE) erkennbar war, i. d. R. dauerte es 2-3 Tage. Anschließend wurde das Medium abpipettiert und, um noch vorhandene Zellreste zu entfernen, abzentrifugiert. Das so erhaltene Virusisolat wurde mit PBS auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt. Diese Konzentrationen sind den einzelnen Versuchen direkt zu entnehmen.

### **9.3.2 R65wt –Virus und rec. R65wt-Virus**

Bei dem R65wt handelt es sich um ein in Deutschland mehrfach isoliertes Virus, welches als HPAIV A/Cygnus cygnus/Ruegen-Germany/2006 bezeichnet wird [133, 134].

### **9.3.3 R65delNS1-Mutante**

Die R65-Mutante mit der Deletion des NS1-Proteins wurde nach dem von Jürgen Stech, vom Labor für Molekulare Pathogenese und Ökologie der Influenza-Viren des Friedrich-Löffler-Instituts (Greifswald - Insel Riems), beschriebenen Verfahren [135, 136] erzeugt, angezchtet und uns zur Verfügung gestellt.

## **10. Biologisch aktive Proteine**

Sowohl das IFN als auch das Kontrollprotein wurden uns freundlicherweise von Nicola Penski und Antje Reuter aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Stäheli, von der Abteilung für Virologie der Universität Freiburg exprimiert und zur Verfügung gestellt.

### **10.1 Interferon**

Rec. chIFN- $\alpha$  in einer Konzentration von  $3 \times 10^7$  U/ml gelöst in 50mM NaCl und 50mM NaOAc bei einem pH-Wert von 3,6. Dieses IFN wurde mit PBS auf die gewünschte Konzentration, welche den Einzelversuchen zu entnehmen ist, verdünnt.

## **10.2 Kontrollprotein**

Rec. huMx A in einer dem IFN vergleichbaren Proteinkonzentration von 0,4mg/ml in einer 50mM NaCl-Lösung bei einem pH-Wert von 3,6. So wie das IFN für die gewünschte Konzentration mit Hilfe von PBS verdünnt werden musste, wurde auch das Kontrollprotein verdünnt.

## **11. Liste der Puffer und Reagenzien**

### **11.1 n-Heptan**

- Carl Roth (Rotisolv X878.1)

### **11.2 Heparin**

- 1ml Heparin-Natrium 25000I.E./5ml (Braun,2047217)
- ad 10ml RPMI 1640 mit Glutamax (InvitroGen, 61870044)

### **11.3 0,5M NaOH-Lösung**

- 2g Natriumhydroxidplätzchen (Merck, 6462.1000)
- ad 100ml RNase-freies Reinstwasser

### **11.4 Ethanol 75%**

- 30 ml Ethanol absolute (Firma AppliChem, A3678,1000)
- ad 40ml Aqua dest.

### **11.5 Biocoll Separating Solution 500mL**

- Biochrom (L6115)

### **11.6 Luciferase Assay Reagent 1000 Assays**

- Promega (E1501)

### **11.7 Neutralrotlösung**

- Sigma (N 2889)

**11.8 Basal Iscove Medium**

- Biochrom (FG0465)

**11.9 DMEM High Glucose**

- Biochrom (FG0445)

**11.10 RPMI 1640 with Glutamax**

- InvitroGen (61870044)

**11.11 Chicken Serum New Zealand**

- InvitroGen (16110082)

**11.12 FBS Superior**

- Biochrom (S 0615)

**11.13 Penicillin/Streptomycin**

- Biochrom (A2213)

**11.14 G418 BC Lösung**

- Biochrom (A 2912)

**11.15 Trypanblau 0,5%**

- Biochrom (L6323)

**11.16 PBS**

- 40g Natriumchlorid für die Zellkultur (NaCl) (AppliChem, A4256,5000)
- 5,75g wasserfreies Di-Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (AppliChem A1046,5000)
- 1g Kaliumchlorid (KCL) (AppliChem, A2939,1000)
- 1g Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (AppliChem, A1043,1000)

- ad 1l Aqua dest.
- einstellen auf pH 7,2 mit 1M Salzsäure (HCL) (AppliChem, A1434,1000)

### 11.17 Guanidinhydrochlorid 3M

- 286,59g Guanidinhydrochlorid (AppliChem, A1499,1000)
- ad 100ml Aqua dest.

### 11.18 Einfriermedium

- 45ml FBS (Biochrom, S 0615)
- 5ml DMSO (Dimethylsulfoxid) (AppliChem, A3672,0100)

### 11.19 Trypsin-EDTA

- Biochrom (L2153)

## 12. Antiviraler Bioassay auf CEC32-Zellen (siehe IV6.2)

Dieser Bioassay basiert darauf, dass IFN, wenn es in ausreichender Menge auf die Zellen gelangt, deren antivirale Eigenschaften aktiviert und ihnen somit ermöglicht eine Infektion mit Vesikulostomatitisvirus zu überleben.

Die zu testenden Proben wurden zusammen mit einem IFN-Standard in 96-Loch-Flachbodenplatten in Zellkulturmedium  $\log_2$  titriert und anschließend mit 100 $\mu$ l einer Lösung von CEC32-Zellen in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen je ml versetzt. Zusätzlich wurden Zellen in acht Kavitäten nur mit Medium kultiviert. Vier dieser Kavitäten wurden nachfolgend in Medium weiter kultiviert (Zellkontrolle), die übrigen vier Kavitäten dienten als Viruskontrolle. Die Inkubation der Ansätze erfolgte für 24h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Anschließend wurden die Überstände der Zellen durch Abschütten entfernt und die Zellen, mit Ausnahme der Zellkontrolle, mit VSV in Zellkulturmedium versetzt. Nach weiteren 18h-24h Inkubation unter den genannten Bedingungen, wenn in der Viruskontrolle ein nahezu 100%-iger CPE erkennbar war, wurden alle Überstände entfernt und die Zellen mit einer 0,01%-igen Neutralrotlösung für weitere 2h kultiviert. Da lebende Zellen Neutralrotpartikel pinozytieren, konnte die Vitalität

der Zellen nach dem Waschen mit PBS und der Zelllyse mit Guanidinhydrochlorid im Elisa-Reader bei 540nm quantifiziert werden.

### **13. IFN-Reporterassay auf CEC511-Zellen (siehe IV6.3)**

In dieser Zelllinie führt die Bindung von IFN an seinen Rezeptor zur Aktivierung des Mx-Promotors und damit zur Transkription und Translation des Luciferase-Gens [131]. Die Luciferaseaktivität kann im Luminometer quantifiziert werden.

Die Experimente wurden in 48-Loch-Flachbodenplatten durchgeführt. CEC511-Zellen wurden dazu über Nacht bis zu einem Monolayer kultiviert und anschließend mit den Proben versetzt. Es wurden jeweils Duplikate der geeigneten Verdünnungen angesetzt. Zur Erstellung einer Standardkurve wurden vier Kavitäten mit rekombinantem IFN in Konzentrationen von 3,00U/ml, 1,50U/ml, 0,75U/ml und 0,38U/ml stimuliert, eine weitere Kavität erhielt nur Medium (Negativkontrolle). Nach der Zugabe der Proben wurde die Platte für 6h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Überstände entfernt, die Platte kurz mit PBS gewaschen, um dann die Zellen mit raumwarmem 1x Cell culture lyses reagent unter Schütteln (10min) aufzulösen. Die Lysate wurden auf eine 96-Loch-Rundbodenplatte überführt, bei 300 x g und Raumtemperatur für 10min zentrifugiert, um die Überstände, welche gemessen werden sollten, frei von Zelltrümmern gewinnen zu können. Abschließend wurde der Überstand in einem Verhältnis von 1:6 mit Luciferase Assay Reagent versetzt und die Emission von Lichtquanten im Luminometer gemessen. Aus den Duplikaten jedes Überstandes wurde der Mittelwert berechnet, außer bei großen Abweichungen der Einzelwerte zueinander. In diesem Fall wurde die Messung bzw. ggf. die gesamte Stimulation wiederholt.

Im Folgenden wird die Messung mittels zwei verschiedener Geräte beschrieben, da zu Beginn dieser Arbeit in München der Lumat LB 9501 verwendet wurde und erst später zum Glomax 96 Microplate Luminometer gewechselt wurde. Auf Riems wurde während des gesamten Forschungszeitraumes ebenfalls ein Lumat LB 9501 zur Messung genutzt.

### 13.1 Messung im Lumat LB 9501

Hier wurden 50 $\mu$ l Luciferase-Reagenz in einem speziellen 5ml Reagier- und Zentrifugengefäß vorgelegt. Dazu wurden 10 $\mu$ l der Probe pipettiert, kurz gemischt und dann sofort ins Luminometer verbracht. Das Luminometer war so eingestellt, dass es zu Beginn 2s pausiert hat, um die unkontrollierte Emission von Lichtquanten, welche zu Beginn der Reaktion auftritt, abzuwarten. Dann wurde über einen Zeitraum von 10s gemessen. Als Ergebnis präsentiert das Gerät eine Zahl an gemessenen Lichtquanten, die anhand des Standards in Units IFN umgerechnet werden konnte (siehe IV13.3).

### 13.2 Messung im Glomax 96 Microplate Luminometer

In diesem Gerät können 96 Proben gleichzeitig analysiert werden, wofür jedoch spezielle 96-Loch-Flachbodenplatten verwendet werden müssen.

Auf diese Platte wurden 10 $\mu$ l der Probe in jede Kavität pipettiert anschließend wurde die Platte ins Luminometer gestellt und die Messbedingungen am Computer definiert. Auch bei diesem Luminometer wurde die Messung um 2s verzögert, um die unkontrollierte Phase zu Beginn der Reaktion, gestartet durch automatische Einspritzung von 25 $\mu$ l des Luciferase-Reagenz, aus der Messung auszugrenzen. Anschließend wurde, anders als beim Lumat LB 9501, 2s lang gemessen, da es sich in Vorversuchen als völlig ausreichend und zuverlässig herausgestellt hatte. Auch dieses Luminometer gab die Anzahl der gemessenen Lichtblitze wieder, die anhand eines genau definierten Standards in U/ml umgerechnet werden konnten (siehe IV13.3).

### 13.3 Auswertung Reporterassay

Bei jeder Messung wurde eine genau definierte Menge an Standardproben mitgemessen, für die in Vorversuchen ermittelt wurde, dass sie den linearen Bereich der Reaktion abdecken. Anhand der Einzelwerte dieser Standardproben wurde mit Hilfe von Excel die Gleichung der Geraden ermittelt, anhand derer sich die gemessenen Lichtblitze aller anderen Proben dieser Messung in U IFN/ml umrechnen ließen. Es war lediglich darauf zu achten, dass die Werte der zu messenden Proben genau in dem Bereich lagen, der vom Standard abgedeckt

wurde. Dazu mussten mitunter mehrere Verdünnungen der Probe inkubiert und gemessen werden. Die verschiedenen Verdünnungen wurden aufsteigend analysiert und die erste Verdünnung, welche im linearen Bereich lag, wurde zur Auswertung herangezogen.

#### **14. Durchführung der intratrachealen Applikation**

Um die zu untersuchenden TLR-Agonisten, Viren und das IFN sicher in den Atemtrakt zu applizieren, wurden alle Lösungen mit Hilfe einer Knopfkanüle direkt in die Trachea instilliert. Dazu musste das Huhn von einer Hilfsperson fixiert werden, sodass von der durchführenden Person, von oben die Stimmritze des Huhnes betrachtet werden konnte. Zur Durchführung wurde die Stimmritze am Zungengrund aufgesucht und die Knopfkanüle vorsichtig 1-2cm tief in die Trachea vorgeschoben. Bei der Applikation wurde darauf geachtet, dass die Lösung langsam und gleichmäßig verabreicht wurde, um ein Abhusten zu vermeiden.

#### **15. Durchführung der oculonasalen Applikation**

Wenn die Infektion möglichst naturnah sein sollte, oder die Hühner zu jung waren, um ihnen größere Mengen in die Trachea applizieren zu können, wurde diese Art der Applikation gewählt. Dabei wurde das Huhn von einer Hilfsperson gehalten und der Kopf mittels Scherengriff fixiert, sodass ein ungehinderter Zugang gewährleistet war und es zu keinen störenden Abwehrbewegungen des Huhnes kam. Dann wurde mit einer 1ml Spritze ohne Kanüle tröpfchenweise in die Augen und die Nasenlöcher inokuliert.

#### **16. Durchführung der intravenösen Applikation**

Für diese Applikationsform standen zwei Venen zur Verfügung, entweder wurden die Flüssigkeiten über die Vena jugularis oder über die Vena basilica appliziert.

##### **16.1 Applikation über die Vena jugularis**

Dazu musste eine Hilfsperson das Huhn fixieren, indem das Huhn auf die linke Seite gelegt wurde und die Ständer und Flügel nach kaudal gezogen wurden. Der Durchführende hielt den Kopf des Tieres im Scherengriff, sodass Zeige- und

Mittelfinger den Kopf des Tieres fixierten und der Daumen der gleichen Hand zum Stauen der Vene zur Verfügung stand. Das Areal um die Vene wurde mit 70%-igem Ethanol desinfiziert und die so befeuchteten Federn wurden gescheitelt, um den Blick auf die Vene freizugeben. Die Applikation erfolgte durch eine Kanüle der Stärke 0,7mm x 30mm.

### **16.2 Applikation über die Vena basilica**

Dazu musste eine Hilfsperson das Huhn im Blumenstraußgriff halten, wobei das Huhn auf dem Rücken abgelegt wurde. Der linke Flügel des Huhnes wurde von der Hilfsperson freigegeben, sodass der Durchzuführende den Flügel zwischen Zeige- und Mittelfinger fixieren konnte. Der Daumen wiederum war frei, um die Vene zu stauen. Das Areal um die Vene wurde ebenfalls mit 70%-igem Ethanol desinfiziert und die so befeuchteten Federn wurden gescheitelt um den Blick auf die Vene freizugeben. Genau wie bei der Applikation über die Vena jugularis wurde für diese Form der Applikation eine Kanüle der Stärke 0,7mm x 30mm verwendet.

### **17. Durchführung der Lungenlavage**

Zur Durchführung der Lungenlavage wurden die Tiere mit Genickschlag betäubt und durch Eröffnung der Vena jugularis entblutet. Unmittelbar nach dem Eintritt des Todes wurde die Trachea freipräpariert und im kranialen Drittel quer zum Verlauf eröffnet. Von einer Heidelberger-Verlängerung wurde der „männliche“ Luer-Lock-Anschluss abgeschnitten, sodass das Schlauchende in die Trachea eingeführt und soweit vorgeschoben werden konnte, bis man die Bifurcatio tracheae erreicht hat. Um ein Herauslaufen der Lavageflüssigkeit zu verhindern, wurde die Trachea mittels einem polyfilen, nicht resorbierbarem Faden der Stärke Metric 5 fest verschlossen. Auf dem noch intakten Ende der Heidelberger-Verlängerung wurde eine 20ml Spritze mit 10ml PBS aufgesetzt, diese Menge wurde im Schuss in den Respirationstrakt appliziert und es wurde sofort wieder aspiriert. Die so gewonnene Flüssigkeit wurde aliquotiert und bis zur Messung im Reporter-genassay bei -70°C eingefroren.

## **18. Tierversuchsgenehmigungen**

### **18.1 Tierversuche in München**

Alle *in vivo* Versuche, die in München stattfanden, waren unter der Tierversuchsnummer 55.2-1-54-2531-121-09 genehmigt.

### **18.2 Tierversuche auf Riems**

Alle *in vivo* Versuche, die am FLI stattfanden, waren unter der Tierversuchsnummer LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-018/07 genehmigt.

## V Ergebnisse

### 1. *In vitro* Untersuchungen

#### 1.1 Titration des Standards auf CEC511-Zellen

Für die Quantifizierung der IFN-Antwort auf virale Infektionen beim Huhn standen zwei Testsysteme, die quantitative RT-PCR und ein Nachweissystem für biologisch aktives IFN, zur Verfügung. Da der Nachweis biologisch aktiven IFNs als aussagekräftiger eingestuft wurde und aufgrund des Verweises in der Literatur, dass die IFN-Gene bei Infektionen nicht so deutlich hochreguliert werden, wurde der Reporterassay als Messmethode präferiert. Da die Infektionsexperimente in verschiedenen Labors durchgeführt wurden, musste der Reporterassay so standardisiert werden, dass eine Vergleichbarkeit der Daten gewährleistet werden konnte. Als Standard wurde rekombinantes IFN- $\alpha$  des Huhns eingesetzt. Die Titration des IFNs auf CEC511-Zellen ergab eine hohe Sensitivität des Testsystems und eine lineare Titrationskurve im Bereich von 3U/ml und 0,4U/ml (Abbildung 5). Bei IFN-Konzentrationen oberhalb von 6U/ml wurde bereits das Plateau der Titrationskurve erreicht. Die Mediumkontrollen zeigten keine Aktivierung des Reportergens.

Aufbauend auf diesem Ergebnis wurde der IFN-Standard nochmals in drei unabhängigen Experimenten im Konzentrationsbereich von 3U/ml-0,19U/ml auf CEC511-Zellen titriert. Wie aus Abbildung 6 ersichtlich ist, waren die Standardreihen gut reproduzierbar. Der gewählte Konzentrationsbereich erwies sich auch hier als geeignet. Für die nachfolgenden Versuche wurde der IFN-Standard auf eine Konzentration von 1000 U/ml verdünnt, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Aliquots wurden auf Trockeneis in die jeweiligen L3+ Laborbereiche am IVI und FLI eingeschleust. Eine Vergleichbarkeit der Messergebnisse verschiedener Versuche konnte somit sichergestellt werden.

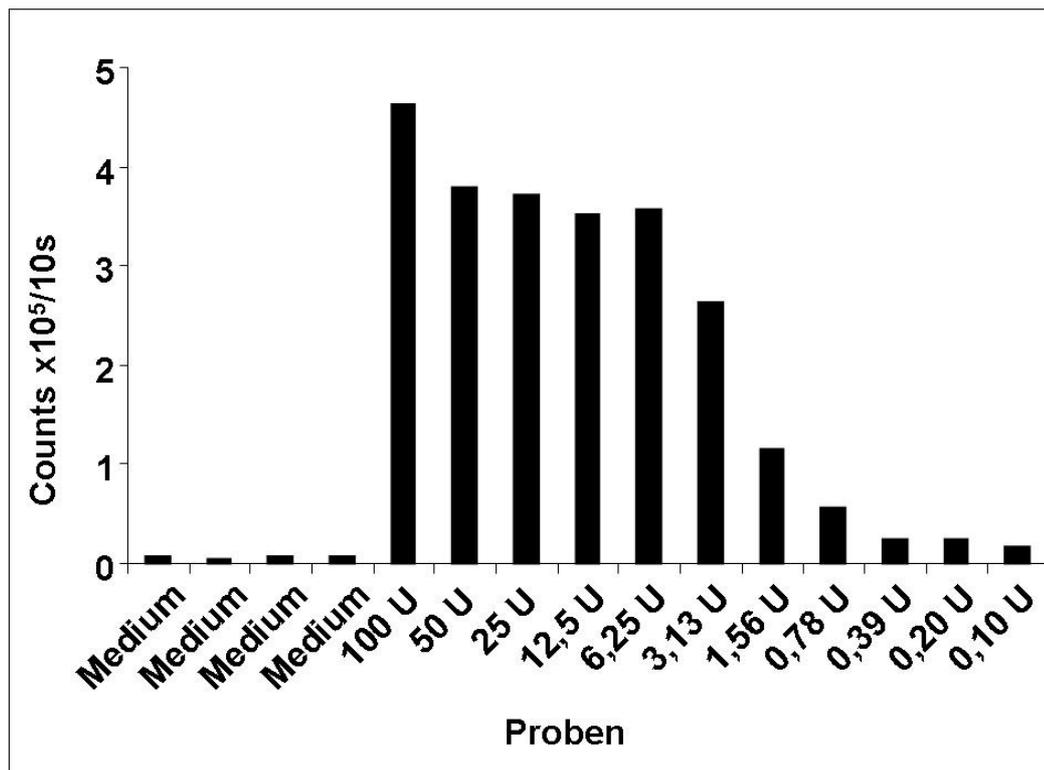


Abbildung 5: Titration des IFN-Standards auf CEC511-Zellen.

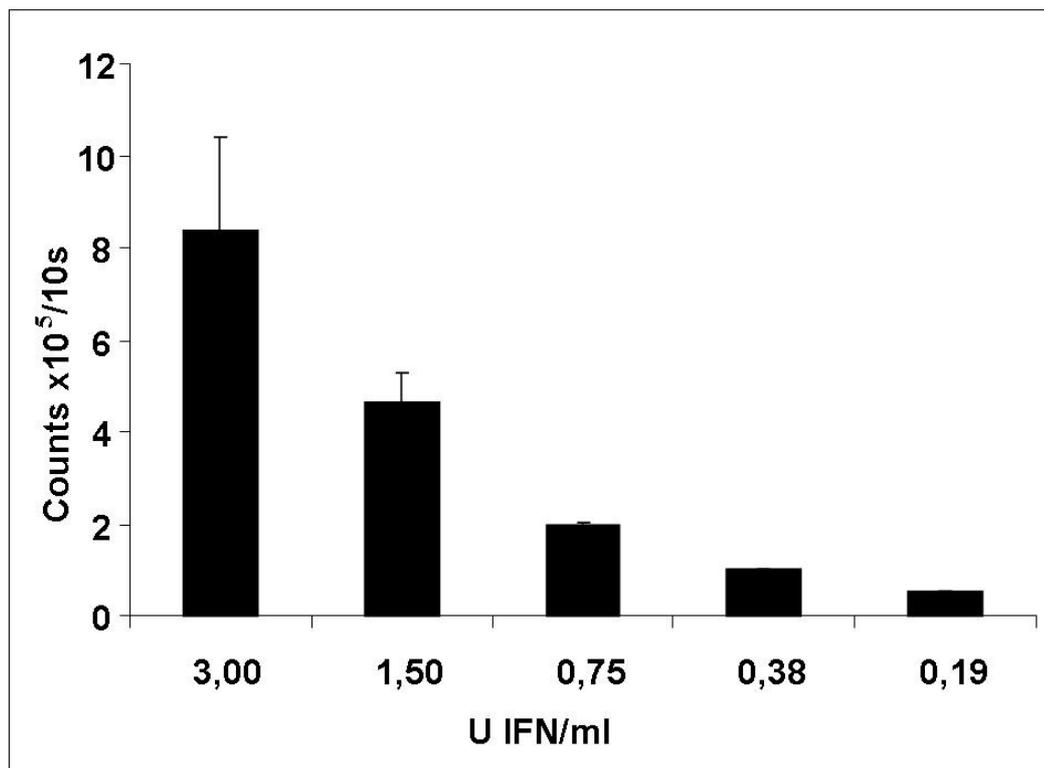


Abbildung 6: Titration des IFN-Standards auf CEC511-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

## 1.2 Messung verschiedener Interferone im Reporterassay

Beim Huhn waren schon zu diesem Zeitpunkt mehrere Interferone nachgewiesen worden und drei dieser Interferone lagen uns als rekombinante Zytokine vor. Um feststellen zu können, wie effektiv der Reporterassay auf die verschiedenen Interferone anspricht, wurde folgender Versuch durchgeführt. Die drei rekombinanten Hühnerinterferone (IFN- $\alpha$ ; IFN- $\beta$ ; IFN- $\gamma$ ) wurden auf den Reporterzellen titriert, sodass von jedem IFN eine  $\log_{10}$ -Titration mit Konzentrationen von 10 000U/ml bis 0,1U/ml aufgetragen wurde. Der Abbildung 7 kann das Ergebnis dieses Versuches entnommen werden. Es fällt auf, dass das eingesetzte IFN- $\gamma$  nicht in der Lage ist, den Reporter zu aktivieren. Bei den Typ-1-Interferonen ist die Aktivität des Reporters bei sehr hohen Dosen noch identisch, da dort wahrscheinlich das Plateau der Reporterantwort auf vorhandenes IFN erreicht wurde. Bei einer Reduktion der eingesetzten IFN-Menge fällt die Aktivität des Reporters bei IFN- $\beta$ -Behandlung deutlich schneller ab als bei IFN- $\alpha$ -Behandlung. Eine mögliche Erklärung wäre die Verwendung von Laborunits zur Quantifizierung der Interferone, bei denen 1 000U IFN- $\alpha$  unter Umständen nicht genau 1 000U IFN- $\beta$  entsprechen. Eine andere Erklärung wäre, dass IFN- $\alpha$  besser als IFN- $\beta$  dazu in der Lage ist, den Reporter zu aktivieren.

Trotzdem geht aus dem Versuch hervor, dass Typ-I-IFNs die Zytokine sind, welche den Reporter aktivieren und somit im Reporterassay nachgewiesen werden können.

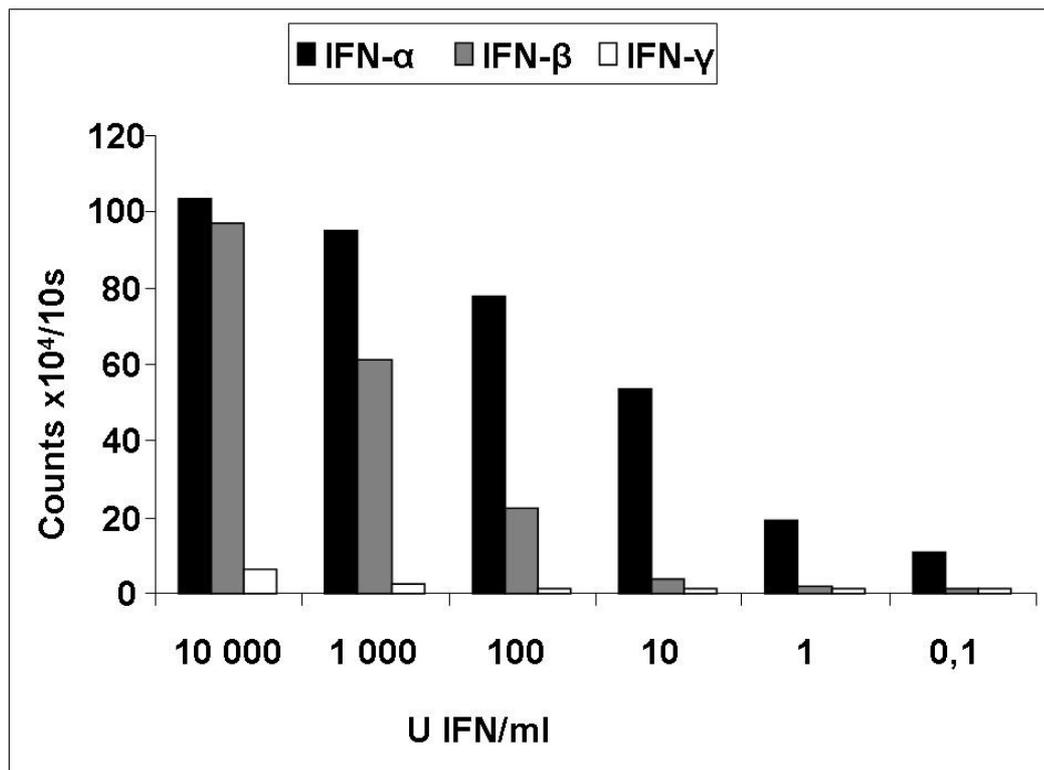


Abbildung 7: Titration verschiedener rekombinanter Hühnerinterferone auf den Reporterzellen.

### 1.3 Untersuchungen zur Spezifität des Reportergenassays

Bei dem im Reportergenassay verwendeten IFN-Standard handelt es sich um ein *E. coli* exprimiertes Hühner IFN- $\alpha$ . Da eine Kontamination der Präparation mit bakteriellen Produkten, insbesondere mit LPS, nicht ausgeschlossen werden konnte, galt es nachzuweisen, dass die beobachtete Reaktion der Reporterzellen ausschließlich auf das rekombinante Protein zurückzuführen ist. Hierfür standen folgende monoklonale Antikörper bzw. Antiseren zur Verfügung:

MAB 8A9: Ratte anti-chIFN- $\alpha$  (neutralisierend)

MAB 2A10: Maus anti-chIFN- $\alpha$  (nicht neutralisierend)

Anti-chIFN- $\alpha$  Antiserum aus dem Kaninchen als Serum und als gereinigte IgG-Fraktion

Anti-chIFN- $\beta$  Antiserum aus dem Kaninchen als Serum und als gereinigte IgG-Fraktion

IFN- $\alpha$  in einer Konzentration von 10U/ml wurde wie folgt mit den Antikörpern bzw. Antiseren versetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert: monoklonale

Antikörper und gereinigte Antiseren 20 $\mu$ g/ml; nicht gereinigte Antiseren 1:100 verdünnt. Anschließend wurden die Proben im Reporterassay getestet. Wie Abbildung 8 zeigt, konnte die Induktion des Reporters sowohl mit dem MAB 8A9 als auch mit dem Antiserum vollständig neutralisiert werden. Dagegen führten das Antiserum gegen IFN- $\beta$  und der nicht neutralisierende MAB 2A10 zu keiner Hemmung. Die Ergebnisse zeigen, dass die vom IFN-Standard induzierte Aktivierung des Reportergens ausschließlich auf das enthaltene rekombinante IFN- $\alpha$  zurückzuführen ist.

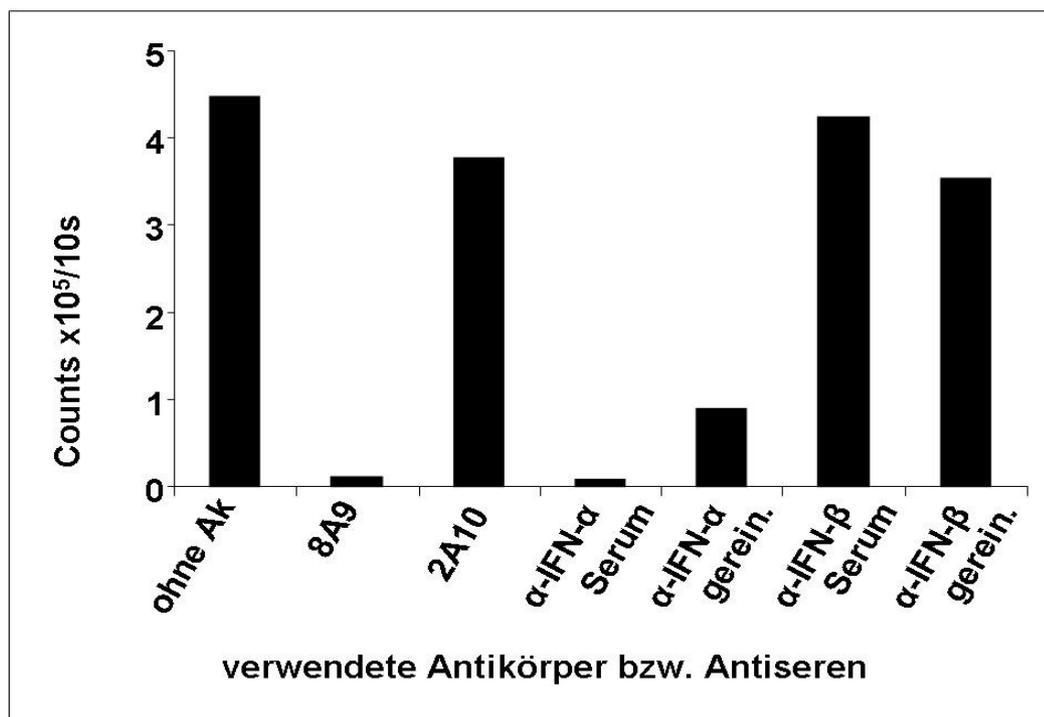


Abbildung 8: Im Diagramm dargestellt ist die spezifische Neutralisation des IFN- $\alpha$  Standards (10U) durch den MAB 8A9 und das polyklonale Antiserum gegen IFN- $\alpha$ .

#### 1.4 Induktion der Interferon-Synthese durch Toll-like-Rezeptor-Liganden und Newcastle Disease-Virus *in vitro*

Zu Beginn dieser Arbeit war der Antivirale Bioassay auf CEC32-Zellen zum Nachweis von biologisch aktivem IFN bereits etabliert, während der Reporterassay auf CEC511-Zellen noch nicht validiert war. Deshalb wurde für den folgenden Versuch noch der Antivirale Bioassay auf CEC32-Zellen herangezogen. Hierbei sollte untersucht werden, welche der zur Verfügung stehenden TLR-Liganden sich besonders zur Induktion einer IFN-Antwort eignen würden.

Für diesen Versuch wurden Milzleukozyten gewonnen und auf eine Endkonzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen je ml eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurde anschließend 1ml auf jede Kavität einer 24-Loch-Flachbodenplatte pipettiert. Die Zellen wurden durch Zugabe der jeweiligen TLR-Agonisten in 100 $\mu$ l Medium stimuliert. Der NDV-Impfstoff wurde mit  $1 \times 10^8$  bis  $1 \times 10^1$  EID<sub>50</sub>/Kavität, vom Poly(I:C) wurden 0,5 $\mu$ g/Kavität, vom LPS wurden 1 $\mu$ g/Kavität, vom Flagellin wurden 10ng/Kavität, vom R848 wurden 10ng/Kavität, von den CpG-Motiven wurden 20 $\mu$ g/Kavität und vom MDP wurden 1 $\mu$ g/Kavität eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde Medium verwendet. Nach 24h Inkubationszeit wurden die Überstände geerntet, aliquotiert und bei einer Temperatur von -70°C gelagert, bis die Überstände im Antiviralen Bioassay ausgetestet wurden.

Der Versuch zeigt, dass die Überstände von Milzleukozyten, welche mit NDV in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  EID<sub>50</sub> infiziert wurden, noch bis zur siebenten Titrationsstufe ausreichend IFN gebildet hatten, um die CEC32-Zellen vor der Infektion mit VSV zu schützen. In der achten Titrationsstufe war bereits ein deutlicher Abfall der Zahl an vitalen Zellen zu messen. Dieses Ergebnis konnte ebenso für Milzleukozyten erzielt werden, welche mit R848 und CpG-Motiven stimuliert wurden. Der Überstand von Leukozyten, welche mit Poly(I:C) stimuliert wurden, wies bis zur fünften Titrationsstufe genug IFN auf um die CEC32-Zellen vollständig zu schützen. Wenn die Milzleukozyten mit einer der anderen aufgeführten Substanzen in der angegebenen Konzentration stimuliert wurden, produzierten sie so wenig IFN, dass die Zahl der vitalen CEC32-Zellen im Antiviralen Bioassay unter der Nachweisgrenze lag.

Da in diesem Versuch der NDV-Impfstoff als guter Induktor der IFN-Produktion bestätigt werden konnte und der Impfstoff auch für *in vivo* Studien geeignet schien, wurde im Weiteren der Impfstoff als IFN-Induktor verwendet. Um sicherzustellen, dass auch immer ausreichend biologisch aktives IFN produziert und freigesetzt würde, wurde eine Standarddosis von min.  $1 \times 10^7$  EID<sub>50</sub>/ml festgelegt.

Die in diesem Versuch gewonnenen Überstände wurden nachfolgend auch noch im Reporterassay getestet. Die Ergebnisse des Antiviralen Bioassay konnten dabei für alle Proben bestätigt werden (Abbildung 9). Auch hier erwiesen sich

NDV, CpG-Motive und R848 als die potentesten Induktoren des IFN-Systems. Zudem zeigten die Daten, dass der Antivirale Bioassay und der Reportergenassay als gleichwertige Nachweismethoden verwendbar sind.

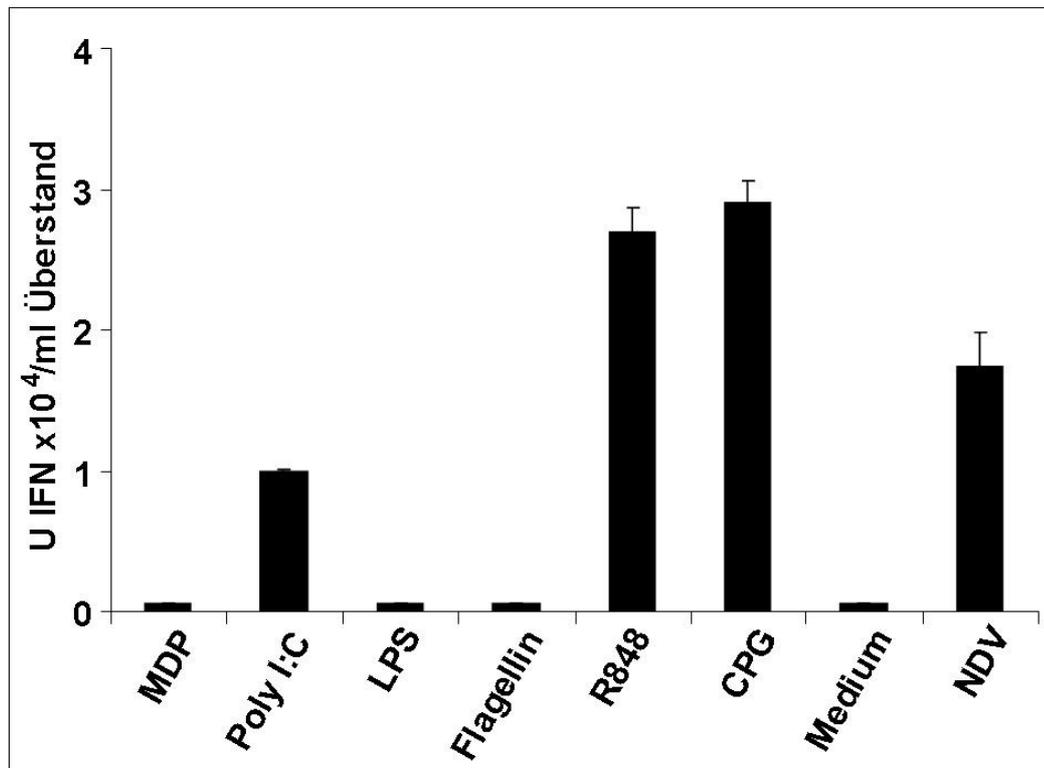


Abbildung 9: Bildung von IFN durch Milzleukozyten nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Liganden und NDV.

### 1.5 Titration von Newcastle Disease-Virus auf Milzleukozyten

Zwar wurde NDV bereits als guter IFN-Induktor bestätigt, jedoch schien der Stichprobenumfang dieses Versuches für eine so wichtige Aussage zu klein zu sein, daher wurde die Titration von NDV auf Milzleukozyten erneut durchgeführt. Die Milzleukozytenpräparationen wurden aus den Organen von drei 8 Wochen alten M11 Hühnern gewonnen und auf eine Konzentration von  $2,5 \times 10^6$  Zellen je ml eingestellt. Von diesen Zell-Suspensionen wurde je 1ml in acht Dellen einer 24-Loch-Flachbodenplatte gegeben und mit einer  $\log_{10}$  titrierten NDV-Lösung infiziert, sodass jeweils immer sieben Verdünnungsstufen des ND-Virus aufgetragen wurden und eine Delle als Mediumkontrolle zur Verfügung stand. Die Platte wurde für 24h bei 40°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Überstände der Dellen aliquotiert und bis zur Messung bei -70°C gelagert.

Wie Abbildung 10 zu entnehmen ist, konnte bei Viruskonzentrationen von kleiner gleich  $1 \times 10^4 \text{EID}_{50}$  keine IFN-Antwort induziert werden. Erst ab  $1 \times 10^5 \text{EID}_{50}$  wurde die IFN-Bildung induziert, wobei bei dieser Infektionsdosis noch starke interindividuelle Schwankungen auftraten, welche erst bei Infektionsdosen von  $1 \times 10^6 \text{EID}_{50}$  und  $1 \times 10^7 \text{EID}_{50}$  deutlich geringer wurden.

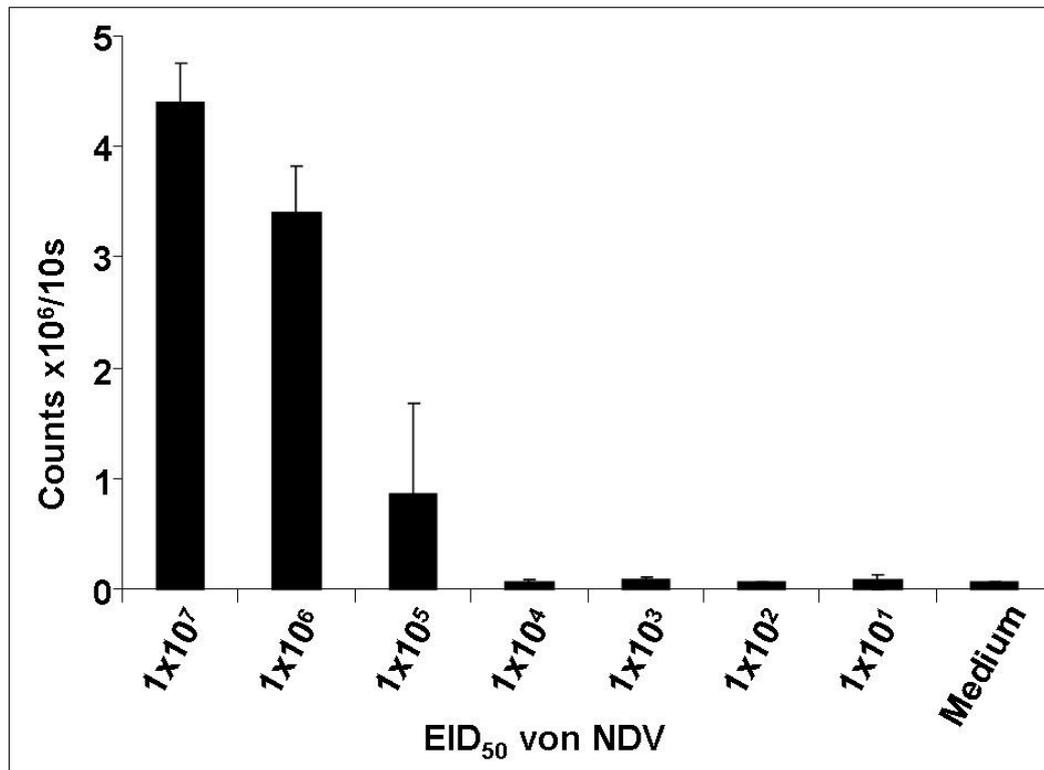


Abbildung 10: Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der IFN-Messung nach Titration von NDV auf Milzleukozyten von 3 Hühnern.

### 1.6 Analyse der Kinetik der IFN-Bildung durch Milzleukozyten nach einer NDV-Infektion

Da mit hoher Wahrscheinlichkeit neben der Konzentration des Stimulators auch die Dauer der Stimulation für die Menge an gebildetem IFN von Bedeutung ist, wurde nachfolgender Versuch zur Bestimmung der zeitlichen Abhängigkeit der IFN-Produktion durchgeführt. Bei diesem Versuch wurden Milzleukozyten von zwei 8 Monate alten M11 Hühnern gewonnen und auf eine Endkonzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Von dieser Lösung wurde je 1ml in 14 Dellen einer 24-Loch-Flachbodenplatte überführt, in 7 dieser 14 Dellen wurden 0,1ml einer  $1 \times 10^8 \text{EID}_{50}$  NDV-Lösung als IFN-Induktor pipettiert, sodass pro Delle eine Infektionsdosis von  $1 \times 10^7 \text{EID}_{50}$  vorlag. Den anderen 7 Dellen wurden als

Kontrolle lediglich 100µl Medium zugesetzt. Die Ernte der Überstände fand 0,5h; 1h; 2h; 4h; 8h; 24h und 48h nach der Infektion statt. Diese wurden anschließend aliquotiert und bei -70°C gelagert. Die Messung der Überstände auf IFN erfolgte im Reporterassay auf CEC511-Zellen. Wie Abbildung 11 zu entnehmen ist, war bereits nach 4-stündiger Stimulation durch NDV IFN in den Überständen der Milzleukozyten messbar und die Menge an IFN stieg bis zum Ende des Versuches kontinuierlich weiter an. Dagegen konnte in den Medienkontrollen im gesamten Versuchszeitraum keine IFN-Bildung nachgewiesen werden.

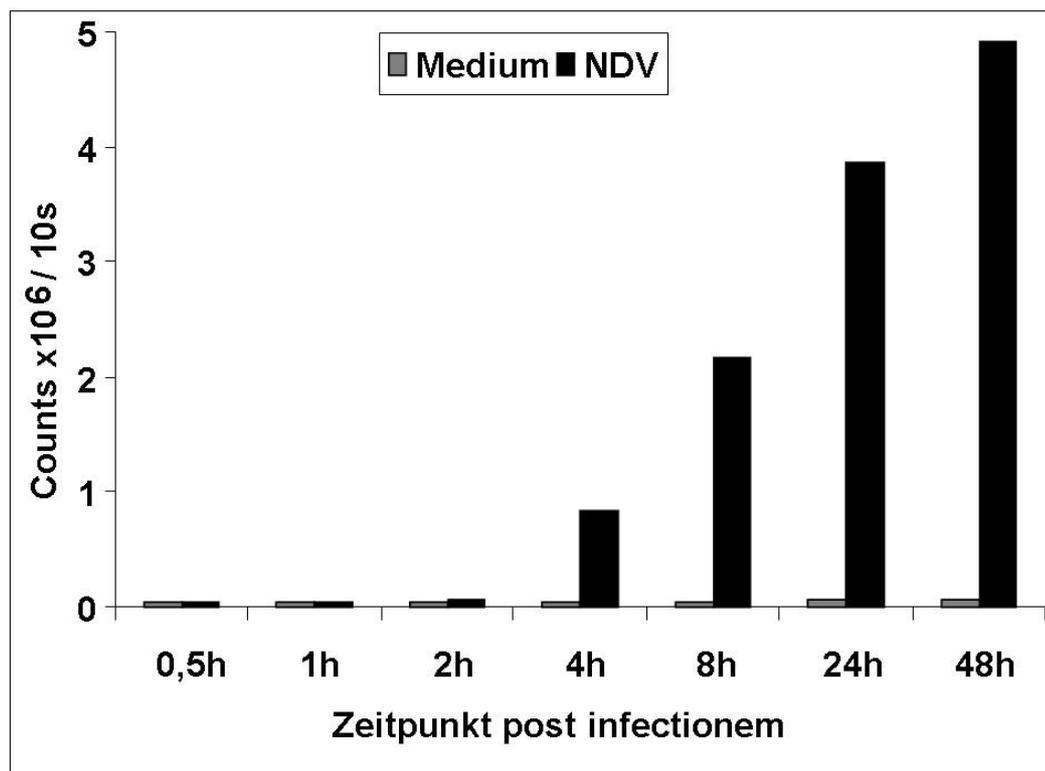


Abbildung 11: Zeitlicher Verlauf der IFN-Bildung durch Milzleukozyten nach Infektion mit NDV.

### 1.7 Prüfung einer virusbedingten Aktivierung der Reporterzellen

Mit Hilfe des Reporterassays kann in Flüssigkeiten enthaltenes IFN nachgewiesen werden. Da diese Flüssigkeiten i. d. R. aus Infektionsversuchen stammen, ist in ihnen nicht nur IFN sondern auch Virus enthalten. Dieses enthaltene Virus kann in den Reporterzellen zu einer Induktion der IFN-Antwort führen. Um sicherstellen zu können, dass die Menge an IFN, welche im Reporterassay gemessen wird aus dem Überstand stammt und nicht auf eine virusinduzierte Eigenproduktion der CEC511-Zellen zurückzuführen ist, wurden

die folgenden Versuche durchgeführt. Zum Einen wurde NDV und zum Zweiten R65-Virus, ein HPAIV H5N1-Isolat aus Deutschland, auf den CEC511-Zellen titriert und als Kontrolle der IFN-Standard mit aufgetragen.

Wie aus den Abbildungen 12 und 13 ersichtlich ist, beruht das im Luminometer gemessene Signal nicht auf einer Induktion der IFN-Bildung in den CEC511-Zellen durch mitübertragenes Virus, sondern ausschließlich auf dem im Überstand übertragenen IFN.

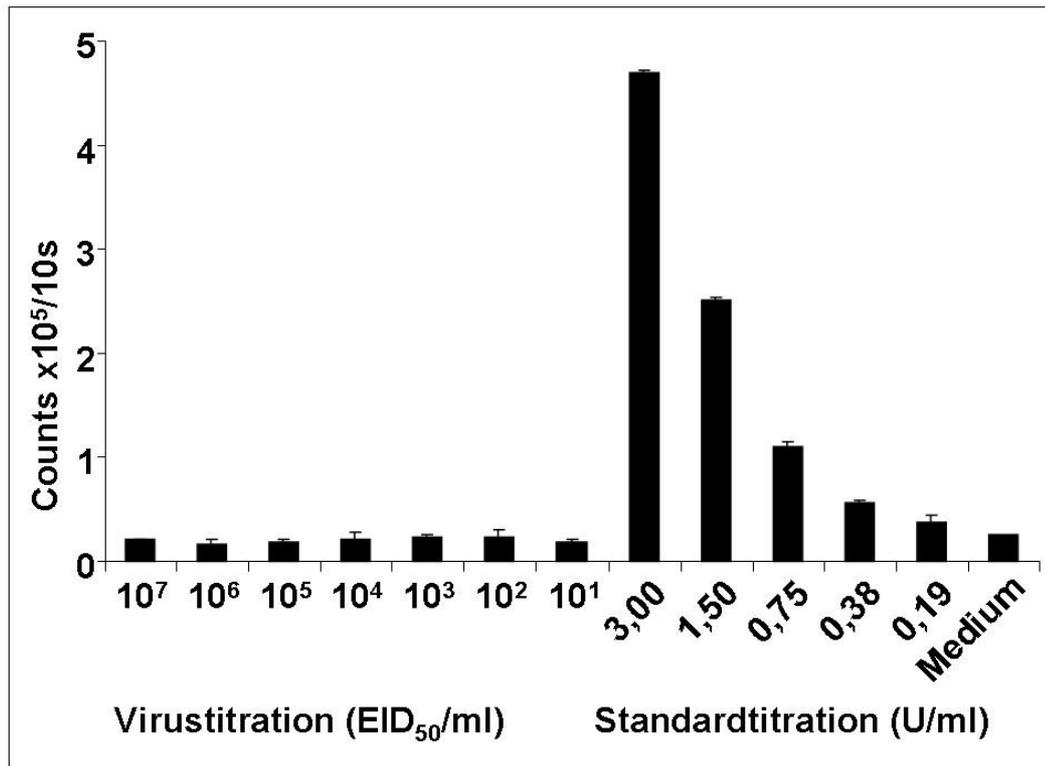


Abbildung 12: Auf der linken Seite des Diagramms dargestellt ist die Titrationen von NDV (EID<sub>50</sub>/ml) auf CEC511-Zellen, auf der rechten Seite des Diagramms dargestellt sind die Werte des IFN-Standards (U/ml).

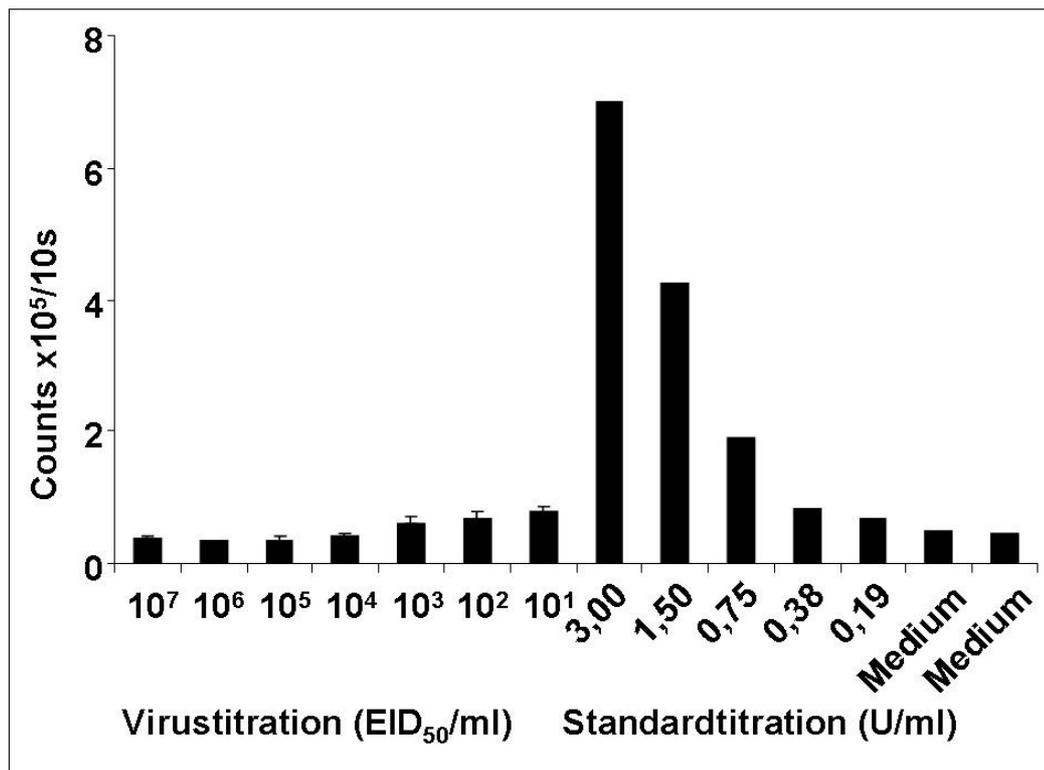


Abbildung 13: Auf der linken Seite des Diagramms dargestellt ist die Titration von R65-Virus (EID<sub>50</sub>/ml) auf CEC511-Zellen, auf der rechten Seite des Diagramms dargestellt sind die Werte des IFN-Standards (U/ml).

### 1.8 Untersuchung zur Mindesteinwirkzeit von Typ-I-Interferonen zur Aktivierung eines antiviralen Schutzes

Für das hier genutzte System ist bisher nicht bekannt, wie lange IFN auf die Zellen einwirken muss, um eine antivirale Wirkung zu induzieren. Um dieses zu untersuchen, wurden CEC32-Zellen auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und je 100µl wurden auf jede Kavität einer 96-Loch-Flachbodenplatte gegeben. Die Zellen wurden für 4h kultiviert, um adhären zu können. Anschließend wurde zu bestimmten Zeitpunkten das Medium von einigen der Kavitäten entfernt und durch eine 50U/ml IFN-Lsg. ersetzt, bis diese Überstände alle gemeinsam entfernt wurden. Dadurch ergaben sich Inkubationszeiten für das IFN von 0,25h, 0,5h, 1h, 2h, 4h und 8h. Um sicherstellen zu können, dass auch alles IFN was nicht schon gebunden hatte entfernt wurde, wurden die Dellen mehrfach mit warmem PBS gewaschen. Anschließend wurde, wie im Material- und Methodenteil unter Punkt IV12 beschrieben, weitergearbeitet. Es wurden sowohl Positiv- als auch Negativkontrollen in diesem Versuch mitgemessen.

Aus Abbildung 14 ist zu entnehmen, dass bereits eine Einwirkzeit von 2h zu einer maximalen Aktivierung der antiviralen Mechanismen in den CEC32-Zellen geführt hat. Die Anzahl der Zellen, welche die Infektion mit VSV überleben, konnte auch durch längere Einwirkzeit des IFN nicht weiter gesteigert werden.

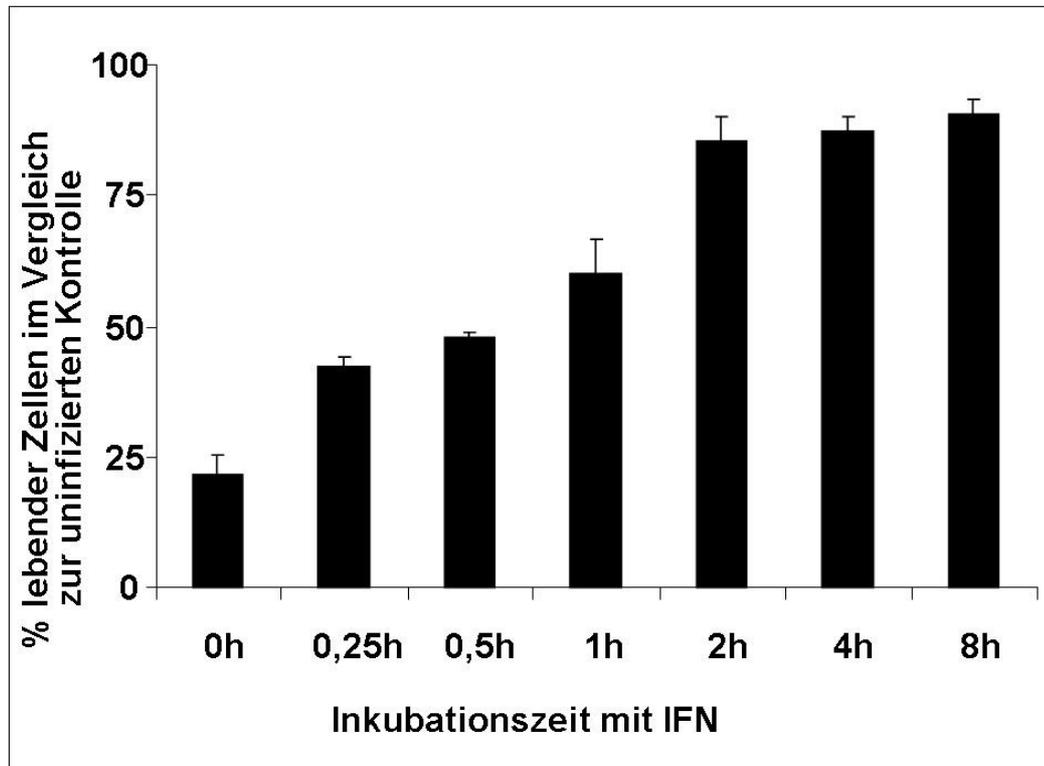


Abbildung 14: Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten der Messung zur Vitalität von Zellen nach Inkubation mit IFN und anschließender Infektion mit VSV.

## 2. *In vivo* Untersuchungen

### 2.1 Versuch zur Induktion der Interferonbildung nach Stimulation mit Newcastle Disease-Virus *in vivo*

Nachdem die IFN-Bildung und Wirkung *in vitro* umfassend analysiert war, sollten vergleichende Analysen *in vivo* durchgeführt werden. Diese wurden zunächst mit einem ND-Impfvirus durchgeführt, da Arbeiten dadurch unter konventionellen Haltungsbedingungen möglich waren und nicht unter L3+-Bedingungen stattfinden mussten. Acht Wochen alte nichtgeimpfte Hühner der Linie M11 wurden mit  $1 \times 10^8 \text{EID}_{50}$  NDV in PBS intratracheal infiziert. Als Kontrolle dienten Tiere, welche die gleiche Menge PBS jedoch ohne Virus intratracheal appliziert bekamen. Jeweils vier Tiere beider Gruppen wurden zu den Zeitpunkten 0,5h, 6h,

12h, 24h und 48h geschlachtet und beprobt. Es wurden Plasma-Proben sowie Milz-, Lungen- und Tracheaprobe entnommen. Die Weiterverarbeitung und Lagerung erfolgte wie in IV4 beschrieben.

Wie aus Abbildung 15 zu entnehmen ist, ist bereits 6h nach der Infektion ein geringradiger Anstieg der IFN-Konzentration zu erkennen. Eine wirklich deutliche Steigerung der IFN-Konzentration ist jedoch erst 24h und 48h nach der Infektion zu messen.

In der Lunge (Abbildung 16) kann dagegen bereits 6h nach der Infektion eine deutliche Steigerung der IFN-Konzentration nachgewiesen werden. Maximale IFN-Konzentrationen finden sich nach 24h.

Abbildung 17 gibt die Entwicklung der IFN-Konzentration in der Milz wieder. Da die Gewichte der Milzen nicht vorlagen, wurde die IFN-Konzentration auf den Gesamtproteingehalt der Probe bezogen. Wie der Abbildung zu entnehmen ist, konnten auch bei den PBS-Kontrollen in der Milz relativ hohe IFN-Konzentrationen gemessen werden, was wahrscheinlich auf eine konstitutive IFN-Synthese zurückzuführen ist. Die Infektion mit NDV führte dennoch zu einer deutlichen Steigerung der IFN-Bildung.

Zusätzlich zu den genannten Proben wurden auch aus dem distalen Bereich der Trachea Proben gewonnen und deren IFN-Konzentration bestimmt. Überraschenderweise konnte erst nach 24h eine geringe Konzentration an IFN nachgewiesen werden, welche dann nach 48h deutlich erhöht war. Wahrscheinlich ist dies auf eine retrograde Infektion der Trachea zurückzuführen, sodass erst mit dem systemischen Vorkommen des Virus auch die Trachea infiziert wurde, welche erst dann mit der Bildung von IFN reagierte.

Um die These der systemischen Infektion zu untermauern, wurde die Konzentration viraler RNA in den Milzen der Tiere quantifiziert. Die Messungen wurden freundlicherweise von PD Dr. Christian Grund am Nationalen Referenzlabor für NDV am Friedrich-Löffler-Institut (Greifswald - Insel Riems) durchgeführt. Bereits 6h nach der intratrachealen Infektion konnte virales Genom in den Milzen nachgewiesen werden. Maximale Werte wurden 48h p.i. gemessen. Somit gelingt es dem Impfvirus innerhalb von 6h eine systemische Infektion zu etablieren.

Vergleicht man die Abbildung 17 mit der Abbildung 19, so fällt der zeitliche Zusammenhang des Nachweises von viraler RNA und der Steigerung der IFN-Konzentration in der Milz auf. Zum Zeitpunkt 6h p.i. ist erstmals virale RNA in der Milz nachweisbar und erst 12h p.i. steigt die IFN-Konzentration in der Milz an, deutlich später als in der Lunge.

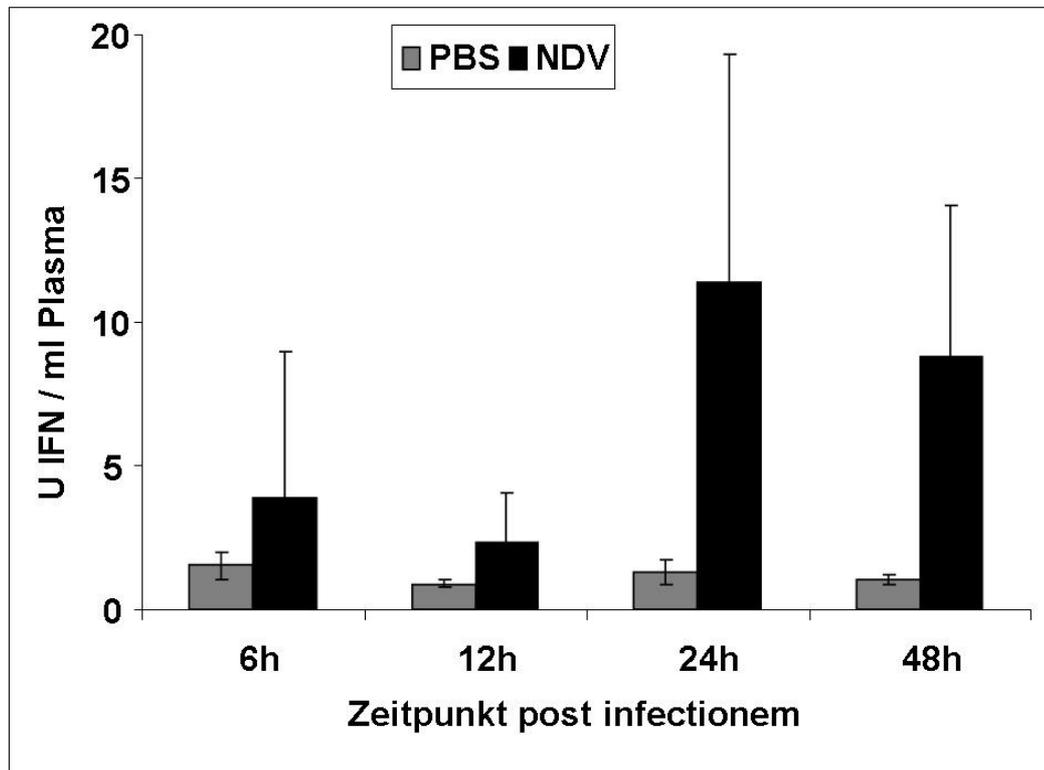


Abbildung 15: Mittelwerte und Standardabweichung der IFN-Konzentration im Plasma von vier Tieren zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion.

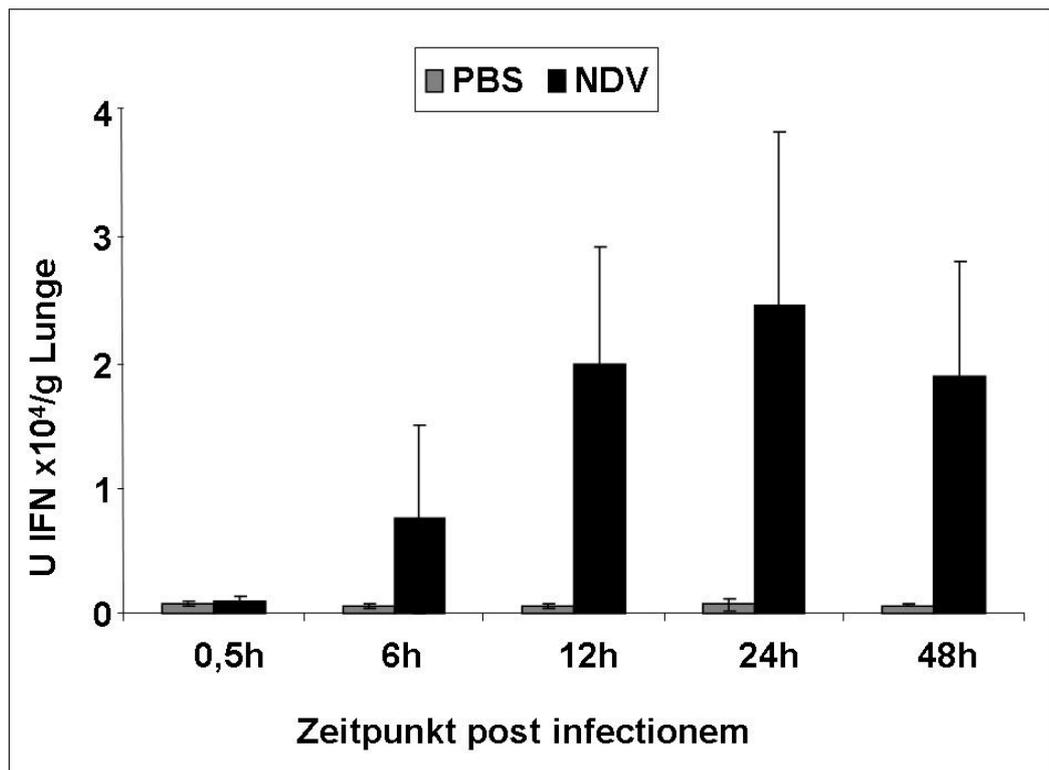


Abbildung 16: Mittelwerte und Standardabweichungen der IFN-Konzentration in der Lunge von vier Tieren pro Zeitpunkt.

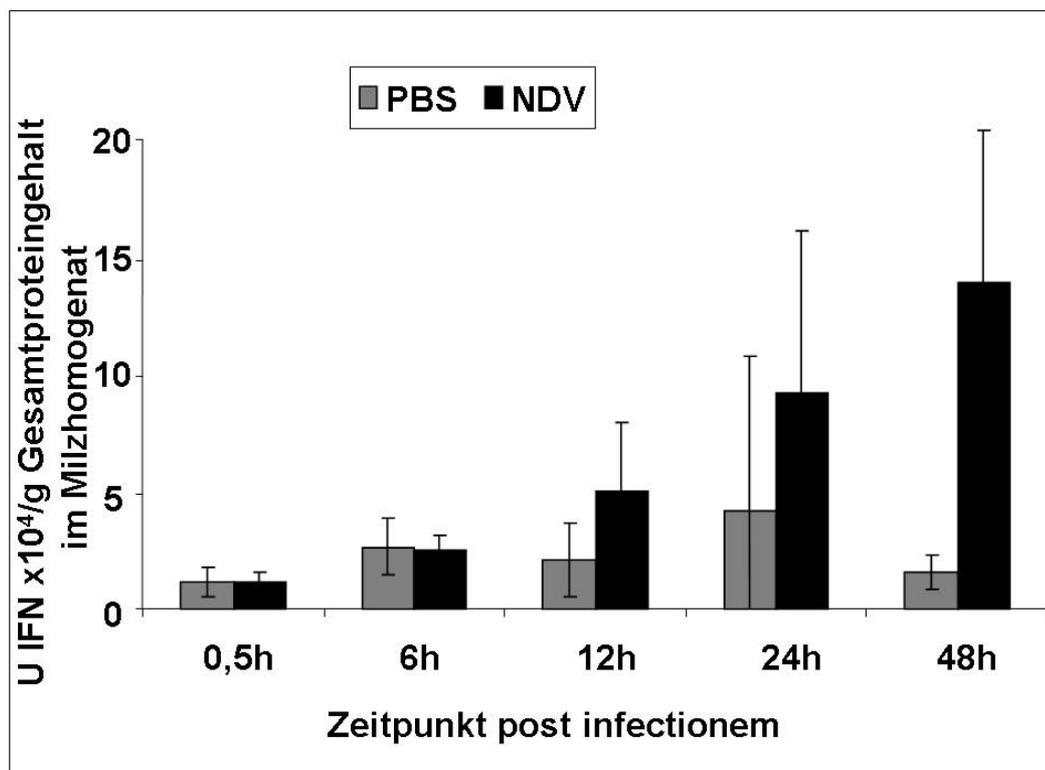


Abbildung 17: Mittelwerte und Standardabweichungen der IFN-Konzentration in der Milz von vier Tieren pro Zeitpunkt.

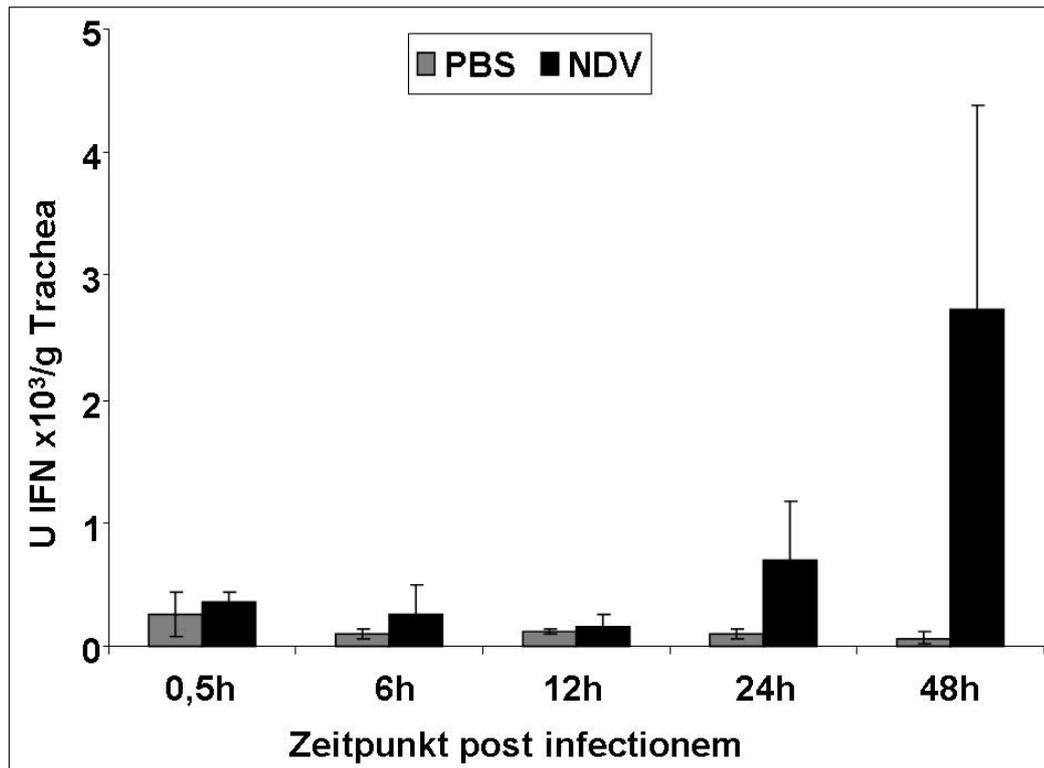


Abbildung 18: Mittelwerte und Standardabweichungen der IFN-Konzentration in der Trachea von vier Tieren pro Zeitpunkt.

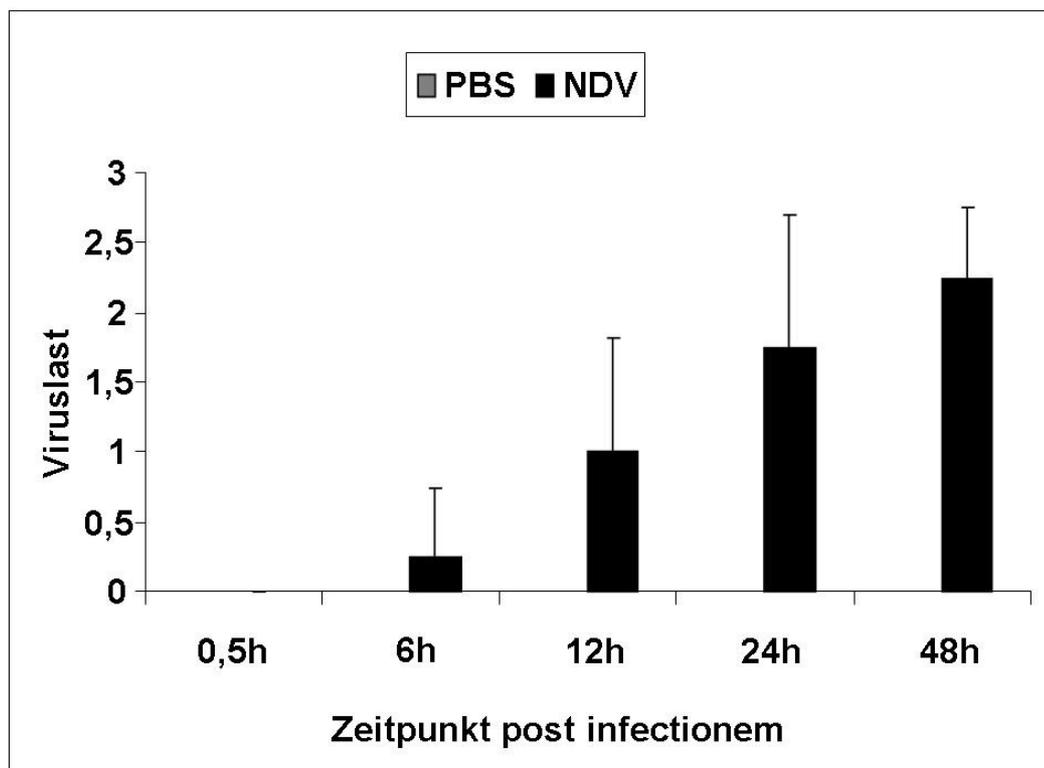


Abbildung 19: Analyse der Menge viraler RNA in den Milzen von vier Tieren je Zeitpunkt. Die Analyse erfolgte mittels semiquantitativer RT-PCR.

## 2.2 Kinetik der Interferon-Synthese nach Infektion mit NDV

Die zuvor beschriebenen Untersuchungen zeigten den Verlauf der IFN-Reaktion innerhalb der ersten 48h nach der Infektion mit NDV. Ergänzend sollte nun eine vollständige Kinetik an Einzeltieren erarbeitet werden. Dies war nur in Form von Plasmaproben möglich, da diese für jedes Individuum wiederholt genommen werden konnten. Zwölf Wochen alte nicht geimpfte Hühner der Linie M11 wurden darum mit  $1 \times 10^8 \text{EID}_{50}$  NDV in PBS intratracheal infiziert. Plasmaproben wurden zu den Zeitpunkten 0h, 6h, 12h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h und 168h p.i. gewonnen. Wie im vorausgegangenen Versuch konnte eine IFN-Reaktion erstmals 6h p.i. nachgewiesen werden. Maximale Konzentrationen fanden sich erneut 12h - 24h nach der Infektion. Ein zweites Maximum konnte 72h p.i. beobachtet werden. Fünf Tage nach der Infektion konnte keinerlei IFN mehr im Plasma nachgewiesen werden (Abbildung 20).

Eine detaillierte Analyse der Einzelwerte zeigte, dass die Tiere deutlich unterschiedlich reagierten. Vier von zehn Tieren wiesen eine maximale Plasma-IFN-Konzentration 12h nach der Infektion auf, zu den späteren Zeitpunkten wurden bei dieser Gruppe nur abnehmende IFN-Mengen nachgewiesen. Eine zweite Gruppe, bestehend aus sechs Tieren, zeigte dagegen im Intervall 48h-72h einen zweiten IFN-Gipfel mit einem nachfolgend starken Abfall der nachweisbaren IFN-Konzentration (Abbildung 21).

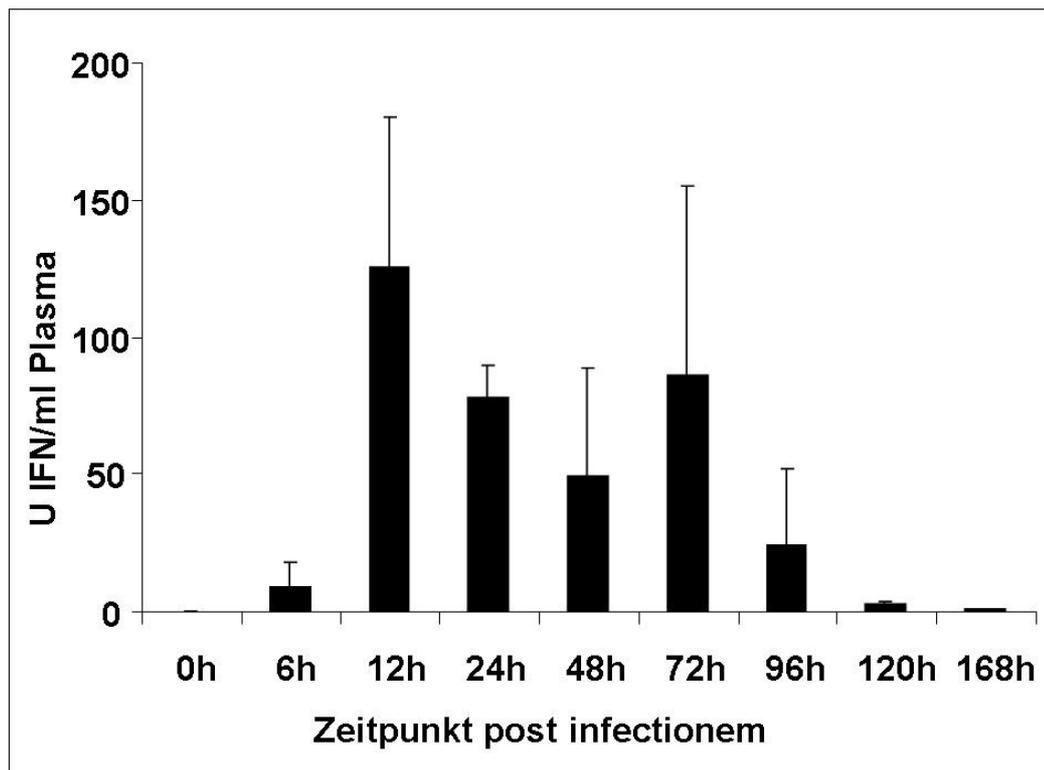


Abbildung 20: Mittelwerte und Standardabweichungen der IFN-Konzentration im Plasma zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion mit NDV (n=10).

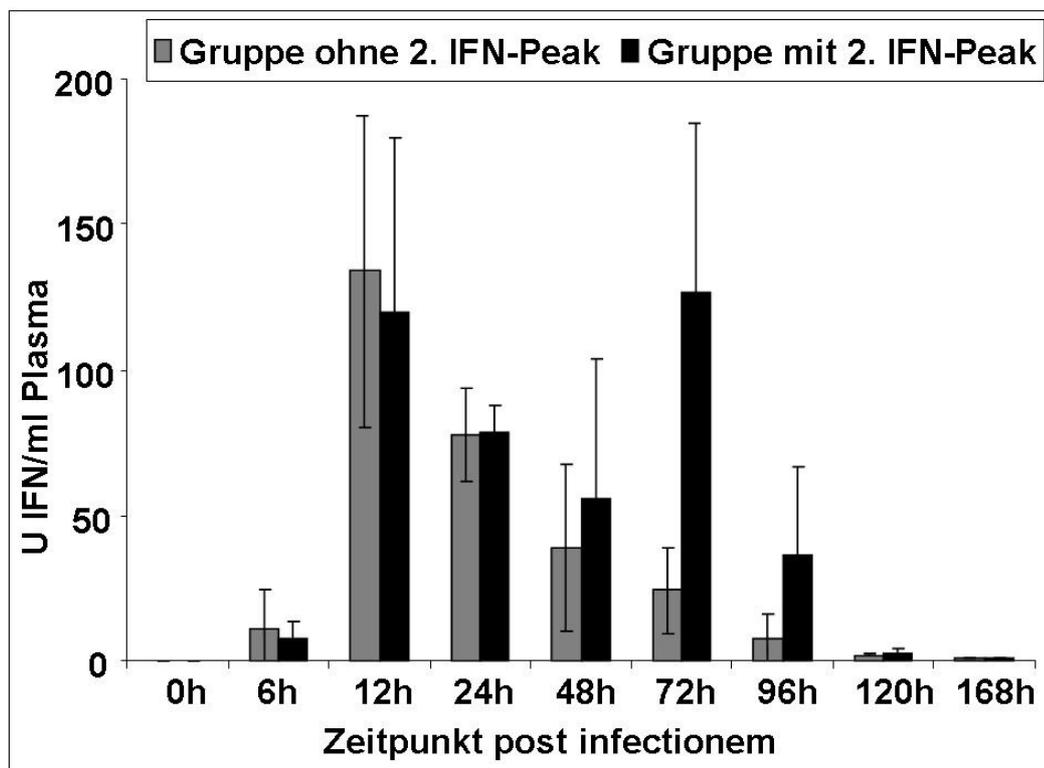


Abbildung 21: Mittelwerte und Standardabweichungen der IFN-Messung zweier Gruppen von Hühnern, die Gruppen wurden danach differenziert ob ein (12h) oder zwei (12h u. 72h) IFN-Peaks auftraten.

### 2.3 Prüfung des Nachweises von Interferonen in Lungenlavageflüssigkeit

Zahlreiche Viren infizieren Hühner über den Respirationstrakt. Hierzu zählen auch die in dieser Arbeit verwendeten Viren NDV und AIV. Bisher gibt es keine Daten zur IFN-Sekretion auf die Oberfläche des respiratorischen Epithels beim Huhn. Um diese Frage zu untersuchen, wurden 14 Wochen alte nicht geimpfte Hühner der Linie M11 mit  $1 \times 10^8$  EID<sub>50</sub> des NDV-Impfstoffes in PBS intratracheal infiziert, als Kontrolle dienten Tiere, welche die gleiche Menge an PBS appliziert bekamen. Nach 24h wurden die Tiere getötet und es wurde eine Lungenlavage durchgeführt. Um im Falle eines unklaren Ergebnisses der Lungenlavage überprüfen zu können, ob mit der Infektion die IFN-Bildung angeregt wurde, wurde den Hühnern auch eine Plasmaprobe entnommen. Wie Abbildung 22 zu entnehmen ist, wurde die IFN-Bildung in erwartetem Maße durch das Virus angeregt. Dies ist auch aus Abbildung 23 ersichtlich, die zeigt, dass IFN bei viralen Infektionen auf die Oberfläche von respiratorischen Epithelien sezerniert wird.

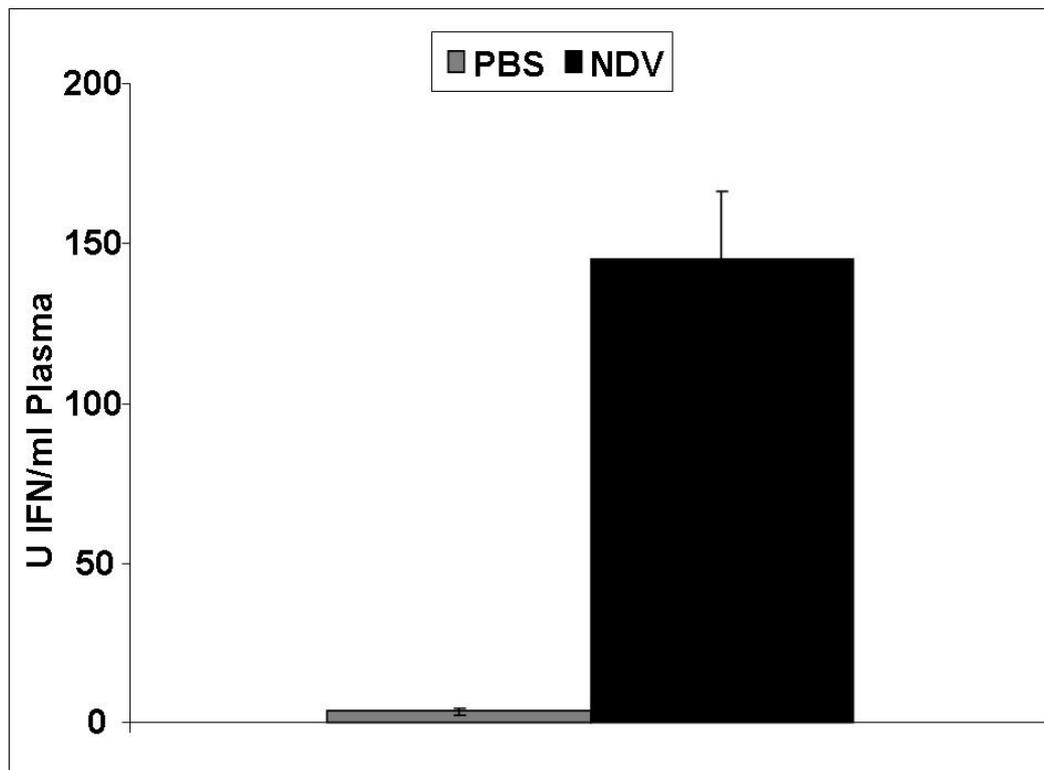


Abbildung 22: : Mittelwerte und Standardabweichungen der IFN-Konzentration im Plasma 24h nach der Infektion mit NDV (n=5) und 24h nach der Applikation von PBS (n=3)..

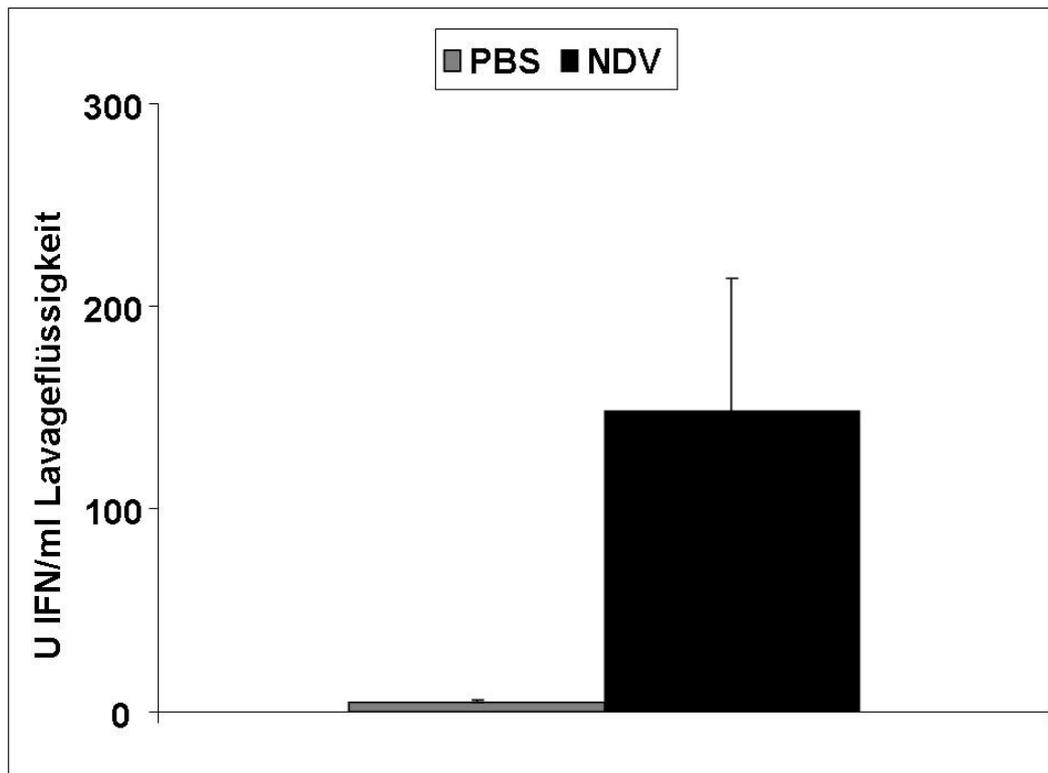


Abbildung 23: Mittelwerte und Standardabweichungen der IFN-Konzentration in der Lungenlavageflüssigkeit 24h nach der Infektion mit NDV (n=5) und 24h nach der Applikation von PBS (n=3).

#### 2.4 Versuch zur Ermittlung der Ausscheidungskinetik extern zugeführten Interferons

Da wenig darüber bekannt war, wie sich einmal gebildetes IFN im Huhn verhält, ob es ständig abgebaut und nachgebildet wird oder ob es akkumuliert und dadurch für längere Zeit in hohen Dosen zur Verfügung steht und auch um erste Erfahrungen darüber zu sammeln, wie sich extern zugeführtes IFN im Huhn verhält, sollte die Halbwertszeit von rekombinantem IFN im Huhn bestimmt werden. Elf Wochen alte nicht geimpfte Hühner der Linie M11 erhielten  $1 \times 10^7$  U rec. chIFN- $\alpha$  in PBS i.v. appliziert. Anschließend wurde Ihnen zu den Zeitpunkten 0h, 5min, 15min, 30min, 1h, 2h, 4h, 8h und 24h nach der Applikation eine Plasmaprobe entnommen um diese im Reporterassay zu messen.

In Abbildung 24 spiegelt sich die Entwicklung der IFN-Konzentration im Plasma der Tiere wieder. Es ist ersichtlich, dass bereits nach 4h kein IFN im Plasma mehr nachweisbar ist. Aufgrund pharmakokinetischer Berechnungen, welche freundlicherweise durch Dr. Stefan Härtle durchgeführt wurden, konnte erstmals für das Huhn eine Halbwertszeit von 1h ermittelt werden.

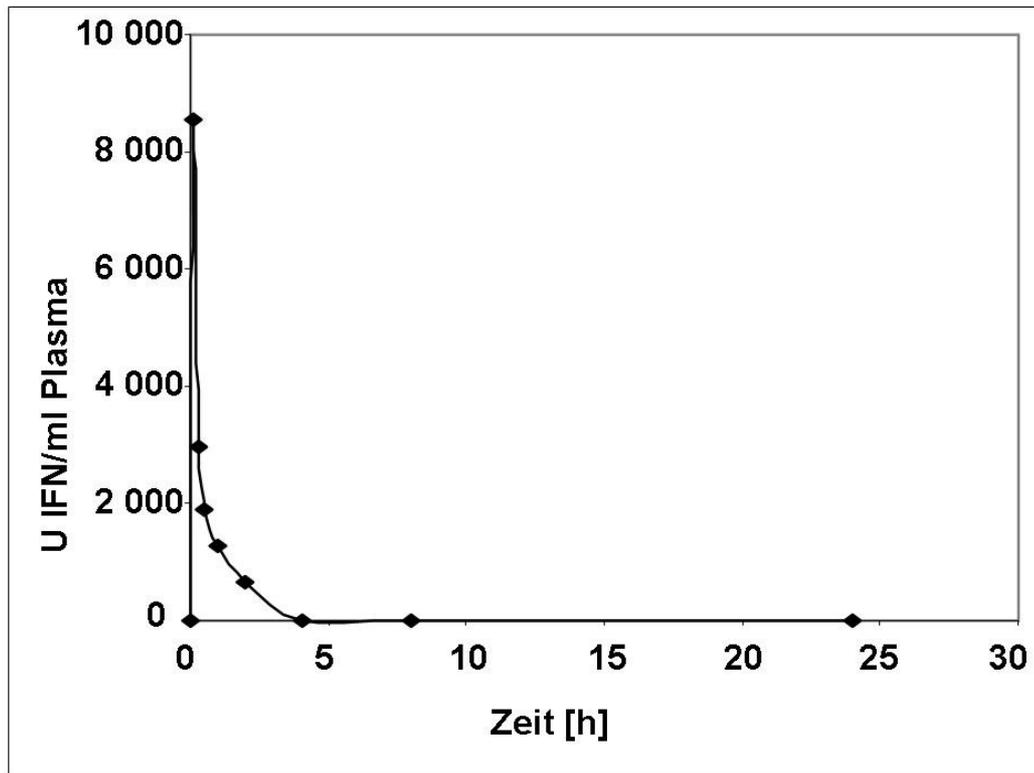


Abbildung 24: Mittelwerte der IFN-Konzentration im Plasma von drei Tieren, zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Applikation rec. *chIFN*.

### 3. Untersuchungen zur Rolle des IFN-Systems bei der Influenza-Infektion

#### 3.1 Krankheitsverlauf bei Hühnern nach Infektion mit dem R65-Virus

Ziel der weiteren Arbeiten war es, die Rolle des IFN-Systems in der Kontrolle von Influenza-Virusinfektionen beim Huhn zu untersuchen. Voraussetzung für diese Arbeiten war eine genaue Kenntnis des Infektionsverlaufes. Alle hier aufgeführten Versuche, bei denen das R65-Virus oder dessen Mutanten verwendet wurden, wurden am Friedrich-Löffler-Institut (Greifswald - Insel Riems) durchgeführt.

16 Hühner der Linie Lohmann VALO SPF wurden in einem Alter von 5 Wochen mit dem R65-Virus in einer 50-fachen  $LD_{50}$  Dosis in 1ml PBS ocular nasal infiziert. Während des Versuchsablaufes wurden die Tiere klinisch beobachtet um sie töten zu können, sobald sie deutlich moribund waren. Bereits am zweiten Tag nach der Infektion waren 40% der Hühner gestorben und auch die übrigen fielen durch deutliche Krankheitssymptome auf. Am zehnten Tag nach der Infektion wurde das letzte Huhn getötet, weil es moribund war. Der rapide Verlauf der Infektion (Abbildung 25) passt zu den im Feld gemachten Beobachtungen.

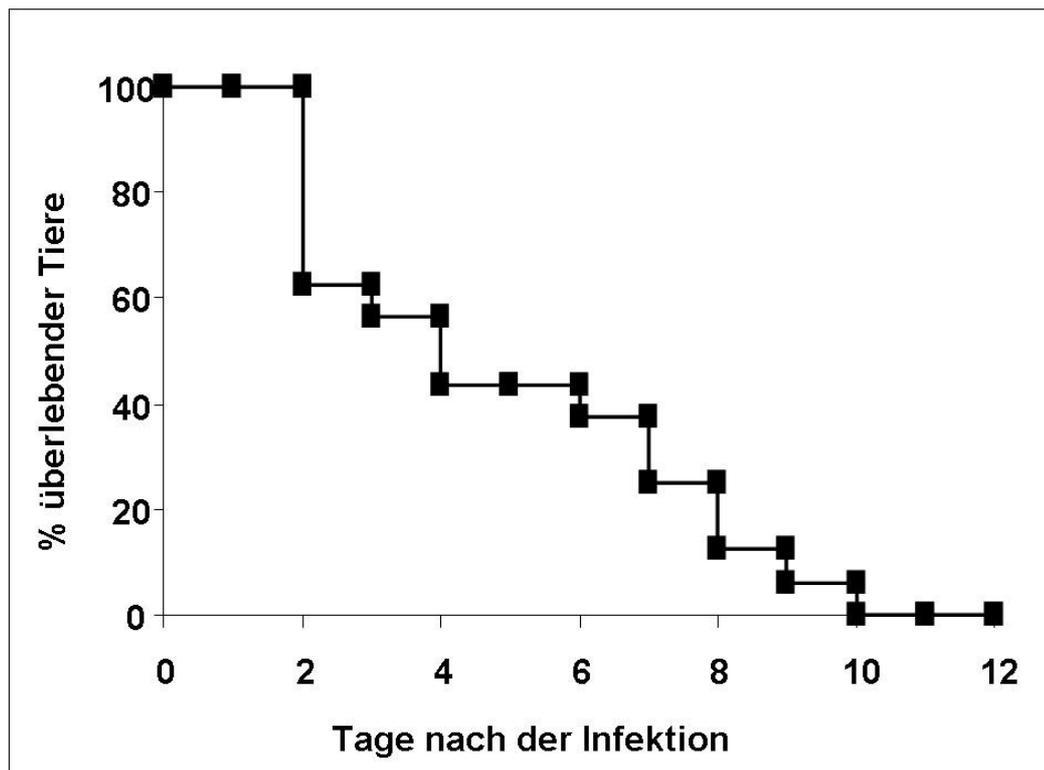


Abbildung 25: Dargestellt ist der Anteil überlebender Tiere nach Infektion mit dem R65-Virus zu den angegebenen Zeitpunkten.

### 3.2 Versuch zur Induktion der Interferonbildung nach Stimulation mit dem R65-Virus *in vivo*

In Analogie zu den in München durchgeführten Untersuchungen zur Kinetik der IFN-Bildung nach einer NDV-Infektion, sollten nun Daten in einem Infektionsversuch mit Influenza-Viren erhoben werden. Dazu wurden 20 Hühner der Linie Lohmann VALO SPF in einem Alter von 5 Wochen im Friedrich-Löffler-Institut im L3+-Stall eingestallt. Die Infektion der Tiere erfolgte mit einer 100-fachen LD<sub>50</sub> Dosis des R65-Virus in 500µl PBS. Aufgrund der hohen Menge an Flüssigkeit, konnte nicht die alleinige intratracheale Applikation gewählt werden, sodass lediglich 200µl intratracheal und die anderen 300µl oculonasal appliziert wurden. Zu den Zeiten 0h, 6h, 12h und 24h wurde den Tieren wie unter IV5 beschrieben eine Plasmaprobe entnommen, anschließend wurden die Tiere betäubt und durch Eröffnung der V. jugularis ausgeblutet. Die Organentnahme erfolgte wie unter IV4 beschrieben in der Pathologie des L3+-Bereiches. Die Beprobung der 48h-Gruppe war in der geplanten Form nicht möglich, da in der Nacht vor der geplanten Organentnahme alle fünf Tiere dieser Gruppe an den Folgen der Infektion gestorben sind. Die bis dahin gewonnenen Proben wurden

am FLI auf ihren IFN-Gehalt hin untersucht. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 26, Abbildung 27 und Abbildung 28 dargestellt. Sowohl im Plasma, als auch in der Lunge und der Milz konnte eine deutliche IFN-Bildung erst 24h nach der Infektion nachgewiesen werden. Die Induktion der Zytokinbildung deutet sich in der Lunge, dem Ort der Primärinfektion, bereits 12h nach der Infektion an. Wenn man die Abbildung 16 (IFN-Konzentration in der Lunge nach NDV) mit der Abbildung 27 (IFN-Konzentration in der Lunge nach R65-Virus) vergleicht, fällt auf, dass der IFN-Gehalt in den Lungen 12h nach der Infektion in etwa gleich groß ist. Danach jedoch kommt es zu einem steilen Anstieg der IFN-Konzentration in den Lungen der Tiere, welche mit dem R65-Virus infiziert wurden. Aufgrund der unterschiedlichen Bezugsgrößen zum IFN-Gehalt (U/g Organ bzw. U/g Gesamtprotein) in den Milzen in beiden Versuchen, sind diese leider nicht direkt miteinander vergleichbar. Ein direkter Vergleich des Gehaltes an IFN im Plasma ist dagegen möglich, siehe dazu Abbildung 15 (IFN-Konzentration im Plasma nach NDV) und Abbildung 26 (IFN-Konzentration im Plasma nach R65-Virus). Es fällt, genau wie in der Lunge, eine starke Steigerung der IFN-Konzentration im Plasma der mit R65-Virus infizierten Tiere auf.

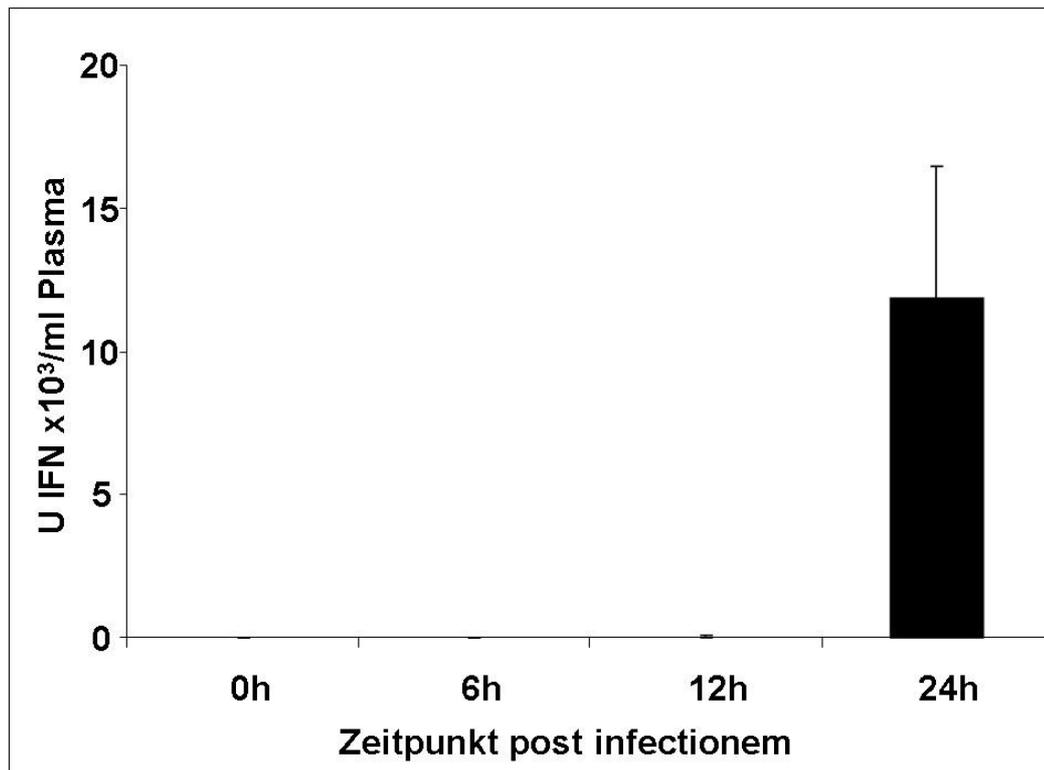


Abbildung 26: Mittelwerte und Standardabweichungen der IFN-Konzentration im Plasma von je fünf Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion mit R65-Virus.

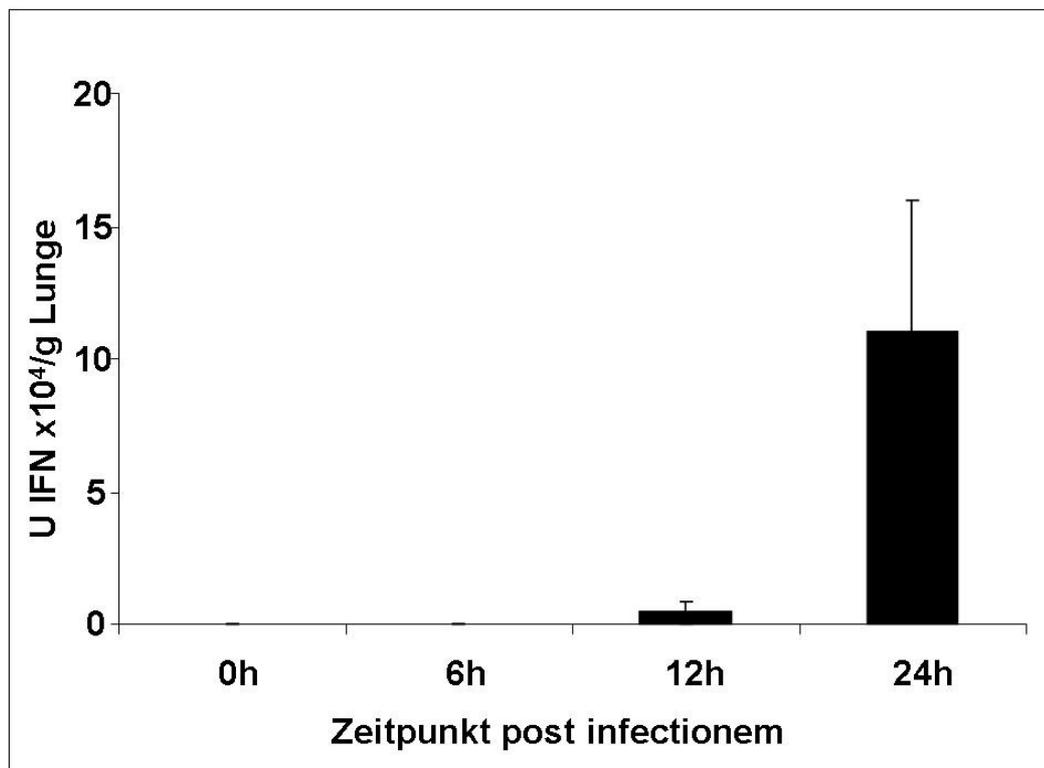


Abbildung 27: Mittelwerte und Standardabweichungen der IFN-Konzentration in den Lungen von je fünf Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion mit R65-Virus

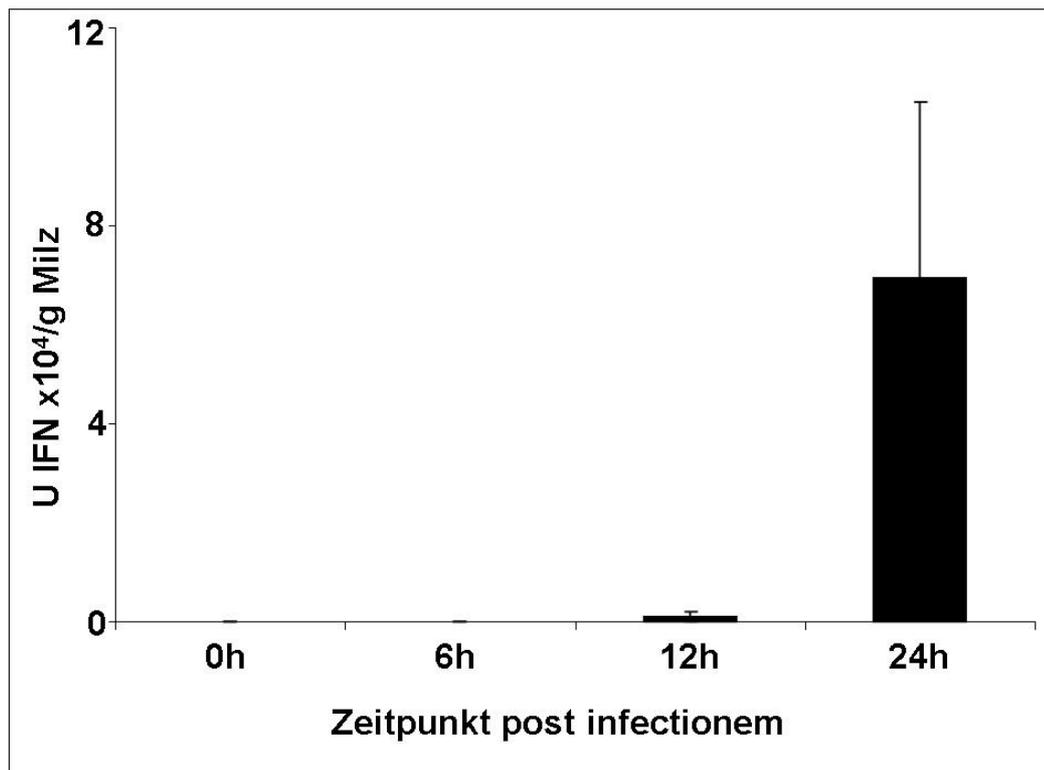


Abbildung 28: Mittelwerte und Standardabweichungen der IFN-Konzentration in den Milzen von je fünf Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion mit dem R65-Virus.

### 3.2.1 Charakterisierung des gebildeten Interferons

Mit den bisher vorliegenden Daten konnte eine Aussage darüber getroffen werden, dass bei viralen Infektionen von Hühnern ebenso wie im Säuger hauptsächlich Typ-I-IFNs gebildet werden. Da es von Interesse war, welches IFN dabei hauptsächlich exprimiert wird, wurden Proben von 2 Tieren dieses Versuches, in denen eine deutliche IFN-Antwort gemessen wurde, mit den uns zur Verfügung stehenden AK gegen IFN- $\alpha$  und auch gegen IFN- $\beta$  inkubiert. Bei beiden AK handelt es sich um gereinigte polyklonale AK aus dem Kaninchen. Jede der beiden Proben wurde sowohl unbehandelt als auch mit beiden AK versetzt für eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend auf die Reporterzellen aufgetragen. Wie aus Abbildung 29 ersichtlich ist, konnte das Signal, welches in der unbehandelten Probe gemessen wurde, mit Hilfe des anti-IFN- $\alpha$  nahezu vollständig neutralisiert werden, während das Signal nach der Vorbehandlung mit anti-IFN- $\beta$  unverändert geblieben ist.

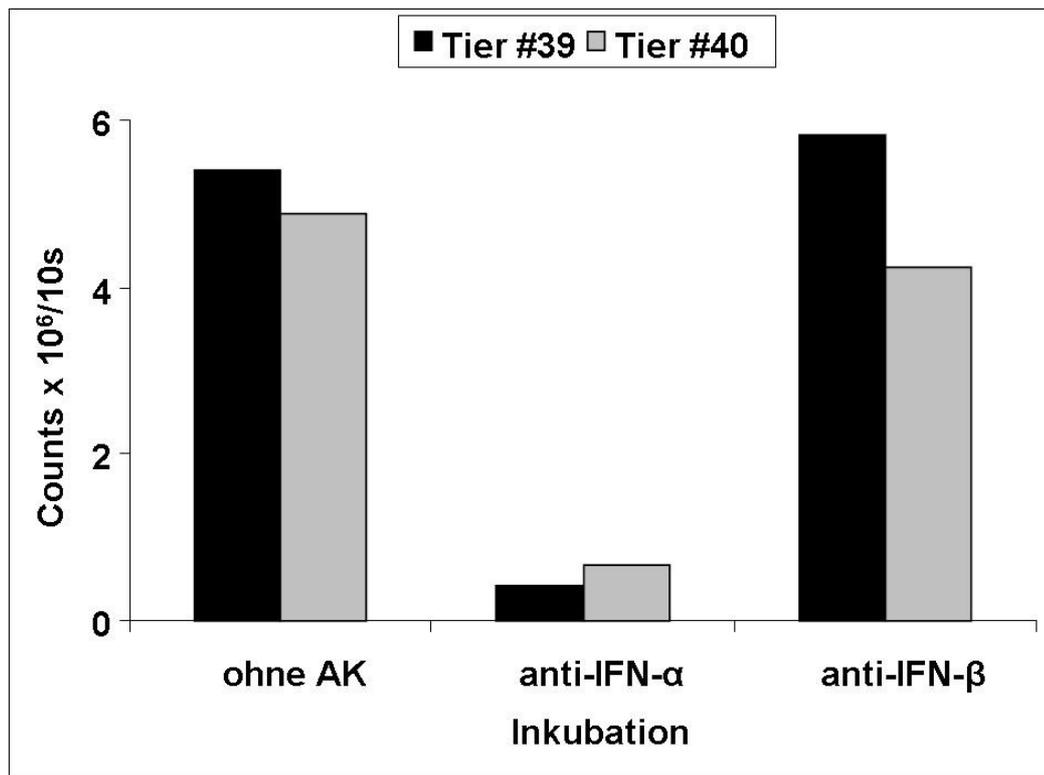


Abbildung 29 Messung der IFN-Konzentration in zwei Lungenproben aus dem oben beschriebenen Versuch, einmal unbehandelt, einmal mit anti-IFN- $\alpha$  und einmal mit anti-IFN- $\beta$  vorbehandelt.

### 3.3 Versuche zur Induktion eines antiviralen Status durch Behandlung mit Typ-I-Interferonen

Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass Hühner auf eine Infektion mit dem HPAIV H5N1 mit einer sehr starken IFN-Bildung reagieren. Dennoch sterben die Tiere binnen weniger Tage. Da IFN erst wenige Stunden vor dem Tod nachweisbar war, stellte sich die Frage, ob diese Reaktion für eine erfolgreiche Kontrolle der Infektion zu spät einsetzt oder ob das IFN im Infektionsgeschehen keine Rolle spielt. Um diese Frage zu beantworten, sollten im Weiteren Tiere mit IFN vorbehandelt und anschließend infiziert werden.

#### 3.3.1 Vorbehandlung durch intratracheale Applikation von Interferon

Im ersten Versuch wurde IFN sowohl intratracheal als auch oculonasal verabreicht. Diesem Versuchsaufbau lag die Überlegung zugrunde, dass IFN am Infektionsort appliziert wird, um damit antivirale Mechanismen an der Eintrittspforte zu induzieren. Es wurden 23 Hühner der Linie Lohmann VALO SPF in einem Alter von fünf Wochen in zwei Gruppen eingeteilt. Die IFN-Gruppe,

bestehend aus zwölf Tieren, bekam  $1 \times 10^6$  U IFN in 700  $\mu$ l PBS verabreicht, wovon 300  $\mu$ l intratracheal und 400  $\mu$ l oculonasal appliziert wurden. Die Kontrollgruppe, bestehend aus elf Tieren, wurde mit der gleichen Flüssigkeitsmenge an PBS und einem Kontrollprotein auf die gleiche Art und Weise vorbehandelt. Beide Gruppen wurden 6h nach der Behandlung mit einer 100-fachen LD<sub>50</sub> Dosis des R65-Virus in 500  $\mu$ l PBS infiziert. Dabei wurden 200  $\mu$ l intratracheal und die Anderen 300  $\mu$ l oculonasal appliziert. Um beurteilen zu können ob die Behandlung mit IFN nicht nur einen Schutz der Tiere selber, sondern eventuell auch noch die Ausscheidung des Virus beeinträchtigt, wurden die Tiere täglich sowohl oropharyngeal als auch kloakal getupfert. Das in Abbildung 30 dargestellte Ergebnis des Versuches spiegelt den sehr rapiden Verlauf der Infektion wieder. Es konnte kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen in Bezug auf die Mortalität und den Krankheitsverlauf nachgewiesen werden. Die Messung auf Gehalt an viraler RNA und alle damit verbundenen Arbeiten wurden freundlicherweise von Frau Kerstin Wink-Kruschke aus der Arbeitsgruppe von PD Dr. Thomas Vahlenkamp vom Nationalen Referenzlabor für Leukose vom FLI Greifswald - Insel Riems durchgeführt. Auch hier zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, weder bei den Kloakal- noch bei den Oropharyngealtupfern. Im direkten Vergleich dieser beiden Tupferproben fiel lediglich auf, dass in den Kloakaltupfern beider Gruppen bereits am ersten Tag nach der Infektion das Virus nachweisbar war, während dies in den Oropharyngealtupfern erst am zweiten Tag nach der Infektion möglich war.

Wie dieser Versuch gezeigt hat, reicht eine einmalige intratracheale und oculonasale Applikation von IFN nicht aus, um vor den Folgen der Infektion mit dem R65-Virus zu schützen.

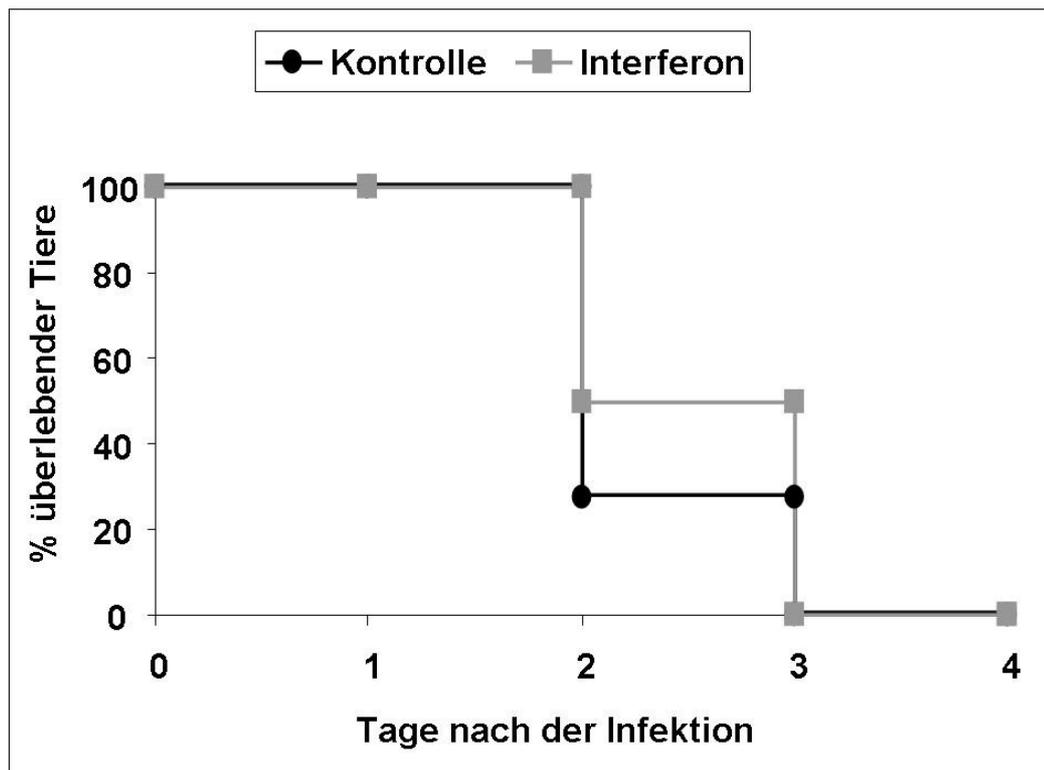


Abbildung 30: Dargestellt ist die Überlebensrate IFN- und Kontrollprotein-behandelter Tiere nach einer Infektion mit dem R65-Virus.

### 3.3.2 Behandlung durch intravenöse Applikation von Interferon

Vergleichbare Versuche an Mäusen zeigten, dass die mucosale Applikation von IFN vollständig vor einer H5N1-Infektion schützt. Möglicherweise konnte die lokale Applikation beim Huhn die Infektion und die nachfolgende systemische Ausbreitung des Virus nicht verhindern.

In einem zweiten Versuch wurden die Tiere daher intravenös mit IFN behandelt. Als Behandlungsschema wurden zwei Applikationen vor und eine Applikation nach der Konfrontation mit dem R65-Virus gewählt. Um den natürlichen Infektionsweg der H5N1-Infektion nachzuvollziehen, wurden die behandelten Tiere mit einer Gruppe infizierter Tiere zusammengesetzt.

Je acht Tiere der Linie Lohmann VALO SPF in einem Alter von fünf Wochen wurden i.v. mit  $1 \times 10^7$  U IFN bzw. der gleichen Proteinmenge eines Kontrollproteins behandelt. Die Behandlung erfolgte 8h und 2h vor der Konfrontation mit dem R65-Virus sowie 12h danach. Um zu prüfen, ob das applizierte IFN tatsächlich systemisch verfügbar war, wurde den behandelten Tieren 15min nach jeder Applikation eine Plasmaprobe entnommen und mit Hilfe

des Reporterassays auf das Vorhandensein von IFN überprüft. Wie aus Abbildung 31 ersichtlich ist, war die Applikation des IFN erfolgreich, da bei allen IFN-behandelten Tieren biologisch aktives Zytokin im Plasma nachweisbar war. Bei den Kontrolltieren konnte keine IFN-Aktivität nachgewiesen werden. Die in Abbildung 32 dargestellten Überlebenskurven der beiden Gruppen zeigen jedoch keine deutlichen Unterschiede der Überlebensraten. Es fällt aber der protrahierte Verlauf der Erkrankung auf, welcher darauf zurückzuführen ist, dass die Tiere nicht unmittelbar durch intratracheale Gabe des Virus infiziert wurden, sondern durch Aufnahme von Virus, welches von den Tieren der Infektionsgruppe ausgeschieden wurde.

Aus diesem Versuch geht hervor, dass auch eine systemische Behandlung mit IFN nicht vor den Folgen der Infektion mit dem R65-Virus schützen konnte.

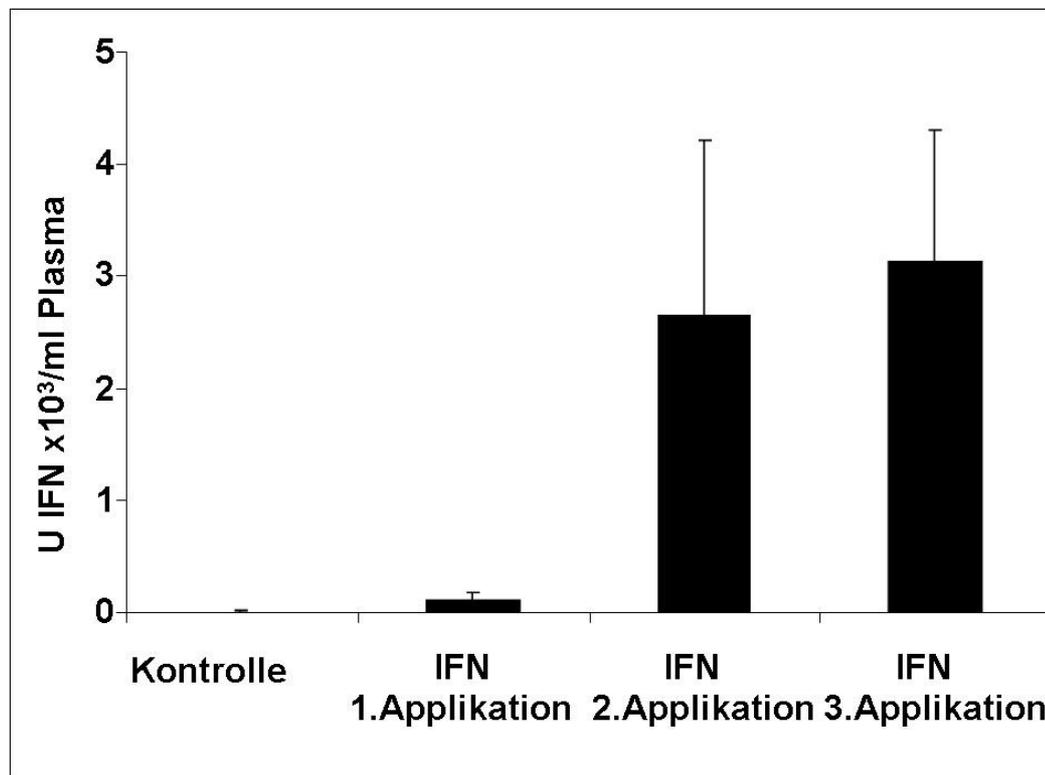


Abbildung 31: Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der IFN-Konzentration im Plasma der mit IFN vorbehandelten Tiere ( $n=8$ ) und der Kontrolltiere ( $n=8$ ). Die Messung erfolgte jeweils 15min nach der Applikation, welche wiederum 8h und 2h vor der Konfrontation mit dem R65-Virus und 12h danach erfolgte.

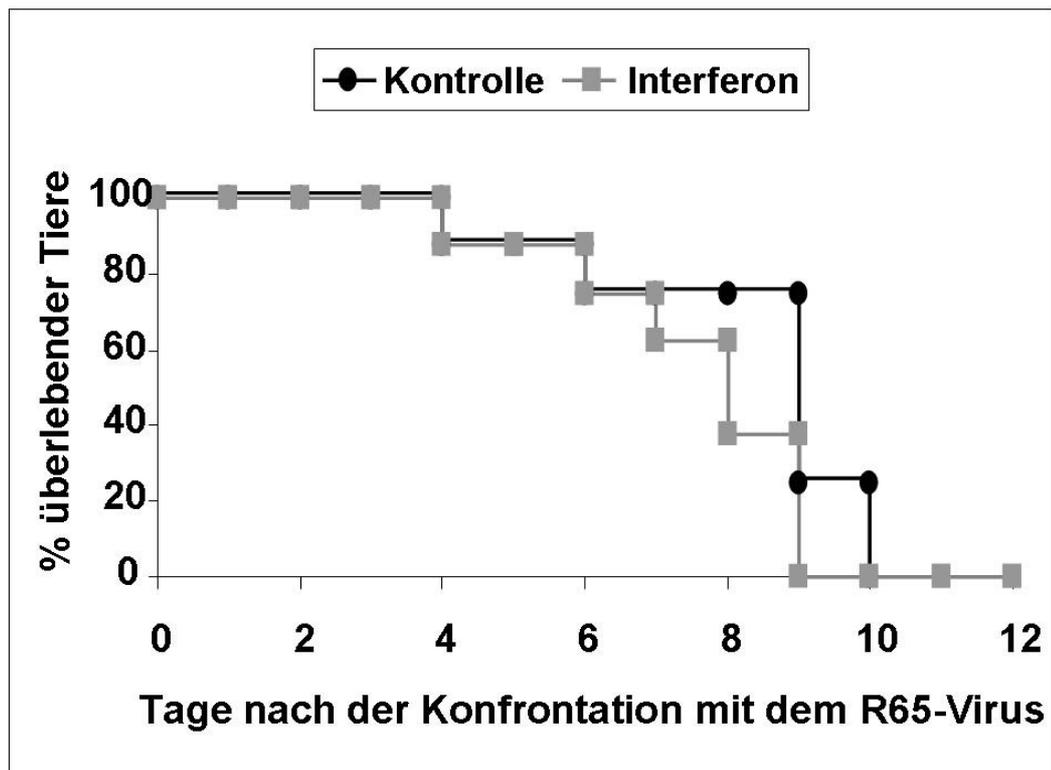


Abbildung 32: Dargestellt sind die Überlebenskurven der Hühner der beiden behandelten Gruppen.

### 3.4 Untersuchungen zur Rolle des NS1-Proteines

Wie aus verschiedenen Versuchen in Mäusen hervorgeht, spielt das NS1-Protein von Influenza-Viren eine entscheidende Rolle in der Modulation der Immunantwort. So konnte bei Infektionen mit Influenza-Viren, denen das NS1-Protein teilweise oder vollständig ausgeknockt wurde, eine deutliche Hochregulation der IFN-Antwort gemessen werden. Ferner konnte in diesen Versuchen ein deutlich milderer klinischer Verlauf der Infektion bei Mäusen beobachtet werden. Da die Behandlung von Hühnern mit IFN nicht zu einer Attenuierung der Infektion mit Influenza-Viren geführt hat, wurde im weiteren Verlauf das Hauptaugenmerk auf das NS1-Protein gelegt.

Im folgenden Versuch wurden fünf Wochen alte Hühner der Linie Lohmann VALO SPF, in drei Gruppen eingeteilt. sieben Tieren wurde als Kontrolle lediglich PBS intratracheal appliziert. Jeweils 19 Tieren wurde entweder das rec. R65wt-Virus oder aber die R65delNS1-Mutante in einer Dosis von  $6 \times 10^5$  PFU in 300  $\mu$ l PBS intratracheal appliziert. 12h nach der Applikation wurden die sieben Hühner der Kontrollgruppe, sieben Hühner der rec. R65wt-Gruppe und sieben

Hühner der R65delNS1-Gruppe getötet und beprobt. Aus der mit dem R65delNS1-Virus infizierten Gruppe wurden im Weiteren je vier Tiere zu den Zeitpunkten 24h, 30h und 72h nach der Infektion getötet und beprobt. In der mit dem rec. R65wt-Virus infizierten Gruppe konnte dieser Beprobungsplan aufgrund des schnellen Krankheitsverlaufes nicht eingehalten werden, sodass hier jeweils vier Tiere zu den Zeitpunkten 24h, 30h und 31h nach der Infektion getötet und beprobt wurden. Analysiert wurden der Krankheitsverlauf sowie die IFN-Bildung in Lunge, Milz, Gehirn und Blutplasma. Über den gesamten Versuchszeitraum von 72h konnte bei den Tieren, die mit dem R65delNS1-Virus infiziert wurden, keinerlei deutliche klinische Symptomatik beobachtet werden, anders als bei den Tieren, die mit dem rec. R65wt-Virus infiziert wurden. Die erste Gruppe von Tieren, die 12h nach der Infektion getötet wurde, wies noch keine klinische Symptomatik auf, jedoch bereits bei der 24h-Gruppe war eine deutliche Erkrankung der Tiere zu beobachten. 30h nach der Infektion waren die verbliebenen acht Tiere bereits schwer krank bis moribund, weshalb nicht nur die 30h-Gruppe getötet und beprobt wurde, sondern direkt im Anschluss auch die 48h-Gruppe. Die fehlende Symptomatik bei der Infektion mit R65delNS1-Virus wurde als ein erstes Indiz gewertet, dass die Viren das IFN-System der Hühner, aufgrund des fehlenden NS1-Proteins erfolgreich bekämpfen konnte. Jedoch zeigte das Ergebnis der IFN-Messung, welches aus Abbildung 33 bis Abbildung 36 entnommen werden kann, ein gänzlich unerwartetes Bild. Wie schon im vorherigen Versuch festgestellt wurde, war auch in diesem Versuch die Menge an IFN in den Tieren, die mit dem rec. R65wt-Virus infiziert waren, deutlich erhöht. Jedoch konnte im gesamten Versuchszeitraum keinerlei IFN bei den Tieren, die mit der R65delNS1-Mutante infiziert wurden festgestellt werden.

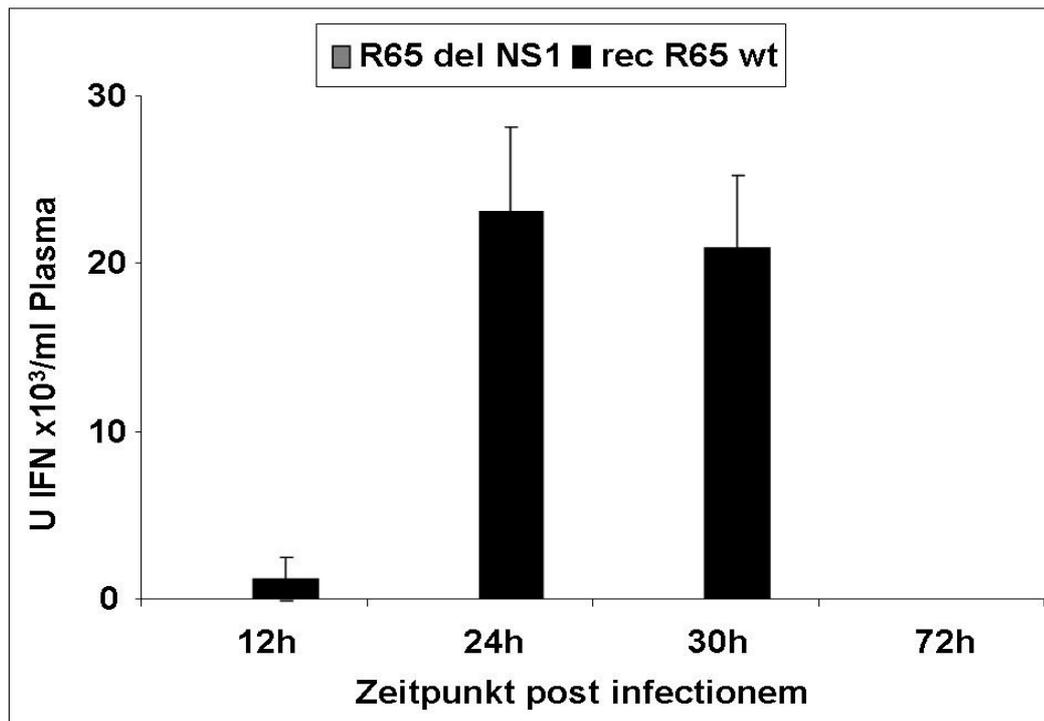


Abbildung 33: Hier dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der IFN-Konzentration im Plasma der beiden Infektionsgruppen. Zum Zeitpunkt 24h wurde dieser MW aus jeweils sieben Tieren gebildet, zu allen anderen Zeitpunkten aus jeweils vier Tieren.

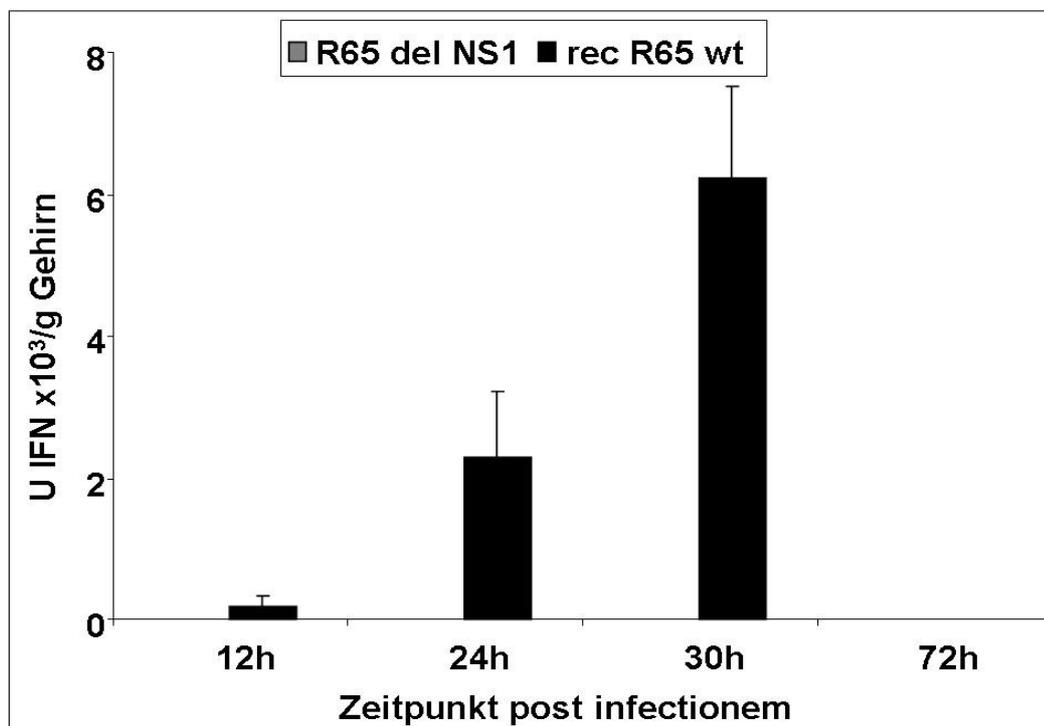


Abbildung 34: Hier dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der IFN-Konzentration im Kleinhirn der beiden Infektionsgruppen. Zum Zeitpunkt 24h wurde dieser MW aus jeweils sieben Tieren gebildet, zu allen anderen Zeitpunkten aus jeweils vier Tieren.

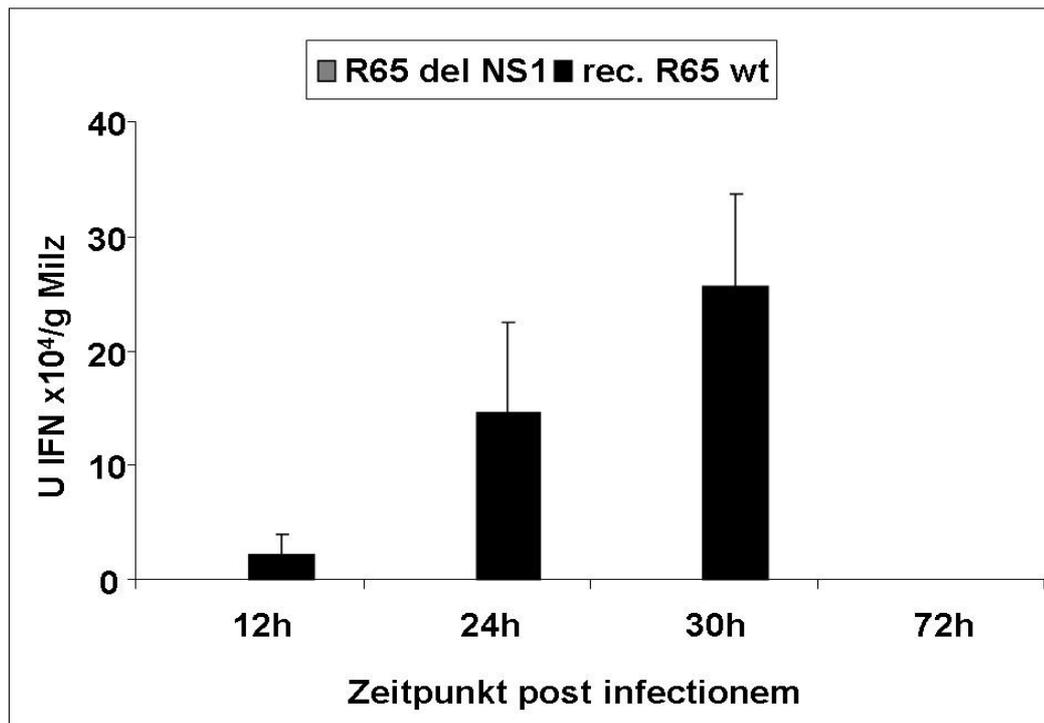


Abbildung 35: Hier dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der IFN-Konzentration in den Milzen der beiden Infektionsgruppen. Zum Zeitpunkt 24h wurde dieser MW aus jeweils sieben Tieren gebildet, zu allen anderen Zeitpunkten aus jeweils vier Tieren.

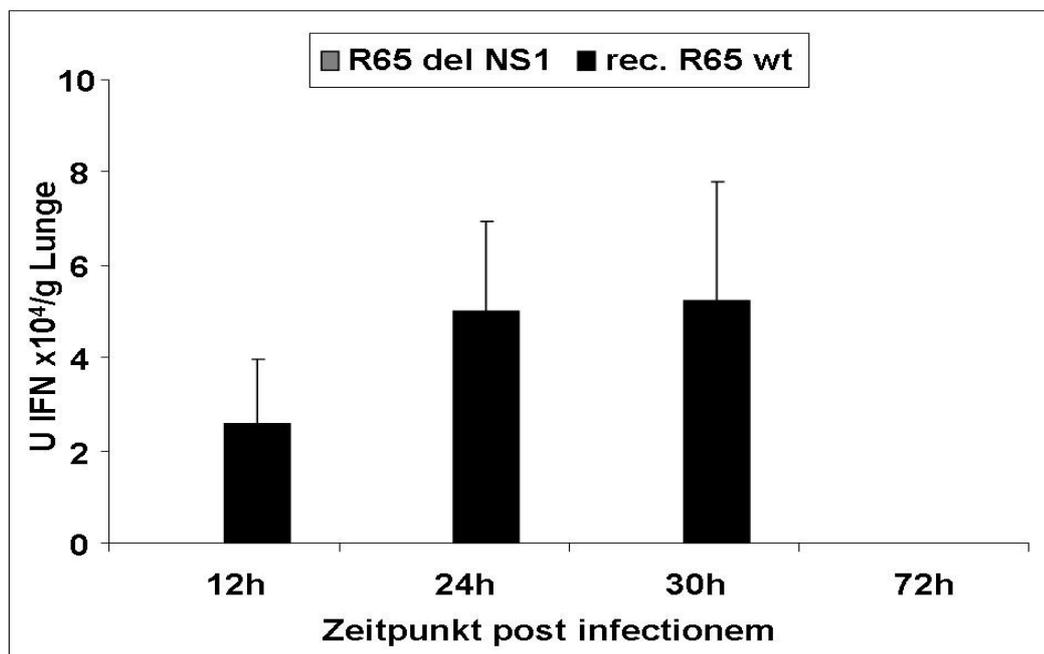


Abbildung 36: Hier dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der IFN-Konzentration in den Lungen der beiden Infektionsgruppen. Zum Zeitpunkt 24h wurde dieser MW aus jeweils sieben Tieren gebildet, zu allen anderen Zeitpunkten aus jeweils vier Tieren.

## VI Diskussion

### 1. Grundlagen zur Untersuchung des IFN-Systems (*in vivo* und *in vitro*)

Den Interferonen kommen zahlreiche protektive und regulatorische Funktionen im Immunsystem zu. Neben der antiviralen Wirkung, welche sowohl im Säuger [91-97, 137] als auch im Vogel [100, 107-113, 131, 138, 139] nachgewiesen wurde, entfalten Interferone auch antitumorale Wirkung [79-84, 86, 97]. Darüber hinaus werden sie sowohl zur Behandlung viraler Erkrankungen als auch zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie der MS klinisch eingesetzt [97]. Auch in der Veterinärmedizin ist mit dem IFN- $\omega$  ein Typ-I-IFN verfügbar, das zur Behandlung verschiedener viraler Erkrankungen bei Hund und Katze genutzt wird [140].

Da mit der Herstellung rekombinanten Interferons eine Behandlung viraler Infektionen heute ermöglicht ist, ist auch das Interesse an den Wirkmechanismen des Interferons gestiegen. Neue Erkenntnisse auf dem Gebiet können helfen, Interferone gezielt in der Therapie einzusetzen. Zudem können sie dazu beitragen, die von vielen Viren entwickelten modulatorischen Mechanismen zur Kontrolle des IFN-Systems zu verstehen und ggf. auch hier neue Behandlungsansätze zu stimulieren. In der vorliegenden Arbeit sollte nun das IFN-System im Huhn weitergehend charakterisiert werden.

Hierzu galt es Messmethoden zu etablieren, mit deren Hilfe die Interferonantwort des Körpers auf virale Infektionen untersucht und sichtbar gemacht werden konnte. In unserem Haus war zu dem Zeitpunkt bereits ein klassischer „Cytopathic effect inhibition assay“ etabliert, mit dessen Hilfe die antivirale Wirkung des IFN untersucht werden konnte. Dessen Durchführung ist jedoch aufwendig und eine exakte Quantifizierung des vorhandenen IFN ist nicht möglich.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Peter Stäheli von der Universität Freiburg gelang die erfolgreiche Etablierung eines weiteren Assays zum Nachweis biologisch aktiven Interferons. Bei diesem Assay wurde das Luciferase-Gen des Glühwürmchens unter die Kontrolle des Mx-Promotors,

welcher IFN-reguliert ist, gestellt [141]. Es gelang, eine stabil transfizierte Zelllinie mit diesem Reportergenkonstrukt zu etablieren. Diese Zellen reagieren auf die Anwesenheit von Typ-I-IFNs vom Huhn mit der Expression der Luciferase. Um eine messbare chemische Reaktion zu erzeugen, wird Luciferin zu der Lösung zugegeben. Dieses Protein wird durch die gebildeten Luciferasen oxidiert, ist dann jedoch instabil, sodass beim Zerfall des Zwischenproduktes Energie in Form von Lichtquanten abgegeben wird (Biolumineszenz). Dieses Licht kann mit Hilfe eines Luminometers gemessen werden [131].

Dieser Assay erwies sich gegenüber dem Antiviralen Bioassay als überlegen, da bei Verwendung eines Standards mit genauen Angaben zum Gehalt an IFN eine exakte Quantifizierung in Form der gemessenen Lichtblitze möglich war. Hierdurch wurde der Vergleich verschiedener Versuche aus verschiedenen Labors ermöglicht. Des Weiteren war dieser Assay deutlich weniger anfällig für auftretende inter-assay Schwankungen und auch die Durchführung erwies sich als deutlich einfacher. Da für den Reportergenassay weniger Zwischenschritte und kürzere Inkubationszeiten nötig waren, wurden zur Durchführung nicht mehr drei sondern nur noch zwei Tage benötigt.

Um die IFN-Antwort aus verschiedenen Individuen und Versuchen miteinander vergleichen zu können, wurde für den Bioassay ein interner Standard verwendet, mit dessen Hilfe die gemessenen Aktivitäten in Laboreinheiten IFN umgerechnet werden konnten. Bei diesem Standard handelte es sich um ein bereits vorliegendes rekombinantes IFN, dessen biologische Wirksamkeit bereits publiziert war [114]. Der verwendete Standard wurde durch Expression in *E.coli* gewonnen, eine Kontamination mit bakteriellen Faktoren konnte daher trotz Affinitätsreinigung nicht sicher ausgeschlossen werden. Es galt somit zu prüfen, ob die Reaktion der Reporterzellen ausschließlich auf die IFN-Aktivität zurückzuführen ist. Hierzu wurden ein IFN-spezifischer neutralisierender Antikörper sowie ein neutralisierendes Antiserum verwendet. Die Präinkubation des exprimierten IFNs mit diesen Antiseren neutralisierte die IFN-Aktivität vollständig. Die Präparation war somit für die weiteren Arbeiten geeignet.

Da an der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München nicht die Möglichkeit bestand, mit hochpathogenen Influenza-Viren zu arbeiten, wurden diese Infektionsversuche am Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit

(Friedrich-Löffler-Institut, Greifswald - Insel Riems) durchgeführt.

Vorversuche zur Etablierung der Analyseverfahren und der experimentellen Methoden wurden entsprechend mit Hilfe eines ND-Impfvirus durchgeführt, da NDV als guter Interferoninduktor gilt [142]. Für die Arbeiten wurde ein replikationskompetenter, plaquegereinigter Impfstamm der Firma Lohmann Animal Health gewählt. Das Vermögen dieses Impfstoffes IFN zu induzieren, wurde zunächst *in vitro* überprüft. In Übereinstimmung mit den Angaben in der Literatur führte die Infektion von Milzleukozyten zu einer starken Induktion der IFN-Synthese [143-145]. NDV erwies sich dabei als ebenso potent wie die TLR-Agonisten R848 (TLR7) und CpG-ODN (TLR21), welche in Vergleichsstudien die stärkste aktivierende Wirkung aufwiesen.

Um eine geeignete Virusdosis zu ermitteln, mit der eine verlässliche und gleichbleibende IFN-Antwort induziert wird, wurde der NDV-Impfstoff in verschiedenen Konzentrationen auf Milzleukozyten titriert und die Menge an gebildetem IFN nach 24-stündiger Stimulation gemessen. Wie V1.5 zu entnehmen ist, waren bereits Infektionsdosen von  $1 \times 10^6$  EID<sub>50</sub> bestens geeignet, eine deutliche IFN-Antwort zu induzieren.

Neben der Viruskonzentration entscheidet sicher auch die Dauer der Stimulation über die Menge an nachweisbarem IFN in den Kulturen. Um dies zu prüfen, wurden Milzleukozyten unterschiedlich lange mit einer Dosis von  $1 \times 10^7$  EID<sub>50</sub> des ND-Impfvirus stimuliert. Milzleukozyten reagierten bereits 4h nach der Infektion mit NDV mit der Bildung von IFN. In Versuchen von Novak *et al.* wird beschrieben, dass aus Blutzellen 2h - 4h nach der Infektion von Hühnern mit NDV maximale Mengen an mRNA für IFN- $\alpha$  gewonnen werden konnten [146]. Guha-Thakurta *et al.* konnten bereits 2h nach der intraperitonealen Infektion von Mäusen mit NDV mRNA für Typ-I-IFN aus den Milzzellen der infizierten Mäuse isolieren [143].

Mit jeder Probe wurden auf die CEC511-Zellen nicht nur das gebildete IFN, sondern auch die verwendeten TLR-Agonisten oder NDV übertragen. Da die Milzzellen bereits nach 2h - 4h begannen, IFN zu bilden und die CEC511-Zellen in den 6h Inkubationszeit des Assays dazu theoretisch auch in der Lage waren, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass IFN, welches von ihnen selber

produziert wurde, ebenfalls erkannt wurde und zu einer Aktivierung des Reporters führte. Dieses konnte jedoch in Versuchen, in denen die verwendeten Viren, sowohl NDV als auch R65-Virus (H5N1), auf CEC511-Zellen titriert wurden, ohne dass eine Emission von Lichtquanten messbar war, ausgeschlossen werden.

Zur Analyse der *in vivo*-IFN-Antwort sollten Organproben gewonnen werden, die sowohl die lokale (mukosale) als auch die systemische IFN-Bildung widerspiegeln. Sowohl NDV [147, 148] als auch AIV [41, 49-51, 128, 149] infizieren und replizieren im Respirationstrakt, daher ergaben sich die Lunge und die Trachea als die zuerst zu beprobenden Organe.

Beide Viren verbreiten sich von der Lunge ausgehend systemisch. In Säugermodellen wären regionäre Lymphknoten sicher interessante Organe für die weiteren Analysen. Da Hühner aber keine Lymphknoten besitzen und da beide Viren sehr schnell auf hämatogenem Weg die Milz erreichen, wurde diese als weiteres Organ für die Studie gewählt. Auch in der Literatur finden sich mehrere Hinweise darauf, dass die Zellen der Milz bei einer *in vivo*-Infektion mit NDV beginnen Typ-I-IFNs zu bilden [143, 150].

Auch Zellen des Blutes exprimieren IFN-mRNA wie in Arbeiten von Novak *et al.* gezeigt wurde [146]. Da im Rahmen dieser Arbeit biologisch aktives Protein nachgewiesen werden konnte, wurde auch Plasma in die Untersuchungen einbezogen.

Die vorausgegangenen *in vitro*-Versuche hatten gezeigt, dass bisher nicht identifizierte Zellpopulationen der Milz auf eine Infektion mit NDV schnell und deutlich mit der Bildung von IFN- $\alpha$  reagierten. Im Weiteren sollte nun untersucht werden, wie diese Reaktion *in vivo* aussieht. Dazu wurden Hühner intratracheal mit NDV infiziert und die zuvor beschriebenen Organe zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen. Es zeigte sich, dass es im Plasma zu einer Akkumulation von IFN mit einem Maximalwert bei 24h kommt. Die gemessenen IFN-Konzentrationen waren jedoch zu den Zeitpunkten 6h und 12h relativ moderat. Auch in der Milz war bereits ab 12h nach der Infektion ein Anstieg der IFN-Konzentration zu erkennen. Welche Zellen in den Organen der Hühner für die Synthese des IFN verantwortlich sind, ist bisher nicht eindeutig geklärt. Jedoch ist aus Mäusen bekannt, dass nicht nur dendritische Zellen Typ-I-IFN (mit

Ausnahme von IFN- $\tau$ ) bilden können [151, 152], sondern dass dazu eigentlich alle Zellen, die einen Zellkern besitzen, in der Lage sind [73].

Der Nachweis steigender Mengen viraler RNA in den Milzen infizierter Tiere dokumentiert die systemische Ausbreitung des Virus. Parallel zu dem Infektionsverlauf in der Milz verlief die Bildung von IFN.

In der Trachea konnte erst relativ spät IFN gemessen werden, deutlich nach dem ersten Nachweis von IFN in Milz und Plasma. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass es zunächst zu einer Infektion der tiefen Atemwege kam, von wo aus sich das Virus systemisch ausbreitet und in Folge dessen weitere Organe wie z.B. die Trachea infiziert wurden.

Die beschriebenen Untersuchungen zeigten, dass eine effiziente Methode zum Nachweis des biologisch aktiven IFNs in Zellkulturproben aber auch in Organhomogenaten und Plasma zur Verfügung steht. Mit der Technik gelang es, die Kinetik der IFN-Synthese nach einer Infektion mit NDV zu beschreiben und so grundlegende Daten für die im Weiteren geplanten Infektionsversuche mit dem hochpathogenen H5N1-Virus zu gewinnen.

## **2. Reaktion des Huhnes auf Infektionen mit HPAIV**

Nachdem auch für das Huhn gezeigt werden konnte, dass dieses ein dem Säuger vergleichbares IFN-System besitzt und dass dieses zudem in vergleichbarer Weise auf eine Stimulation durch Viren und PAMPs reagiert, sollte dessen funktionelle Relevanz bei der Influenza-Infektion untersucht werden. Die Arbeitshypothese hierfür lautete, dass Hühner auf eine Influenza-Infektion in einer Weise reagieren, wie dies in zahlreichen Mausmodellen beschrieben wurde [91, 94].

In einem ersten Versuch wurden Hühner intratracheal infiziert, anschließend wurden Gewebeproben zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion entnommen. Im Zuge der Infektion mit HPAIV konnten eine Vielzahl der klinischen Symptome, welche bereits aus der Literatur bekannt sind [27, 28, 44], bestätigt werden. Während zu Beginn gesträubtes Gefieder und vorübergehendes Desinteresse zu beobachten waren, kamen dort sehr schnell Symptome wie aufgekrümmte Körperhaltung, Separation von der Gruppe, deutliche Teilnahmslosigkeit, Futter- und Wasserverweigerung, Nasenausfluss, Blutungen

und Ödeme an Kopf und Ständern hinzu. Auch konnte in diesen Untersuchungen die beschriebene hohe Mortalitätsrate und der akute Verlauf der Infektion beobachtet werden.

Zum Zeitpunkt 6h p.i. konnte in keiner der drei Proben IFN nachgewiesen werden. Erst 12h p.i. war in der Lunge und in Ansätzen auch in der Milz ein Nachweis von IFN möglich, nicht jedoch im Plasma. Diese Menge an gemessenem IFN in Lunge und Milz entsprach in etwa auch der Menge an IFN, welche zu diesem Zeitpunkt post infectionem im NDV-Versuch messbar war. 24h p.i. konnten große Mengen an IFN in allen drei Proben der Tiere nachgewiesen werden. Die gemessenen IFN-Mengen aus den verschiedenen Versuchen können zwar nicht direkt miteinander verglichen werden, da für den NDV-Versuch ein attenuiertes Impfvirus verwendet wurde und für den AIV-Versuch ein hochpathogenes Virus, jedoch ist die Menge an IFN, welche im AIV-Versuch 24h p.i. gemessen werden konnte, schon auffällig hoch und steht im Widerspruch zu den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen [91, 153]. Da es sich bei dem verwendeten Virus um ein HPAIV mit voll funktionsfähigem NS1-Protein handelt, war erwartet worden, dass die IFN-Antwort allenfalls mäßig ausfällt.

Die Daten aus dem AIV-Versuch erwecken den Anschein, als ob die Produktion von IFN in Hühnern bis zu einem Zeitpunkt verhindert werden würde, ab dem der ganze Körper schon infiziert ist und vorhandenes IFN keinen Einfluss mehr auf den Infektionsverlauf nehmen kann. Daher ergab sich aus diesem ersten Versuch mit HPAIV und der etwas verspätet einsetzenden IFN-Produktion die Frage, ob mit einer rechtzeitigen Gabe von IFN dieser Infektionsverlauf abgemildert oder sogar gänzlich verhindert werden könnte, so wie es für virale Infektionen anderer Tierarten [91-96, 137], aber auch für Vögel [107-112] bereits mehrfach in der Literatur beschrieben steht.

### **3. Behandlung mit IFN**

Da in der Literatur keine Daten zu finden waren, die detailliert Aufschluss gegeben hätten, wie lange IFN auf Zellen einwirken muss, bis ein antiviraler Status induziert ist, mussten zunächst entsprechende Vorversuche durchgeführt werden. Hierzu wurden CEC32-Zellen mit IFN für unterschiedliche Zeiträume vorbehandelt und anschließend mit VSV infiziert. Eine 2-stündige Vorinkubation

war bereits ausreichend, um einen maximalen antiviralen Status zu erreichen. Für die weiteren Studien bedeutete dies, dass Infektionen im Tier bereits wenige Stunden nach einer IFN-Behandlung gesetzt werden können.

In einem ersten Behandlungsversuch wurden die Tiere oculonasal und intratracheal infiziert. Da bereits gezeigt wurde, dass oral appliziertes IFN Hühner vor viralen Infektionen schützt [113, 139, 154], erfolgte in diesem Versuch die Behandlung mit IFN durch Applikation in die Trachea und oculonasal, dem gewählten Infektionsweg. Die Infektion wurde sechs Stunden nach der Behandlung vorgenommen, womit ausreichend Zeit für die Induktion der IFN-Effekte gegeben war. Wie Abbildung 30 entnommen werden kann, war in diesem Versuch kein Unterschied zwischen der mit IFN und der mit Kontrollprotein vorbehandelten Gruppe zu erkennen.

Die Beobachtung, dass mukosal appliziertes IFN ohne Wirkung auf den Verlauf der H5N1-Infektion war, steht in deutlichem Gegensatz zu den Ergebnissen bei Mäusen [91, 155], Frettchen [95] und Meerschweinchen [96]. Bei diesen drei Tierarten konnte durch mukosale Behandlung mit IFN eine Reduktion der mit der Influenza-Infektion einhergehenden Erscheinungen beobachtet werden. Bei Mäusen und Frettchen konnte durch die Behandlung mit IFN sogar ein Schutz vor dem letalen Ende der Infektion mit H5N1 erreicht werden.

Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte im unterschiedlichen Aufbau der Lunge beim Huhn im Vergleich zur Säugerylunge zu finden sein. Möglicherweise gelangt ein Großteil des IFN in die Luftsäcke, von dort aber nicht mehr an das respiratorische Epithel. Zu erwarten wäre, dass systemisch appliziertes IFN auf hämatogenem Weg in die Lunge gelangt und hier gleichmäßig alle Bereiche erreicht. Aufbauend auf dieser Hypothese wurde ein zweiter Versuch geplant, bei dem IFN parenteral verabreicht werden sollte. Da weder Daten zur Resorption von Zytokinen nach Applikation in die Körperhöhle noch zur Halbwertszeit nach i.v. Applikation in der Literatur vorlagen, wurden entsprechende Vorversuche durchgeführt.

So wurde drei Hühnern IFN in die Körperhöhle appliziert und drei Hühnern in die V. jugularis. Diesen sechs Tieren wurde wiederholt Blut entnommen, in welchem die IFN-Konzentration bestimmt wurde. Bei der intraperitonealen Applikation

zeigte sich ein uneinheitlicher Verlauf der Aufnahme des Zytokins ins Blut. Bei der intravenösen Applikation hingegen konnte ein Verlauf der IFN-Konzentration beobachtet werden, wie er für eine zu erwartende Verteilungs- und Ausscheidungskinetik charakteristisch ist (Abbildung 24). Die aus Messdaten berechnete Halbwertszeit beträgt eine Stunde und entspricht damit exakt dem Wert, welcher in der Humanmedizin für nicht modifiziertes IFN ermittelt wurde [156]. Um einen möglichst großen biologischen Effekt zu erhalten, ergab sich hieraus, dass für den geplanten Infektionsversuch die Halbwertszeit von IFN durch Pegylierung erhöht werden müsste, so wie es für humanes IFN beschrieben steht [156] oder IFN mehrmalig zu applizieren wäre.

Da ausreichende Mengen an IFN zur Verfügung standen, wurden drei Applikationen von jeweils  $3 \times 10^6$  U IFN/kg KGW durchgeführt. Die Zeitpunkte waren 8h und 2h vor der Infektion und 12h danach. Jeweils 15min nach der Applikation wurden Plasmaproben entnommen, die auf den Gehalt von IFN hin überprüft wurden. Wie aus Abbildung 31 zu entnehmen ist, konnte bei der Gruppe, welche mit IFN behandelt wurde gezeigt werden, dass IFN im Blut und damit systemisch vorhanden war, während es bei der Gruppe die nur mit einem irrelevanten Kontrollprotein behandelt wurde, nicht der Fall war. Somit sollte das IFN in allen Organen der IFN-Gruppe zu einem antiviralen Status führen können.

Um auch die Infektion an natürliche Bedingungen anzupassen, wurde diesmal nicht direkt Virus appliziert, sondern die behandelten Tiere wurden zu einer vorher infizierten Ausscheidergruppe gesetzt. Anhand des klinischen Verlaufes konnte die Infektion der behandelten Tiere bestätigt werden. Die Symptome glichen denen im ersten Behandlungsversuch und damit den in der Literatur beschriebenen. Im direkten Vergleich der beiden Gruppen ergaben sich keine Abweichungen hinsichtlich des zeitlichen Verlaufes und auch der Schwere der Symptome. Auch die Überlebenskurven der beiden Gruppen waren identisch (Abbildung 32). Das Bild steht im Widerspruch zu der beschriebenen Sensitivität von Influenza-Viren gegenüber Interferon [91], welches in der einen Gruppe nachweislich systemisch vorhanden war und in der anderen Gruppe nicht.

Die erarbeiteten Daten zeigen, dass H5N1-Viren in unerwartet hohem Maße IFN in Hühnern induzieren. Allerdings ist dieses IFN nicht in der Lage, die Virusreplikation zu hemmen. Auch eine Vorbehandlung der Tiere mit IFN führte

nicht zum Schutz der Tiere. Diese Daten stehen in klarem Gegensatz zu Untersuchungen in der Maus, bei denen gezeigt werden konnte, dass H5N1-Viren die endogene IFN-Bildung hemmen und zudem IFN sensitiv sind [91, 157, 158]. Das in diesen Versuchen verwendete IFN war sowohl *in vitro* als auch *in vivo* biologisch aktiv. Die beobachteten Effekte sind also nicht auf eine fehlende Wirkung zurückzuführen. Es ist bisher unklar, welche Zellen im Huhn IFN bilden. Möglicherweise handelt es sich um Zellen, die zwar infiziert werden, die aber dennoch in der Lage sind, große Mengen an IFN zu bilden. Dieses IFN könnte benachbarte Zellen vor einer H5N1-Infektion schützen. Influenza-Viren haben aber Mechanismen entwickelt, die IFN-induzierten antiviralen Mechanismen effektiv zu hemmen. Wesentlich hierfür ist das NS1-Protein. H5N1-Viren könnten also auf diesem Weg auch in Anwesenheit von IFN replizieren. Tatsächlich finden sich in der Literatur zahlreiche Arbeiten, welche die Rolle des NS1-Proteins von Influenza-Viren beschreiben, vollständig verstanden ist dies bisher allerdings nicht [66-68, 72, 73, 158]. Auch für das Huhn konnte gezeigt werden, dass das NS1-Protein eine essentielle Rolle im Infektionsgeschehen spielt. In einem Versuch von Kochs *et al.* wurden Hühner intratracheal mit einem SC35wt-Virus und einer SC35delNS1-Mutante infiziert. Das aus dem Seehund stammende Virus [159] ist pathogen für Hühner. Es zeigte sich, dass lediglich die Infektion mit dem SC35wt-Virus, nicht aber mit dem SC35delNS1-Virus zu Krankheitserscheinungen und einem Nachweis viralen Antigens in Oropharyngealtupfern führte [123]. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher vergleichende Untersuchungen mit dem H5N1-Virus durchgeführt werden.

#### **4. Untersuchung des Einflusses des NS1-Proteins**

Für den folgenden Infektionsversuch stand ein rekombinantes wt-Virus und eine Mutante dieses wt-Virus, bei der das NS1-Protein deletiert war, zur Verfügung. Die für diesen Versuch verwendeten Hühner wurden wiederum intratracheal infiziert, damit sichergestellt werden konnte, dass jedes Individuum die gleiche Infektionsdosis erhielt und dass eventuelle Unterschiede im klinischen Verlauf oder der Expression von Zytokinen definitiv auf die Unterschiede im Virus zurückzuführen sind.

Die Gruppe von Hühnern, welche mit dem R65delNS1-Virus infiziert wurde, wies

während des gesamten Versuchszeitraums (72h) keinerlei klinische Symptomatik auf. Während die Gruppe von Hühnern, welche mit dem rekombinanten R65wt-Virus infiziert wurde, exakt die gleichen Symptome im Infektionsgeschehen zeigten, wie auch schon die Tiere, die mit dem R65wt-Virus infiziert wurden und damit auch die in der Literatur beschriebenen Symptome widerspiegeln [27, 28, 44]. Die letzte Beprobung der Tiere, die mit dem rec. R65wt-Virus infiziert wurden, war zum Zeitpunkt 30h p.i. möglich, da die Tiere der 48h-Gruppe dort bereits so hochgradig erkrankt waren, dass sie aus Tierschutzgründen getötet wurden. Die letzte Gruppe von Hühnern, die mit dem R65delNS1-Virus infiziert waren, wurde zum Zeitpunkt 72h p.i. getötet und beprobt, alle Tiere dieser Gruppe waren ohne klinische Symptomatik.

Die makroskopische Betrachtung der Lungen der beiden Gruppen zeigte im Verlauf des Infektionsgeschehens deutliche Verdichtungen der Lungen. Diese waren zu den Zeitpunkten 12h p.i. und 24h p.i. bei der R65delNS1-Gruppe deutlich stärker ausgeprägt als bei der rec. R65wt-Gruppe. Zum Zeitpunkt 30h p.i. war an den Lungen makroskopisch kein Unterschied mehr erkennbar. Die Lungen der R65delNS1-Gruppe, die 72h p.i. betrachtet wurden, wiesen nahezu keine makroskopisch erkennbaren Veränderungen mehr auf. Diese Beobachtungen ließen vermuten, dass bei den Lungen der Tiere der R65delNS1-Gruppe unmittelbar nach der Infektion ein entzündliches Geschehen in der Lunge initiiert wurde, während diese Reaktion in den Lungen der Tiere der rec. R65wt-Gruppe deutlich verzögert war.

Die Daten der IFN-Messung in den Proben der Gruppe, welche mit dem rec. R65wt-Virus infiziert wurde, entsprachen denen, die auch bei der Infektion mit dem R65wt-Virus beobachtet wurden. Zusätzlich zu den in den vorherigen Versuchen bereits beprobten Organen, wurde in diesem Versuch auch das Gehirn beprobt und auf die Anwesenheit von IFN hin untersucht. Interessanterweise kann auch im Gehirn IFN nachgewiesen werden. Der Verlauf der Konzentrationsänderung ähnelt jedoch nicht dem Verlauf, der im Plasma zu beobachten ist, sondern eher dem, der auch in Lunge und Milz zu erkennen ist. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass auch im Gehirn direkt IFN gebildet wird und es sich nicht nur um eine Akkumulation von IFN, welches mit dem Blut ins Gehirn gelangt, handelt.

Überraschend waren die Befunde in der R65delNS1-Gruppe. Diese Tiere überlebten ohne klinische Symptome, wiesen aber bereits zu Beginn der Infektion deutliche Veränderungen an den Lungen auf. Die Quantifizierung des IFN ergab aber, dass keines der Tiere messbare Mengen an IFN in den untersuchten Organen bildete. Da das R65delNS1-Virus nicht zu einer systemischen Infektion führte, ist die fehlende Reaktion in Milz, Plasma und Gehirn erklärbar. Es konnte allerdings immunhistologisch gezeigt werden, dass dieses Virus in der Lunge replizierte. Diese Infektion konnte jedoch das IFN-System offensichtlich nicht aktivieren. Die hochgradige Attenuierung des R65delNS1-Virus kann somit nicht mit einem fehlenden anti-IFN-Mechanismus (Fehlen des NS1-Proteins) erklärt werden. Im Kontext der Literatur sind diese Befunde sehr überraschend. In Mausmodellen wurde klar gezeigt, dass das NS1-Protein bereits die IFN-Bildung hemmt. NS1-Deletionsmutanten induzieren *in vitro* und *in vivo* große Mengen an IFN [121-124, 153]. Die aus diesen Beobachtungen abgeleitete Hypothese lautet, dass NS1-Deletionsmutanten die Wirkung der IFNs nicht mehr kontrollieren können und somit hochsensitiv für IFN werden.

Die hier erarbeiteten Daten zeigen, dass dies für eine H5N1-Infektion beim Huhn nicht in gleicher Weise gilt. R65wt-Virus induziert erhebliche Mengen an IFN und ist gegenüber der IFN-Wirkung resistent. Da die Deletion des NS1-Proteins das Virus attenuiert, muss das Protein auch im Infektionsgeschehen beim Huhn eine wichtige Rolle spielen. Eine Funktion, die aufgrund dieser Untersuchungen sicher ausgeschlossen werden kann, ist die der Hemmung der IFN-Bildung. Möglicherweise ist das NS1-Protein in der Lage die IFN-induzierten Abwehrmechanismen zu hemmen und so dem Virus eine effiziente Replikation zu ermöglichen.

## VII Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle des Interferon (IFN)-Systems bei der Infektion von Hühnern (weiße Leghorn) mit einem hochpathogenen aviären Influenza-Virus (H5N1) zu untersuchen. Arbeiten in Mäusen haben gezeigt, dass aviäre Influenza-Viren hochgradig IFN sensitiv sind und daher über Mechanismen verfügen, welche die IFN-Bildung effizient hemmen. Bisher gibt es keine vergleichbaren Untersuchungen beim Huhn. Als Vorarbeiten zu den eigentlichen Infektionsversuchen unter L3 Sicherheitsbedingungen wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Versuche mit verschiedenen Interferoninduktoren und Newcastle Disease-Virus (NDV) durchgeführt. Zur Quantifizierung biologisch aktiven IFNs in Zellkulturüberständen, Gewebehomogenaten sowie Plasmaproben wurde ein Reportergenassay verwendet.

Milzleukozyten reagieren *in vitro* auf eine Stimulation mit Agonisten der Toll-like Rezeptoren-3, -7 und -21 sowie mit NDV mit einer dosisabhängigen IFN-Bildung. IFN kann bereits 4 Stunden nach Stimulation im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden und erreicht nach 48 Stunden maximale Werte. Auch bei einer intratrachealen Gabe des NDV-Impfvirus kann bereits nach 6 Stunden ein deutlicher Anstieg der IFN-Konzentrationen im Lungengewebe nachgewiesen werden, maximale Werte wurden nach 24 Stunden gefunden. Zu diesem Zeitpunkt waren sowohl in der Milz, als auch im Plasma deutliche IFN-Werte nachweisbar. Die Bildung des Zytokins korrelierte zeitlich mit dem Nachweis von Impfvirus-RNA in der Milz und damit mit der systemischen Infektion. Bereits an Tag 5 p.i. konnte im Plasma kein IFN mehr detektiert werden. IFN konnte bei den mukosal infizierten Tieren nicht nur im Lungengewebe, sondern auch in Lungenlavageproben nachgewiesen werden, was auf die Sekretion des Zytokins in die Tertiärbronchen hinweist. Da im Weiteren *in vivo* Behandlungsversuche mit rekombinantem IFN geplant waren, wurde die biologische Halbwertszeit im Plasma nach i.v. Applikation bestimmt. In Übereinstimmung mit den Daten zur IFN-Therapie beim Menschen wurde die HWZ mit exakt einer Stunde ermittelt.

Die weiteren Arbeiten wurden am Friedrich-Löffler-Institut (Greifswald - Insel Riems) unter Verwendung des H5N1-Isolates HPAIV A Cygnus cygnus/Ruegen-Germany/2006 (R65-Virus) durchgeführt. Eine IFN-Bildung konnte im

Lungengewebe erstmals 12 Stunden nach der intratrachealen Infektion von SPF-Tieren nachgewiesen werden, während sowohl die Milz als auch das Plasma erst 24 Stunden p.i. deutlich messbare IFN Mengen zeigten. Im Gegensatz zu Mäusen, die nach der Infektion mit diesem Virus nur sehr geringe IFN-Mengen bilden können, fanden sich bei den Hühnern zum Zeitpunkt 24 Stunden p.i. sehr hohe Werte. Zu diesem Zeitpunkt wiesen alle Tiere deutliche klinische Symptome der Infektion auf und starben innerhalb der nächsten 24 Stunden. Demnach konnte die Bildung des IFNs die Tiere nicht vor der H5N1-Infektion schützen. Hieraus ergab sich die Frage, ob exogen zugeführtes IFN in der Lage ist eine H5N1-Infektion bei den Tieren zu kontrollieren. Um dies zu prüfen, wurden in einem ersten Versuch Hühner mit IFN intratracheal und oculonasal vorbehandelt und 6 Stunden später intratracheal infiziert. Es zeigte sich, dass die IFN-behandelten Tiere ebenso schnell starben wie die unbehandelten Kontrolltiere. Da die Behandlung möglicherweise nicht zu ausreichend hohen systemischen IFN-Konzentrationen geführt hat, um einen Schutz zu gewährleisten, wurde im Folgeversuch IFN i.v. appliziert. Zudem wurden die Tiere nicht direkt infiziert, sondern mit einer Gruppe infizierter Ausscheidertiere zusammengesetzt. Als Behandlung erhielten die Tiere  $3 \times 10^6$  U IFN/kg KGW 8 und 2 Stunden vor und 12 Stunden nach dem ersten Kontakt mit den Ausscheidertieren. Die Kontrollgruppe wurde mit einem irrelevanten Protein in gleicher Konzentration und zu den gleichen Zeitpunkten behandelt. Auch in diesem Versuch konnte kein Unterschied in den Mortalitätskurven der beiden Gruppen nachgewiesen werden. Zusammenfassend zeigen die Daten, dass Hühner auf virale Infektionen mit einer deutlichen IFN-Antwort reagieren, welche sowohl im infizierten Gewebe als auch im Plasma messbar ist. Hochpathogene Influenza-Viren haben aber offensichtlich Mechanismen entwickelt, die sie gegenüber dem IFN-System unempfindlich machen.

## VIII Summary

This study was conducted to analyze the impact of the interferon (IFN) system on the infection with a highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) in chicken (white leghorn). Data obtained from mice have shown that avian influenza viruses are profoundly sensitive to IFN and therefore capable of inhibiting IFN generation. Hitherto comparable studies in the chicken have not been done.

Preliminary to the infection experiments under L3 safety conditions, both *in vitro* and *in vivo* experiments with interferon inducers and Newcastle Disease-Virus (NDV) have been performed. In order to quantify biological active IFN in cell culture supernatant, tissue homogenate and plasma samples, a reporter gene assay has been used.

Leukocytes from the spleen respond to stimulation by toll like receptor -3, -7 and -21 agonists and NDV with a dosage depending IFN generation. IFN can be detected in cell culture supernatant as early as 4 hours after stimulation and peaks after 48 hours. After intratracheal inoculation of the NDV vaccine virus a significant rise in IFN concentration can also be found after 6 hours in lung tissue, a maximum is reached after 24 hours. At this point of time, IFN was detected in the spleen as well as in the plasma. Generation of the cytokine and detection of RNA from the vaccination virus in the spleen, the onset of a systemic infection, happened coinstantaneously. 5 days after infection, IFN could not be found in the plasma anymore. In chicken infected via the mucosal membranes, IFN was not only detected in lung tissue but also in pulmonary lavage samples, indicating a secretion of the cytokine into the tertiary bronchia. As further studies on *in vivo* treatment with recombinant IFN were planed, the biological half life in the plasma after i.v. injection was established. Correlating with data from human IFN therapy, half life was exactly one hour.

The following experiments were conducted at the Friedrich-Löffler-Institut (Greifswald - Insel Riems) with the H5N1 isolate HPAIV A/Cygnus Cygnus/Ruegen-Germany/2006 (R65-Virus). IFN generation in pulmonary tissue started 12 hours after intratracheal infection of SPF animals, whereas detectable levels of IFN in the spleen and plasma were not satisfactorily shown until 24

hours post infection. Unlike mice, who are unable to generate high levels of IFN after infection with this virus, chicken formed high amounts of IFN 24 hours p.i. All animals were showing symptoms of infection at this point of time and died within another 24 hours. Therefore, IFN generation could not protect the chicken from an H5N1 infection. As a result, the question if IFN-treatment would be able to control the onset of a H5N1 infection in chicken was raised. To verify this, chicken were given IFN both intratracheal and oculonasal 6 hours before being intratracheally infected. Both pre-treated and control animals died after the same amount of time. Since the pre-treatment might have been insufficient in achieving a protective level of IFN, another experiment was conducted by i.v. injecting IFN. Also, a direct infection was avoided by grouping pre-treated animals with infectious chicken. (Pre-)Treatment consisted of 3 injections ( $3 \times 10^6$  U IFN/kg body weight) both prior (8 and 2 hours) and after (12 hours) first contact with the infectious animals. The control group was treated with an irrelevant protein of identical protein concentration at the same points of time. This experiment showed no difference in mortality between both groups either.

Collectively, these data establish that chicken react to viral infection with a significant increase in IFN levels. However, highly pathogenic influenza viruses seem to have developed mechanisms which desensitize them to the IFN system.

**IX Literaturverzeichnis**

1. Beigel JH. Influenza. *Crit Care Med.* 2008 Sep;36(9):2660-6.
2. Helenius A. Unpacking the incoming influenza virus. *Cell.* 1992 May 15;69(4):577-8.
3. Nelson MI, Holmes EC. The evolution of epidemic influenza. *Nat Rev Genet.* 2007 Mar;8(3):196-205.
4. Palese P. Influenza: old and new threats. *Nat Med.* 2004 Dec;10(12 Suppl):S82-7.
5. Russell CJ, Webster RG. The genesis of a pandemic influenza virus. *Cell.* 2005 Nov 4;123(3):368-71.
6. Webster RG, Rott R. Influenza virus A pathogenicity: the pivotal role of hemagglutinin. *Cell.* 1987 Aug 28;50(5):665-6.
7. Li OT, Poon LL. One step closer to universal influenza epitopes. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2009 Aug;7(6):687-90.
8. Narain JP, Bhatia R. Influenza A (H1N1): responding to a pandemic threat. *Indian J Med Res.* 2009 May;129(5):465-7.
9. Chen LM, Davis CT, Zhou H, Cox NJ, Donis RO. Genetic compatibility and virulence of reassortants derived from contemporary avian H5N1 and human H3N2 influenza A viruses. *PLoS Pathog.* 2008 May;4(5):e1000072.
10. Wang TT, Palese P. Unraveling the mystery of swine influenza virus. *Cell.* 2009 Jun 12;137(6):983-5.
11. Khan SI, Akbar SM, Hossain ST, Mahtab MA. Swine influenza (H1N1) pandemic: developing countries' perspective. *Rural Remote Health.* 2009 Jul-Sep;9(3):1262.
12. Salomon R, Webster RG. The influenza virus enigma. *Cell.* 2009 Feb 6;136(3):402-10.

13. Cheung CY, Poon LL, Lau AS, Luk W, Lau YL, Shortridge KF, et al. Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease? *Lancet*. 2002 Dec 7;360(9348):1831-7.
14. Kash JC, Goodman AG, Korth MJ, Katze MG. Hijacking of the host-cell response and translational control during influenza virus infection. *Virus Res*. 2006 Jul;119(1):111-20.
15. Chan MC, Cheung CY, Chui WH, Tsao SW, Nicholls JM, Chan YO, et al. Proinflammatory cytokine responses induced by influenza A (H5N1) viruses in primary human alveolar and bronchial epithelial cells. *Respir Res*. 2005;6:135.
16. Kash JC, Tumpey TM, Proll SC, Carter V, Perwitasari O, Thomas MJ, et al. Genomic analysis of increased host immune and cell death responses induced by 1918 influenza virus. *Nature*. 2006 Oct 5;443(7111):578-81.
17. Tumpey TM, Szretter KJ, Van Hoeven N, Katz JM, Kochs G, Haller O, et al. The Mx1 gene protects mice against the pandemic 1918 and highly lethal human H5N1 influenza viruses. *J Virol*. 2007 Oct;81(19):10818-21.
18. Pavlovic J, Haller O, Staeheli P. Human and mouse Mx proteins inhibit different steps of the influenza virus multiplication cycle. *J Virol*. 1992 Apr;66(4):2564-9.
19. Krug RM, Shaw M, Broni B, Shapiro G, Haller O. Inhibition of influenza viral mRNA synthesis in cells expressing the interferon-induced Mx gene product. *J Virol*. 1985 Oct;56(1):201-6.
20. Ruff M. Interferon-mediated development of influenza virus resistance in hybrids between Mx gene-bearing and control mouse embryo fibroblasts. *J Gen Virol*. 1983 Jun;64 (Pt 6):1291-300.
21. Staeheli P, Haller O. Interferon-induced Mx protein: a mediator of cellular resistance to influenza virus. *Interferon*. 1987;8:1-23.

22. Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Naslund TI, Liljestrom P, Weber F, et al. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science*. 2006 Nov 10;314(5801):997-1001.
23. Bouvier NM, Palese P. The biology of influenza viruses. *Vaccine*. 2008 Sep 12;26 Suppl 4:D49-53.
24. Barnard DL. Animal models for the study of influenza pathogenesis and therapy. *Antiviral Res*. 2009 May;82(2):A110-22.
25. Capua I, Alexander DJ. Animal and human health implications of avian influenza infections. *Biosci Rep*. 2007 Dec;27(6):359-72.
26. Kuchipudi SV, Nelli R, White GA, Bain M, Chang KC, Dunham S. Differences in influenza virus receptors in chickens and ducks: Implications for interspecies transmission. *J Mol Genet Med*. 2009;3(1):143-51.
27. Swayne DE. Understanding the complex pathobiology of high pathogenicity avian influenza viruses in birds. *Avian Dis*. 2007 Mar;51(1 Suppl):242-9.
28. Cardona CJ, Xing Z, Sandrock CE, Davis CE. Avian influenza in birds and mammals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2009 Jul;32(4):255-73.
29. Pantin-Jackwood MJ, Swayne DE. Pathobiology of Asian highly pathogenic avian influenza H5N1 virus infections in ducks. *Avian Dis*. 2007 Mar;51(1 Suppl):250-9.
30. Songserm T, Jam-on R, Sae-Heng N, Meemak N, Hulse-Post DJ, Sturm-Ramirez KM, et al. Domestic ducks and H5N1 influenza epidemic, Thailand. *Emerg Infect Dis*. 2006 Apr;12(4):575-81.
31. Perkins LE, Swayne DE. Pathogenicity of a Hong Kong-origin H5N1 highly pathogenic avian influenza virus for emus, geese, ducks, and pigeons. *Avian Dis*. 2002 Jan-Mar;46(1):53-63.
32. Sims LD, Domenech J, Benigno C, Kahn S, Kamata A, Lubroth J, et al. Origin and evolution of highly pathogenic H5N1 avian influenza in Asia. *Vet Rec*. 2005 Aug 6;157(6):159-64.

33. Klopfleisch R, Werner O, Mundt E, Harder T, Teifke JP. Neurotropism of highly pathogenic avian influenza virus A/chicken/Indonesia/2003 (H5N1) in experimentally infected pigeons (*Columbia livia* f. *domestica*). *Vet Pathol.* 2006 Jul;43(4):463-70.
34. Werner O, Starick E, Teifke J, Klopfleisch R, Prajitno TY, Beer M, et al. Minute excretion of highly pathogenic avian influenza virus A/chicken/Indonesia/2003 (H5N1) from experimentally infected domestic pigeons (*Columbia livia*) and lack of transmission to sentinel chickens. *J Gen Virol.* 2007 Nov;88(Pt 11):3089-93.
35. Perkins LE, Swayne DE. Varied pathogenicity of a Hong Kong-origin H5N1 avian influenza virus in four passerine species and budgerigars. *Vet Pathol.* 2003 Jan;40(1):14-24.
36. De Benedictis P, Joannis TM, Lombin LH, Shittu I, Beato MS, Rebonato V, et al. Field and laboratory findings of the first incursion of the Asian H5N1 highly pathogenic avian influenza virus in Africa. *Avian Pathol.* 2007 Apr;36(2):115-7.
37. Cardona CJ, Charlton BR, Woolcock PR. Persistence of immunity in commercial egg-laying hens following vaccination with a killed H6N2 avian influenza vaccine. *Avian Dis.* 2006 Sep;50(3):374-9.
38. Ziegler AF, Davison S, Acland H, Eckroade RJ. Characteristics of H7N2 (nonpathogenic) avian influenza virus infections in commercial layers, in Pennsylvania, 1997-98. *Avian Dis.* 1999 Jan-Mar;43(1):142-9.
39. Kwon YK, Sung HW, Joh SJ, Lee YJ, Kim MC, Choi JG, et al. An outbreak of highly pathogenic avian influenza subtype H5N1 in broiler breeders, Korea. *J Vet Med Sci.* 2005 Nov;67(11):1193-6.
40. Brown CC, Olander HJ, Senne DA. A pathogenesis study of highly pathogenic avian influenza virus H5N2 in chickens, using immunohistochemistry. *J Comp Pathol.* 1992 Oct;107(3):341-8.

41. Pantin-Jackwood MJ, Swayne DE. Pathogenesis and pathobiology of avian influenza virus infection in birds. *Rev Sci Tech.* 2009 Apr;28(1):113-36.
42. Suzuki K, Okada H, Itoh T, Tada T, Mase M, Nakamura K, et al. Association of increased pathogenicity of Asian H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses in chickens with highly efficient viral replication accompanied by early destruction of innate immune responses. *J Virol.* 2009 Aug;83(15):7475-86.
43. Kwon JS, Lee HJ, Lee DH, Lee YJ, Mo IP, Nahm SS, et al. Immune responses and pathogenesis in immunocompromised chickens in response to infection with the H9N2 low pathogenic avian influenza virus. *Virus Res.* 2008 May;133(2):187-94.
44. Aiki-Raji CO, Aguilar PV, Kwon YK, Goetz S, Suarez DL, Jethra AI, et al. Phylogenetics and pathogenesis of early avian influenza viruses (H5N1), Nigeria. *Emerg Infect Dis.* 2008 Nov;14(11):1753-5.
45. Swayne DE. Pathobiology of H5N2 Mexican avian influenza virus infections of chickens. *Vet Pathol.* 1997 Nov;34(6):557-67.
46. Perkins LE, Swayne DE. Pathobiology of A/chicken/Hong Kong/220/97 (5N1) avian influenza virus in seven gallinaceous species. *Vet Pathol.* 2001 Mar;38(2):149-64.
47. Nakamura K, Imada T, Imai K, Yamamoto Y, Tanimura N, Yamada M, et al. Pathology of specific-pathogen-free chickens inoculated with H5N1 avian influenza viruses isolated in Japan in 2004. *Avian Dis.* 2008 Mar;52(1):8-13.
48. Kobayashi Y, Horimoto T, Kawaoka Y, Alexander DJ, Itakura C. Pathological studies of chickens experimentally infected with two highly pathogenic avian influenza viruses. *Avian Pathol.* 1996 Jun;25(2):285-304.
49. Perkins LE, Swayne DE. Comparative susceptibility of selected avian and mammalian species to a Hong Kong-origin H5N1 high-pathogenicity avian influenza virus. *Avian Dis.* 2003;47(3 Suppl):956-67.

50. Nakatani H, Nakamura K, Yamamoto Y, Yamada M. Epidemiology, pathology, and immunohistochemistry of layer hens naturally affected with H5N1 highly pathogenic avian influenza in Japan. *Avian Dis.* 2005 Sep;49(3):436-41.
51. Muramoto Y, Ozaki H, Takada A, Park CH, Sunden Y, Umemura T, et al. Highly pathogenic H5N1 influenza virus causes coagulopathy in chickens. *Microbiol Immunol.* 2006;50(1):73-81.
52. Horimoto T, Kawaoka Y. Reverse genetics provides direct evidence for a correlation of hemagglutinin cleavability and virulence of an avian influenza A virus. *J Virol.* 1994 May;68(5):3120-8.
53. Kawaoka Y, Naeve CW, Webster RG. Is virulence of H5N2 influenza viruses in chickens associated with loss of carbohydrate from the hemagglutinin? *Virology.* 1984 Dec;139(2):303-16.
54. Ohuchi M, Orlich M, Ohuchi R, Simpson BE, Garten W, Klenk HD, et al. Mutations at the cleavage site of the hemagglutinin after the pathogenicity of influenza virus A/chick/Penn/83 (H5N2). *Virology.* 1989 Feb;168(2):274-80.
55. Shope RE. The Etiology of Swine Influenza. *Science.* 1931 Feb 20;73(1886):214-5.
56. Lupiani B, Reddy SM. The history of avian influenza. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2009 Jul;32(4):311-23.
57. Hirst GK. The Agglutination of Red Cells by Allantoic Fluid of Chick Embryos Infected with Influenza Virus. *Science.* 1941 Jul 4;94(2427):22-3.
58. Bosch FX, Orlich M, Klenk HD, Rott R. The structure of the hemagglutinin, a determinant for the pathogenicity of influenza viruses. *Virology.* 1979 May;95(1):197-207.
59. Klenk HD, Rott R, Orlich M. Further studies on the activation of influenza virus by proteolytic cleavage of the haemagglutinin. *J Gen Virol.* 1977 Jul;36(1):151-61.

60. Scholtissek C, Rohde W, Von Hoyningen V, Rott R. On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. *Virology*. 1978 Jun 1;87(1):13-20.
61. Alexander DJ, Brown IH. History of highly pathogenic avian influenza. *Rev Sci Tech*. 2009 Apr;28(1):19-38.
62. Alexander DJ. A review of avian influenza in different bird species. *Vet Microbiol*. 2000 May 22;74(1-2):3-13.
63. Alexander DJ. Summary of avian influenza activity in Europe, Asia, Africa, and Australasia, 2002-2006. *Avian Dis*. 2007 Mar;51(1 Suppl):161-6.
64. Artois M, Bicoût D, Doctrinal D, Fouchier R, Gavier-Widen D, Globig A, et al. Outbreaks of highly pathogenic avian influenza in Europe: the risks associated with wild birds. *Rev Sci Tech*. 2009 Apr;28(1):69-92.
65. Lee CW, Suarez DL, Tumpey TM, Sung HW, Kwon YK, Lee YJ, et al. Characterization of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses isolated from South Korea. *J Virol*. 2005 Mar;79(6):3692-702.
66. Wang JP, Kurt-Jones EA, Finberg RW. Innate immunity to respiratory viruses. *Cell Microbiol*. 2007 Jul;9(7):1641-6.
67. Borden EC, Sen GC, Uze G, Silverman RH, Ransohoff RM, Foster GR, et al. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov*. 2007 Dec;6(12):975-90.
68. Randall RE, Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol*. 2008 Jan;89(Pt 1):1-47.
69. Pichlmair A, Reis e Sousa C. Innate recognition of viruses. *Immunity*. 2007 Sep;27(3):370-83.
70. Krause CD, Pestka S. Historical developments in the research of interferon receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2007 Oct-Dec;18(5-6):473-82.

71. Sadler AJ, Williams BR. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol.* 2008 Jul;8(7):559-68.
72. Neumann G, Shinya K, Kawaoka Y. Molecular pathogenesis of H5N1 influenza virus infections. *Antivir Ther.* 2007;12(4 Pt B):617-26.
73. Weber F, Kochs G, Haller O, Staeheli P. Viral evasion of the interferon system: old viruses, new tricks. *J Interferon Cytokine Res.* 2003 Apr;23(4):209-13.
74. Mayr W. "Zur Ringzonenbildung im virusinfizierten tierischen Gewebe". *Zbl Vet Med.* 1956.
75. Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1957 Sep 12;147(927):258-67.
76. Isaacs A, Lindenmann J, Valentine RC. Virus interference. II. Some properties of interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1957 Sep 12;147(927):268-73.
77. Lindenmann J, Burke DC, Isaacs A. Studies on the production, mode of action and properties of interferon. *Br J Exp Pathol.* 1957 Oct;38(5):551-62.
78. Lindenmann J, Isaacs A. [Research on viral interference.]. *Schweiz Z Pathol Bakteriolog.* 1957;20(5):640-6.
79. Gresser I, Bourali C. Exogenous interferon and inducers of interferon in the treatment Balb-c mice inoculated with RC19 tumour cells. *Nature.* 1969 Aug 23;223(5208):844-5.
80. Gresser I, Bourali C, Levy JP, Fontaine Brouty Be, Thomas MT. [Prolongation of the survival time of mice inoculated with tumor cells and treated with preparations of interferon]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D.* 1969 Feb 10;268(6):994-7.
81. Gresser I, Bourali C, Levy JP, Fontaine-Brouty-Boye D, Thomas MT. Increased survival in mice inoculated with tumor cells and treated with interferon preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1969 May;63(1):51-7.

82. Gresser I, Coppey J, Bourali C. Interferon and murine leukemia. VI. Effect of interferon preparations on the lymphoid leukemia of AKR mice. *J Natl Cancer Inst.* 1969 Nov;43(5):1083-9.
83. Gresser I, Fontaine-Brouty-Boye D, Bourali C, Thomas MT. A comparison of the efficacy of endogenous, exogenous, and combined endogenous-exogenous interferon in the treatment of mice infected with encephalomyocarditis virus. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1969 Jan;130(1):236-42.
84. Gresser I, Bourali C. Antitumor effects of interferon preparations in mice. *J Natl Cancer Inst.* 1970 Aug;45(2):365-76.
85. Strander H. Production of interferon in serum-free human leukocyte suspensions. *Appl Microbiol.* 1969 Nov;18(5):810-5.
86. Strander H. Interferons and osteosarcoma. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007 Oct-Dec;18(5-6):373-80.
87. Weissmann C, Nagata S, Boll W, Fountoulakis M, Fujisawa A, Fujisawa JI, et al. Structure and expression of human IFN-alpha genes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1982 Sep 24;299(1094):7-28.
88. Sekellick MJ, Ferrandino AF, Hopkins DA, Marcus PI. Chicken interferon gene: cloning, expression, and analysis. *J Interferon Res.* 1994 Apr;14(2):71-9.
89. Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev.* 2004 Dec;202:8-32.
90. Bogdan C, Mattner J, Schleicher U. The role of type I interferons in non-viral infections. *Immunol Rev.* 2004 Dec;202:33-48.
91. Szretter KJ, Gangappa S, Belser JA, Zeng H, Chen H, Matsuoka Y, et al. Early control of H5N1 influenza virus replication by the type I interferon response in mice. *J Virol.* 2009 Jun;83(11):5825-34.
92. Finter NB. Protection of Mice by Interferon against Systemic Virus Infections. *Br Med J.* 1964 Oct 17;2(5415):981-5.

93. Spiegel M, Pichlmair A, Muhlberger E, Haller O, Weber F. The antiviral effect of interferon-beta against SARS-coronavirus is not mediated by MxA protein. *J Clin Virol.* 2004 Jul;30(3):211-3.
94. Koerner I, Kochs G, Kalinke U, Weiss S, Staeheli P. Protective role of beta interferon in host defense against influenza A virus. *J Virol.* 2007 Feb;81(4):2025-30.
95. Van Hoeven N, Belser JA, Szretter KJ, Zeng H, Staeheli P, Swayne DE, et al. Pathogenesis of 1918 pandemic and H5N1 influenza virus infections in a guinea pig model: antiviral potential of exogenous alpha interferon to reduce virus shedding. *J Virol.* 2009 Apr;83(7):2851-61.
96. Kugel D, Kochs G, Obojes K, Roth J, Kobinger GP, Kobasa D, et al. Intranasal administration of alpha interferon reduces seasonal influenza A virus morbidity in ferrets. *J Virol.* 2009 Apr;83(8):3843-51.
97. Billiau A. Interferons: the pathways of discovery. II. Immunomodulatory, in vivo and applied aspects. *J Clin Virol.* 2007 Aug;39(4):241-65.
98. Sick C, Schultz U, Staeheli P. A family of genes coding for two serologically distinct chicken interferons. *J Biol Chem.* 1996 Mar 29;271(13):7635-9.
99. Digby MR, Lowenthal JW. Cloning and expression of the chicken interferon-gamma gene. *J Interferon Cytokine Res.* 1995 Nov;15(11):939-45.
100. Weining KC, Schultz U, Munster U, Kaspers B, Staeheli P. Biological properties of recombinant chicken interferon-gamma. *Eur J Immunol.* 1996 Oct;26(10):2440-7.
101. Schultz U, Kaspers B, Staeheli P. The interferon system of non-mammalian vertebrates. *Dev Comp Immunol.* 2004 May 3;28(5):499-508.
102. Karpala AJ, Morris KR, Broadway MM, McWaters PG, O'Neil TE, Goossens KE, et al. Molecular cloning, expression, and characterization of chicken IFN -lambda. *J Interferon Cytokine Res.* 2008 Jun;28(6):341-50.

103. Lowenthal JW, Staeheli P, Schultz U, Sekellick MJ, Marcus PI. Nomenclature of avian interferon proteins. *J Interferon Cytokine Res.* 2001 Jul;21(7):547-9.
104. Kaiser P, Sonnemans D, Smith LM. Avian IFN-gamma genes: sequence analysis suggests probable cross-species reactivity among galliforms. *J Interferon Cytokine Res.* 1998 Sep;18(9):711-9.
105. Suresh M, Karaca K, Foster D, Sharma JM. Molecular and functional characterization of turkey interferon. *J Virol.* 1995 Dec;69(12):8159-63.
106. Huang A, Scougall CA, Lowenthal JW, Jilbert AR, Kotlarski I. Structural and functional homology between duck and chicken interferon-gamma. *Dev Comp Immunol.* 2001 Jan;25(1):55-68.
107. Schultz U, Chisari FV. Recombinant duck interferon gamma inhibits duck hepatitis B virus replication in primary hepatocytes. *J Virol.* 1999 Apr;73(4):3162-8.
108. Schultz U, Kock J, Schlicht HJ, Staeheli P. Recombinant duck interferon: a new reagent for studying the mode of interferon action against hepatitis B virus. *Virology.* 1995 Oct 1;212(2):641-9.
109. Khatri M, Sharma JM. IFN-gamma upregulation and protection by macrophage-adapted infectious bursal disease virus. *Vaccine.* 2008 Aug 26;26(36):4740-6.
110. Mo CW, Cao YC, Lim BL. The in vivo and in vitro effects of chicken interferon alpha on infectious bursal disease virus and Newcastle disease virus infection. *Avian Dis.* 2001 Apr-Jun;45(2):389-99.
111. Schultz U, Kaspers B, Rinderle C, Sekellick MJ, Marcus PI, Staeheli P. Recombinant chicken interferon: a potent antiviral agent that lacks intrinsic macrophage activating factor activity. *Eur J Immunol.* 1995 Mar;25(3):847-51.
112. Staeheli P, Sentandreu M, Pagenstecher A, Hausmann J. Alpha/beta interferon promotes transcription and inhibits replication of borna disease virus in persistently infected cells. *J Virol.* 2001 Sep;75(17):8216-23.

113. Pei J, Sekellick MJ, Marcus PI, Choi IS, Collisson EW. Chicken interferon type I inhibits infectious bronchitis virus replication and associated respiratory illness. *J Interferon Cytokine Res.* 2001 Dec;21(12):1071-7.
114. Plachy J, Weining KC, Kremmer E, Puehler F, Hala K, Kaspers B, et al. Protective effects of type I and type II interferons toward Rous sarcoma virus-induced tumors in chickens. *Virology.* 1999 Mar 30;256(1):85-91.
115. Jenkins KA, Bean AG, Lowenthal JW. Avian genomics and the innate immune response to viruses. *Cytogenet Genome Res.* 2007;117(1-4):207-12.
116. Keeler CL, Jr., Bliss TW, Lavric M, Maughan MN. A functional genomics approach to the study of avian innate immunity. *Cytogenet Genome Res.* 2007;117(1-4):139-45.
117. Brownlie R, Zhu J, Allan B, Mutwiri GK, Babiuk LA, Potter A, et al. Chicken TLR21 acts as a functional homologue to mammalian TLR9 in the recognition of CpG oligodeoxynucleotides. *Mol Immunol.* 2009 Sep;46(15):3163-70.
118. Higuchi M, Matsuo A, Shingai M, Shida K, Ishii A, Funami K, et al. Combinational recognition of bacterial lipoproteins and peptidoglycan by chicken Toll-like receptor 2 subfamily. *Dev Comp Immunol.* 2008;32(2):147-55.
119. Meade KG, Higgs R, Lloyd AT, Giles S, O'Farrelly C. Differential antimicrobial peptide gene expression patterns during early chicken embryological development. *Dev Comp Immunol.* 2009 Apr;33(4):516-24.
120. Shaughnessy RG, Meade KG, Cahalane S, Allan B, Reiman C, Callanan JJ, et al. Innate immune gene expression differentiates the early avian intestinal response between *Salmonella* and *Campylobacter*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009 Jun 21.
121. Cauthen AN, Swayne DE, Sekellick MJ, Marcus PI, Suarez DL. Amelioration of influenza virus pathogenesis in chickens attributed to the enhanced interferon-inducing capacity of a virus with a truncated NS1 gene. *J Virol.* 2007 Feb;81(4):1838-47.

122. Li Z, Jiang Y, Jiao P, Wang A, Zhao F, Tian G, et al. The NS1 gene contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses. *J Virol*. 2006 Nov;80(22):11115-23.
123. Kochs G, Koerner I, Thiel L, Kothlow S, Kaspers B, Ruggli N, et al. Properties of H7N7 influenza A virus strain SC35M lacking interferon antagonist NS1 in mice and chickens. *J Gen Virol*. 2007 May;88(Pt 5):1403-9.
124. Xing Z, Cardona CJ, Adams S, Yang Z, Li J, Perez D, et al. Differential regulation of antiviral and proinflammatory cytokines and suppression of Fas-mediated apoptosis by NS1 of H9N2 avian influenza virus in chicken macrophages. *J Gen Virol*. 2009 May;90(Pt 5):1109-18.
125. Sarmiento L, Afonso CL, Estevez C, Wasilenko J, Pantin-Jackwood M. Differential host gene expression in cells infected with highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses. *Vet Immunol Immunopathol*. 2008 Oct 15;125(3-4):291-302.
126. Bernasconi D, Schultz U, Staeheli P. The interferon-induced Mx protein of chickens lacks antiviral activity. *J Interferon Cytokine Res*. 1995 Jan;15(1):47-53.
127. Ko JH, Jin HK, Asano A, Takada A, Ninomiya A, Kida H, et al. Polymorphisms and the differential antiviral activity of the chicken Mx gene. *Genome Res*. 2002 Apr;12(4):595-601.
128. Reemers SS, van Haarlem DA, Groot Koerkamp MJ, Vervelde L. Differential gene-expression and host-response profiles against avian influenza virus within the chicken lung due to anatomy and airflow. *J Gen Virol*. 2009 Sep;90(Pt 9):2134-46.
129. Kaaden OR, Lange S, Stiburek B. Establishment and characterization of chicken embryo fibroblast clone LSCC-H32. *In Vitro*. 1982 Oct;18(10):827-34.

130. Zoller B, Redman-Muller I, Nanda I, Guttenbach M, Dosch E, Schmid M, et al. Sequence comparison of avian interferon regulatory factors and identification of the avian CEC-32 cell as a quail cell line. *J Interferon Cytokine Res.* 2000 Aug;20(8):711-7.
131. Schwarz H, Harlin O, Ohnemus A, Kaspers B, Staeheli P. Synthesis of IFN-beta by virus-infected chicken embryo cells demonstrated with specific antisera and a new bioassay. *J Interferon Cytokine Res.* 2004 Mar;24(3):179-84.
132. Stamm A. Entwicklung eines Enzyme-linked Immunosorbent Assay zum quantitativen Nachweis von Hühner-Interferon unter Verwendung monoklonaler Antikörper: LMU München; 1997.
133. Klopffleisch R, Wolf PU, Uhl W, Gerst S, Harder T, Starick E, et al. Distribution of lesions and antigen of highly pathogenic avian influenza virus A/Swan/Germany/R65/06 (H5N1) in domestic cats after presumptive infection by wild birds. *Vet Pathol.* 2007 May;44(3):261-8.
134. Weber S, Harder T, Starick E, Beer M, Werner O, Hoffmann B, et al. Molecular analysis of highly pathogenic avian influenza virus of subtype H5N1 isolated from wild birds and mammals in northern Germany. *J Gen Virol.* 2007 Feb;88(Pt 2):554-8.
135. Kreibich A, Stech J, Mettenleiter TC, Stech O. Simultaneous one-tube full-length amplification of the NA, NP, M, and NS genes of influenza A viruses for reverse genetics. *J Virol Methods.* 2009 Aug;159(2):308-10.
136. Stech J, Stech O, Herwig A, Altmeyen H, Hundt J, Gohrbandt S, et al. Rapid and reliable universal cloning of influenza A virus genes by target-primed plasmid amplification. *Nucleic Acids Res.* 2008 Dec;36(21):e139.
137. Finter NB, Chapman S, Dowd P, Johnston JM, Manna V, Sarantis N, et al. The use of interferon-alpha in virus infections. *Drugs.* 1991 Nov;42(5):749-65.

138. Sekellick MJ, Carra SA, Bowman A, Hopkins DA, Marcus PI. Transient resistance of influenza virus to interferon action attributed to random multiple packaging and activity of NS genes. *J Interferon Cytokine Res.* 2000 Nov;20(11):963-70.
139. Marcus PI, van der Heide L, Sekellick MJ. Interferon action on avian viruses. I. Oral administration of chicken interferon-alpha ameliorates Newcastle disease. *J Interferon Cytokine Res.* 1999 Aug;19(8):881-5.
140. Yang LM, Xue QH, Sun L, Zhu YP, Liu WJ. Cloning and characterization of a novel feline IFN-omega. *J Interferon Cytokine Res.* 2007 Feb;27(2):119-27.
141. Schumacher B, Bernasconi D, Schultz U, Staeheli P. The chicken Mx promoter contains an ISRE motif and confers interferon inducibility to a reporter gene in chick and monkey cells. *Virology.* 1994 Aug 15;203(1):144-8.
142. Marcus PI, Svitlik C, Sekellick MJ. Interferon induction by viruses. X. A model for interferon induction by Newcastle disease virus. *J Gen Virol.* 1983 Nov;64 (Pt 11):2419-31.
143. Guha-Thakurta N, Majde JA. Early induction of proinflammatory cytokine and type I interferon mRNAs following Newcastle disease virus, poly [rI:rC], or low-dose LPS challenge of the mouse. *J Interferon Cytokine Res.* 1997 Apr;17(4):197-204.
144. Jestin V, Cherbonnel M. Interferon-induction in mouse spleen cells by the Newcastle disease virus (NDV) HN protein. *Ann Rech Vet.* 1991;22(4):365-72.
145. Kandefler-Szerszen M. Interferon production in leukocytes of spotted sousliks--effect of hibernation on the interferon response in vitro. *J Interferon Res.* 1988 Feb;8(1):95-103.
146. Novak R, Ester K, Savic V, Sekellick MJ, Marcus PI, Lowenthal JW, et al. Immune status assessment by abundance of IFN-alpha and IFN-gamma mRNA in chicken blood. *J Interferon Cytokine Res.* 2001 Aug;21(8):643-51.

147. Perozo F, Villegas P, Dolz R, Afonso CL, Purvis LB. The VG/GA strain of Newcastle disease virus: mucosal immunity, protection against lethal challenge and molecular analysis. *Avian Pathol.* 2008 Jun;37(3):237-45.
148. Takada A, Kida H. Protective immune response of chickens against Newcastle disease, induced by the intranasal vaccination with inactivated virus. *Vet Microbiol.* 1996 May;50(1-2):17-25.
149. Van Reeth K. Cytokines in the pathogenesis of influenza. *Vet Microbiol.* 2000 May 22;74(1-2):109-16.
150. Tsumura H, Komada H, Ito Y, Shimura K. In vitro and in vivo interferon production in NOD mice. *Lab Anim Sci.* 1989 Nov;39(6):575-8.
151. Dalod M, Salazar-Mather TP, Malmgaard L, Lewis C, Asselin-Paturel C, Briere F, et al. Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo. *J Exp Med.* 2002 Feb 18;195(4):517-28.
152. Eloranta ML, Sandberg K, Ricciardi-Castagnoli P, Lindahl M, Alm GV. Production of interferon-alpha/beta by murine dendritic cell lines stimulated by virus and bacteria. *Scand J Immunol.* 1997 Sep;46(3):235-41.
153. Garcia-Sastre A, Egorov A, Matassov D, Brandt S, Levy DE, Durbin JE, et al. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology.* 1998 Dec 20;252(2):324-30.
154. Jarosinski KW, Jia W, Sekellick MJ, Marcus PI, Schat KA. Cellular responses in chickens treated with IFN-alpha orally or inoculated with recombinant Marek's disease virus expressing IFN-alpha. *J Interferon Cytokine Res.* 2001 May;21(5):287-96.
155. Mordstein M, Kochs G, Dumoutier L, Renauld JC, Paludan SR, Klucher K, et al. Interferon-lambda contributes to innate immunity of mice against influenza A virus but not against hepatotropic viruses. *PLoS Pathog.* 2008;4(9):e1000151.

156. Glue P, Fang JW, Rouzier-Panis R, Raffanel C, Sabo R, Gupta SK, et al. Pegylated interferon-alpha2b: pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data. Hepatitis C Intervention Therapy Group. *Clin Pharmacol Ther.* 2000 Nov;68(5):556-67.
157. Hayman A, Comely S, Lackenby A, Hartgroves LC, Goodbourn S, McCauley JW, et al. NS1 proteins of avian influenza A viruses can act as antagonists of the human alpha/beta interferon response. *J Virol.* 2007 Mar;81(5):2318-27.
158. Fernandez-Sesma A. The influenza virus NS1 protein: inhibitor of innate and adaptive immunity. *Infect Disord Drug Targets.* 2007 Dec;7(4):336-43.
159. Scheiblaue H, Kendal AP, Rott R. Pathogenicity of influenza A/Seal/Mass/1/80 virus mutants for mammalian species. *Arch Virol.* 1995;140(2):341-8.

## **X Liste der verwendeten Geräte und Materialien**

### **1. Kühlschränke**

Liebherr KGK 3583-1

Liebherr Profiline FKS 3600

Liebherr Profiline FKS 2600

Liebherr Profiline FKv 4310

Liebherr CUNesf 3513 Comfort Kühl-Gefrierschrank

### **2. Gefrierschränke**

Bosch GSN 32A20

Liebherr CUNesf 3513 Comfort Kühl-Gefrierschrank

### **3. Sterilwerkbänke**

Nunc Microflow Biological Safety Cabinet Klasse 2

Heroes Laminar TL 2448

BDK Lamina Flow Sicherheitswerkbank BDK-SK-1200

### **4. Abzüge**

Arge Laborabzüge EN 14175

### **5. CO<sub>2</sub>-Inkubatoren**

Heraeus HeraCell CO<sub>2</sub>-Inkubator

Nunc Galaxy R CO<sub>2</sub>-Inkubator

Nunc CO<sub>2</sub>-Inkubator SNW 300 TVBB

Sanyo CO<sub>2</sub>-Inkubator MCO-20 AIC

Sanyo CO<sub>2</sub>-Inkubator MCO-5AC

**6. Zentrifugen**

Beckmann Zentrifuge Modell Tj-6

Beckmann Zentrifuge GS-6KR

Sigma 4K15C Tischzentrifuge

Heraeus Christ Minifuge 2

Eppendorf Centrifuge 5415R

Roth Micro Centrifuge Modell SD 220 VAC

**7. Vortexer**

IKA Works Vortexer MS2S8 Minishaker

Vortexer Genius 2 G560-E

Neolab Vortex Mixer 7-2020

**8. Wasserbäder**

GFL Inkubations- /Inaktivierungswasserbad 1004

**9. Mikroskope**

Will Wetzlar Wilovert

Leitz Wetzlar Ortholux

**10. Pipetten**

Hirschmann Laborgeräte Pipettus akku

Gilson P1000

Gilson P200

Gilson P100

Gilson P20

Gilson P10

**11. Absaugpumpe**

Haep Labor Consult-AF 204

**12. Waagen**

Mettler PC 2200

Mettler AE 100

**13. Homogenisatoren**

Qiagen Tissue Lyser II

Jahnke+Kunkel Ultra Turrax TP18/10

**14. Meßgeräte**

Berthold Lumat LB 9501

Glomax 96 Micoplate Luminometer

pH-Meter Sartorius PB-11

**15. Sonstige**

Thermo Scientific Varioklav EC

Plattenschüttler DSG Titertek 4

Zählkammer nach Neubauer

Reinstwasseranlage Sartorius arum 611VF

**16. Verbrauchsmaterialien**

0,5ml Reagiergefäß (Sarstedt, 72.704)

1,5ml Reagiergefäß (Sarstedt, 72.706)

2ml Reagiergefäß (Sarstedt, 72.695)

5ml Snap-Cups (Greiner Bio One, 184261)

15ml Schraubröhren (Sarstedt, 62.554.502)

- 50ml Schraubröhren (Sarstedt, 62.547.254)
- Reagenz- und Zentrifugenröhre (Sarstedt, 55.476)
- Li-Heparin-Röhrchen 2ml (Sarstedt, 41.1393.005)
- Kryo-Röhrchen (Nunc, 375418)
- Zellkulturschalen mittel (Nunc, 150350)
- 6-Loch-Flachbodenplatten (Nunc, 140675)
- 24-Loch-Flachbodenplatten (Nunc, 142475)
- 48-Loch-Flachbodenplatten (Nunc, 167008)
- 96-Loch-Rundbodenplatten (Nunc, 163320)
- LumiTrac 200, Microplatten 96-well weiß (Greiner Bio One, 655075)
- Zellkulturflasche T25 (Nunc, 156367)
- Zellkulturflasche T75 (Nunc, 156499)
- Pipettenspitze farblos 10µl (Sarstedt, 70.1131.210)
- Pipettenspitze gelb 200µl (Sarstedt, 70.760.002)
- Pipettenspitze blau 1000µl (Sarstedt, 70.762.200)
- Biospere Filter Tips Gilson long 10µl (Sarstedt, 70.1131.210)
- Biospere Filter Tips Gilson long 20µl (Sarstedt, 70.760.213)
- Biospere Filter Tips 100µl (Sarstedt, 70.760.212)
- Biospere Filter Tips 200µl (Sarstedt, 70760211)
- Biospere Filter Tips 1250µl (Sarstedt, 70.1186.210)
- 1ml serologische Pipette (Sarstedt, 86.1251.002)
- 2ml serologische Pipette (Sarstedt, 86.1252.001)
- 5ml serologische Pipette (Sarstedt, 86.1253.001)
- 10ml serologische Pipette (Sarstedt, 86.1254.001)

25ml serologische Pipette (Sarstedt, 86.1685.001)

Kanülen (grau für Küken) 27G x 3/4" (Marmed, 711-4198)

Kanülen (rosa) 18G x 1 1/2" (Marmed, 413-180)

Kanülen (schwarz) 0,7mm x 30mm (Marmed, 711-4192)

Spritze 1ml mit Verdrängerkolben Luer (Heiland, 900-3016)

Spritze 2ml 3-teilig Luer (Heiland, 900-3302)

Spritze 5ml 3-teilig Luer (Braun, 4616057V)

Spritze 10ml 3-teilig Luer (Braun, 4616103V)

Spritze 20 ml Norm-Ject Luer (neolab, E-1500)

## XI Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Herkunft der Gensegmente des H1N1-Virus von 2009, übernommen aus [10].....</i>	<i>6</i>
<i>Abbildung 2: Schematische Darstellung der Erkennung von viralen Bestandteilen und der Signaltransduktionswege bis hin zur Aktivierung von Typ-I-Interferonen, übernommen aus [69].....</i>	<i>28</i>
<i>Abbildung 3: Schematische Darstellung der Rezeptoren und des Aktivierungsweges der verschiedenen IFN-Typen, übernommen aus [71].....</i>	<i>29</i>
<i>Abbildung 4: Übersicht über die Reaktion des Immunsystems auf das Vorhandensein von Viren, mit Hauptaugenmerk auf die Wirkung, welche die gebildeten IFN entfalten, übernommen aus [69].....</i>	<i>31</i>
<i>Abbildung 5: Titration des IFN-Standards auf CEC511-Zellen.....</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 6: Titration des IFN-Standards auf CEC511-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.....</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 7: Titration verschiedener rekombinanter Hühnerinterferone auf den Reporterzellen. ....</i>	<i>56</i>
<i>Abbildung 8: Im Diagramm dargestellt ist die spezifische Neutralisation des IFN-<math>\alpha</math> Standards (10U) durch den MAB 8A9 und das polyklonale Antiserum gegen IFN-<math>\alpha</math>.....</i>	<i>57</i>
<i>Abbildung 9: Bildung von IFN durch Milzleukozyten nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Liganden und NDV.....</i>	<i>59</i>

<i>Abbildung 10: Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der IFN-Messung nach Titration von NDV auf Milzleukozyten von 3 Hühnern. ....</i>	<i>60</i>
<i>Abbildung 11: Zeitlicher Verlauf der IFN-Bildung durch Milzleukozyten nach Infektion mit NDV. ....</i>	<i>61</i>
<i>Abbildung 12: Auf der linken Seite des Diagramms dargestellt ist die Titrationen von NDV (EID<sub>50</sub>/ml) auf CEC511-Zellen, auf der rechten Seite des Diagramms dargestellt sind die Werte des IFN-Standards (U/ml). ....</i>	<i>62</i>
<i>Abbildung 13: Auf der linken Seite des Diagramms dargestellt ist die Titration von R65-Virus (EID<sub>50</sub>/ml) auf CEC511-Zellen, auf der rechten Seite des Diagramms dargestellt sind die Werte des IFN-Standards (U/ml). ....</i>	<i>63</i>
<i>Abbildung 14: Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten der Messung zur Vitalität von Zellen nach Inkubation mit IFN und anschließender Infektion mit VSV. ....</i>	<i>64</i>
<i>Abbildung 15: Mittelwerte und Standardabweichung der IFN-Konzentration im Plasma von vier Tieren zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion.....</i>	<i>66</i>
<i>Abbildung 16: Mittelwerte und Standardabweichungen der IFN-Konzentration in der Lunge von vier Tieren pro Zeitpunkt. ....</i>	<i>67</i>
<i>Abbildung 17: Mittelwerte und Standardabweichungen der IFN-Konzentration in der Milz von vier Tieren pro Zeitpunkt. ....</i>	<i>67</i>
<i>Abbildung 18: Mittelwerte und Standardabweichungen der IFN-Konzentration in der Trachea von vier Tieren pro Zeitpunkt. ....</i>	<i>68</i>
<i>Abbildung 19: Analyse der Menge viraler RNA in den Milzen von vier Tieren je Zeitpunkt. Die Analyse erfolgte mittels semiquantitativer RT-PCR. ....</i>	<i>68</i>
<i>Abbildung 20: Mittelwerte und Standardabweichungen der IFN-Konzentration im Plasma zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion mit NDV</i>	

(n=10). .....	70
<i>Abbildung 21: Mittelwerte und Standardabweichungen der IFN-Messung zweier Gruppen von Hühnern, die Gruppen wurden danach differenziert ob ein (12h) oder zwei (12h u. 72h) IFN-Peaks auftraten. ....</i>	<i>70</i>
<i>Abbildung 22: : Mittelwerte und Standardabweichungen der IFN-Konzentration im Plasma 24h nach der Infektion mit NDV (n=5) und 24h nach der Applikation von PBS (n=3).....</i>	<i>71</i>
<i>Abbildung 23: Mittelwerte und Standardabweichungen der IFN-Konzentration in der Lungenlavageflüssigkeit 24h nach der Infektion mit NDV (n=5) und 24h nach der Applikation von PBS (n=3). ....</i>	<i>72</i>
<i>Abbildung 24: Mittelwerte der IFN-Konzentration im Plasma von drei Tieren, zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Applikation rec. chIFN.....</i>	<i>73</i>
<i>Abbildung 25: Dargestellt ist der Anteil überlebender Tiere nach Infektion mit dem R65-Virus zu den angegebenen Zeitpunkten. ....</i>	<i>74</i>
<i>Abbildung 26: Mittelwerte und Standardabweichungen der IFN-Konzentration im Plasma von fünf Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion mit R65-Virus. ....</i>	<i>76</i>
<i>Abbildung 27: Mittelwerte und Standardabweichungen der IFN-Konzentration in den Lungen von fünf Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion mit R65-Virus.....</i>	<i>76</i>
<i>Abbildung 28: Mittelwerte und Standardabweichungen der IFN-Konzentration in den Milzen von fünf Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion mit dem R65-Virus. ....</i>	<i>77</i>
<i>Abbildung 29 Messung der IFN-Konzentration in zwei Lungenproben aus dem oben beschriebenen Versuch, einmal unbehandelt, einmal mit anti-IFN-<math>\alpha</math> und einmal mit anti-IFN-<math>\beta</math> vorbehandelt. ....</i>	<i>78</i>
<i>Abbildung 30: Dargestellt ist die Überlebensrate IFN- und Kontrollprotein-behandelter Tiere nach einer Infektion mit dem R65-Virus.....</i>	<i>80</i>

- Abbildung 31: Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der IFN-Konzentration im Plasma der mit IFN vorbehandelten Tiere (n=8) und der Kontrolltiere (n=8). Die Messung erfolgte jeweils 15min nach der Applikation, welche wiederum 8h und 2h vor der Konfrontation mit dem R65-Virus und 12h danach erfolgte..... 81*
- Abbildung 32: Dargestellt sind die Überlebenskurven der Hühner der beiden behandelten Gruppen. .... 82*
- Abbildung 33: Hier dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der IFN-Konzentration im Plasma der beiden Infektionsgruppen. Zum Zeitpunkt 24h wurde dieser MW aus jeweils sieben Tieren gebildet, zu allen anderen Zeitpunkten aus jeweils vier Tieren. ... 84*
- Abbildung 34: Hier dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der IFN-Konzentration im Kleinhirn der beiden Infektionsgruppen. Zum Zeitpunkt 24h wurde dieser MW aus jeweils sieben Tieren gebildet, zu allen anderen Zeitpunkten aus jeweils vier Tieren. ... 84*
- Abbildung 35: Hier dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der IFN-Konzentration in den Milzen der beiden Infektionsgruppen. Zum Zeitpunkt 24h wurde dieser MW aus jeweils sieben Tieren gebildet, zu allen anderen Zeitpunkten aus jeweils vier Tieren. .... 85*
- Abbildung 36: Hier dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der IFN-Konzentration in den Lungen der beiden Infektionsgruppen. Zum Zeitpunkt 24h wurde dieser MW aus jeweils sieben Tieren gebildet, zu allen anderen Zeitpunkten aus jeweils vier Tieren. .... 85*

## XII Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Angaben zur Anzahl an Infektionen und Todesfällen mit dem H1N1-Virus in einzelnen Regionalbüros der WHO bis zum 30. August 2009, modifiziert übernommen von</i> <i>(<a href="http://www.who.int/csr/don/2009_09_04/en/index.html">http://www.who.int/csr/don/2009_09_04/en/index.html</a>).</i>	7
<i>Tabelle 2: Eckpunkte zur Aviären Influenza, modifiziert übernommen aus [56].</i>	21
<i>Tabelle 3: Daten zu weltweiten Ausbrüchen von HPAIV in Geflügelbeständen seit dem Jahre 1959, modifiziert übernommen aus [56].</i>	22
<i>Tabelle 4: Zeitpunkt der Erstinfektion von Geflügelbeständen mit HPAIV H5N1 im Zeitraum zwischen 12/03 und 04/06, Tabelle modifiziert übernommen aus [63].</i>	23
<i>Tabelle 5: Der OIE gemeldete Anzahl an Infektionen mit HPAIV H5N1 in Geflügelbeständen verschiedener Länder. Tabelle erstellt nach Angaben der OIE.</i> <i>(<a href="http://www.oie.int/downld/AVIAN%20INFLUENZA/Graph%20HPAI/graphs%20HPAI%2015_07_2009.pdf">http://www.oie.int/downld/AVIAN%20INFLUENZA/Graph%20HPAI/graphs%20HPAI%2015_07_2009.pdf</a>).</i>	24
<i>Tabelle 6: Daten von infizierten Wildvögeln, welche der OIE zwischen 01/2003 und 03/2006 gemeldet wurden, Tabelle modifiziert übernommen aus [63].</i>	25
<i>Tabelle 7: Übersicht über bisher nachgewiesene IFNs bei Vögeln, Tabelle übernommen aus [101], modifiziert und ergänzt.</i>	34

### **XIII Danksagung**

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernd Kaspers, für die Überlassung dieses interessanten Themas und seine fortwährende Unterstützung bei meiner Arbeit und der Anfertigung der Dissertation.

Bei Herrn Prof. Dr. Manfred Stangassinger möchte ich mich für meinen Arbeitsplatz hier im Institut bedanken.

Bei Dr. Sonja Kothlow und Dr. Susanne Schwarz bedanke ich mich für die geleistete Unterstützung und für die Einarbeitung in eine Vielzahl von Techniken.

Auch meinen Mitdoktoranden Benjamin Schusser, Ute Breithaupt, Magdalena Schumacher, Katharina Schenk-Weibhauser, Susanne Hainke, Stefan Schmieder, Julia Korte, Florian Hofmaier, Roxanne Kramer, Christina Eberhardt, Katharina Lochner, Jana Pürzel, Marie-Luise Neulen, Barbara Schreiner gilt mein Dank, für viele gemeinsame Stunden, sowohl im Labor als auch außerhalb und auch für eine Vielzahl von Eis- und Sushipausen, welche uns die Arbeit versüßt haben.

Natürlich möchte ich auch Beatrice Schaerer, Ingrid Riehl, Marina Kohn und Verena Poschenrieder, unseren „Guten Seelen“ im Labor danken für ihre geleistete Unterstützung, für ein traumhaftes Arbeitsklima und für viel Spaß bei der Arbeit.

Weiterhin danke ich unseren zahlreichen Kooperationspartnern, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Hierzu zählen PD Dr. Thomas Vahlenkamp, Dr. Jutta Veits, PD Dr. Christian Grund, Prof. Dr. Jens Teifke, Anjele Breithaupt, Katharina Brehm, Anne Carnitz und Kerstin Wink-Kruschke (FLI Riems), Prof. Dr. Peter Stäheli, Dr. Georg Kochs, Nicola Penski und Antje Reuter (Universität Freiburg), Dr. Nicolas Ruggli und Dr. Artur Summerfield (IVI Mittelhäusern).

Ich bedanke mich bei Dr. Stefan Härtle für die Berechnung der Halbwertszeit von rekombinantem Hühnerinterferon.

Hedwiga Opitz, Fritz Meggendorfer und Thomas Hoschka möchte ich für die Betreuung der Tiere an unserem Institut danken. Thorsten Arnold und Georg Bauer danke ich für die Betreuung der Tiere am Friedrich-Löffler-Institut.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Cornelia Deeg bedanke ich mich für ein Vielzahl von Ratschlägen und die nette Einläutung des Feierabends.

Frau Mayer, Frau Hignet, Frau Crass, Frau Summer und Frau Ohl gilt mein Dank für ihre Unterstützung bei allen Verwaltungsangelegenheiten.

Bei Hanna Zipplies, Jenny Dieckmann, Christian Seliger, Susanne Schwarz, Matthias Hanczaruk, Claudia Gick, Marie-Luise Neulen und Ramona Schmitt bedanke ich mich für die vielen Spieleabende, für die Treffen der „Vereinigung anonymer Griechen“ und dafür dass sie einfach immer für mich da waren.

Ich danke meinen Freunden Gunnar, Alex, Jenny und Ramona und meiner Cousine Theresa für ihre kritischen Kommentare beim Korrekturlesen meiner Dissertation und für ihre bereitwillig gewährte Unterstützung.

Bei meiner Familie möchte ich mich für den Rückhalt bedanken, für die ständigen aufbauenden Worte, für ihre Unterstützung und das mir entgegengebrachte Verständnis.