

Aus dem Institut für Immunologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Stefan Bauer
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Der Einfluss von N6-Methyladenosin auf die Replikation von Influenzaviren

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Viktoria Laukemper

aus Überlingen

Marburg, 2017

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am 07.12.2017

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. S. Bauer

1. Korreferent: Herr Dr. M. Matrosovich

Inhaltsverzeichnis

I	Abkürzungsverzeichnis	vi
II	Abbildungsverzeichnis	ix
III	Tabellenverzeichnis	xii
1	Einleitung	1
1.1	Das Immunsystem im Überblick	1
1.2	Das angeborene Immunsystem.....	2
1.3	Muster-erkennende Rezeptoren	4
1.3.1	Toll-like Rezeptoren	5
1.3.2	RIG-I-ähnliche Rezeptoren.....	7
1.3.3	Selbst-Fremd-Unterscheidung von Nukleinsäuren	9
1.4	Influenzaviren.....	11
1.4.1	Taxonomie und Struktur	11
1.4.2	Replikation	14
1.4.3	Pathogenese	16
1.4.4	Angeborene Immunantwort und Evasionsstrategien	18
1.5	RNA-Modifikationen	22
1.5.1	N6-Methyladenosin	24
1.6	Zielsetzung der Arbeit.....	29
2	Material	31
2.1	Geräte	31
2.2	Chemikalien	32
2.3	Puffer	34
2.4	Reagenzien	35
2.5	Kits.....	36
2.6	Medien	37
2.6.1	Medien für Bakterien	37
2.6.2	Medien und Zusätze für Zellkultur	37
2.7	Zellen	38

2.7.1	prokaryotische Zellen	38
2.7.2	Primäre eukaryotische Zellen	38
2.7.3	Zelllinien	38
2.8	Vektoren und rekombinante Plasmide	39
2.9	Viren	39
2.10	Nukleinsäuren und Nukleotide	39
2.10.1	Marker	39
2.10.2	DNA-Oligonukleotide für IVT	39
2.10.3	Primer	40
2.10.4	HPLC-Standards	42
2.11	Stimuli	43
2.12	Enzyme	43
2.13	Antikörper	44
2.13.1	ELISA-Antikörper	44
2.13.2	Western Blot-Antikörper	44
2.13.3	FACS-Antikörper	45
2.13.4	Antikörper für Immunfärbung	45
2.13.5	Antikörper für IP und RNA-ELISA	45
2.14	Verbrauchsmaterialien	45
2.15	Software	46
3	Methoden	47
3.1	Molekularbiologische Methoden	47
3.1.1	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	47
3.1.2	Polymerase-Kettenreaktion	47
3.1.3	Gezielte Mutagenese durch PCR	48
3.1.4	Klonierung von Gensegmenten	50
3.1.5	Transformation chemisch kompetenter E.coli	52
3.1.6	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	52
3.1.7	DNA-Sequenzierung	53
3.1.8	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	53

3.1.9	DNA-Gelextraktion	53
3.1.10	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	53
3.1.11	RNA-Isolation aus eukaryotischen Zellen.....	54
3.1.12	DNase-Behandlung von RNA.....	55
3.1.13	Reverse Transkription	55
3.1.14	Quantitative PCR (qPCR).....	56
3.1.15	<i>In vitro</i> Transkription (IVT).....	57
3.2	Methoden zur Detektion von N6-Methyladenosin in RNA	58
3.2.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC)	58
3.2.2	MeRIP-Seq	61
3.2.3	Detektion von m ⁶ A mittels ELISA	66
3.3	Proteinbiochemische Methoden	66
3.3.1	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	66
3.3.2	Herstellung von Ganzzelllysaten	68
3.3.3	BCA Protein Assay.....	68
3.3.4	SDS-PAGE	68
3.3.5	Western Blot	69
3.4	Zellkultur.....	70
3.4.1	Kultivierung von Zelllinien.....	70
3.4.2	Überprüfung der Zellkulturen auf Mycoplasmen	70
3.4.3	Arbeit mit primären Zellen	71
3.4.4	Bestimmung der Zellzahl.....	73
3.4.5	Stimulation von Zellen.....	73
3.4.6	CRISPR-Cas9.....	74
3.5	Virologische Methoden	76
3.5.1	Virusanzucht	76
3.5.2	Generierung rekombinanter Viren	78
3.5.3	Genotypisierung von Viren.....	80
3.5.4	Infektion von Zellen zur Gewinnung von Gesamt-RNA.....	82
3.5.5	Infektion von Zellen zur Herstellung von Ganzzelllysaten.....	82

3.5.6	Methoden zur Virustiterbestimmung	82
3.5.7	Wachstumsanalysen	84
3.5.8	Kompetitiver Infektionsassay.....	84
3.6	Durchflusszytometrie	85
4	Ergebnisse	87
4.1	Identifikation von m ⁶ A in Influenza mRNA durch MeRIP-Sequenzierung (1).....	87
4.2	Sequenzanalyse zur Häufigkeit des GGACT-Motivs in der A/PR/8-mRNA und zur Konservierung des Motivs in verschiedenen Influenzastämmen	90
4.3	Generierung rekombinanter Influenzaviren mit Mutationen im GGACT- Motiv.....	96
4.4	Charakterisierung der rekombinanten Viren mit Mutationen im GGACT- Motiv der HA-, NA- und NS-mRNA	98
4.4.1	Wachstumsverhalten der Viren	98
4.4.2	Wachstumsverhalten in kompetitiven Infektionsversuchen.....	101
4.4.3	Virale mRNA-Expression in CaCo2-Zellen	103
4.4.4	Expression der viralen Proteine in CaCo2-Zellen nach Infektion mit den rekombinanten Viren	104
4.4.5	Immunstimulatorische Aktivität der Viren.....	106
4.5	Charakterisierung der rekombinanten Viren mit einzelnen Mutationen im GGACT-Motiv der HA-mRNA.....	109
4.5.1	Wachstumsverhalten der Viren	109
4.5.2	Wachstumsverhalten in kompetitiven Infektionsversuchen.....	112
4.5.3	Virale mRNA-Expression in CaCo2-Zellen	114
4.5.1	Expression der viralen Proteine in CaCo2-Zellen nach Infektion mit den rekombinanten Viren	115
4.6	Identifikation von m ⁶ A in Influenza mRNA durch MeRIP-Sequenzierung (2).....	118
4.7	Einfluss der Influenzainfektion auf die m ⁶ A-assoziierten Proteine in verschiedenen Zelllinien	125
4.7.1	<i>Knockout</i> und Proteinexpression von YTHDF2 in Zelllinien	129
5	Diskussion	133

5.1	Untersuchung des Einflusses von m ⁶ A auf die Replikation von Influzaviren durch Mutation des GGACT-Motivs in der viralen mRNA.....	134
5.1.1	Der erste Versuch der Lokalisation von m ⁶ A durch MeRIP-Seq	134
5.1.2	Generierung rekombinanter Viren mit fehlender N6- Adenosinmethylierung in viraler mRNA.....	134
5.1.3	Konservierung der m ⁶ A-Sequenzmotive in verschiedenen Influzastämmen.....	135
5.1.4	Einfluss der Mutationen in den GGACT-Motiven der viralen mRNAs von NS, NA und HA auf die virale Replikation und Proteinexpression.....	137
5.1.5	Die Bedeutung von m ⁶ A für die immunstimulatorische Aktivität der Viren	140
5.2	Der Einfluss einzelner GGACT-Mutationen in der HA-mRNA auf die virale Replikation und Proteinexpression.....	141
5.3	Die Rolle der Methylierungsmaschinerie während einer Influzainfektion.....	143
5.4	Die Lokalisation von m ⁶ A in der mRNA von Influzenza.....	146
5.4.1	Vergleich der m ⁶ A-Profile zwischen dem wt-Virus und dem Virus HA _{mut1-4}	146
5.4.2	m ⁶ A in der 5'-Region der Influzenza-mRNA	149
5.4.3	m ⁶ A in der 3'-Region der Influzenza-mRNAs.....	150
5.4.4	Einordnung der bisherigen Ergebnisse in den Kontext der m ⁶ A- Lokalisation.....	151
5.5	Vergleich der Ergebnisse mit der Studie von Courtney <i>et al.</i> (2017)	153
5.6	Ausblick.....	156
6	Zusammenfassung	159
7	Summary	161
IV	Literaturverzeichnis	163
V	Anhang.....	182
VI	Verzeichnis der akademischen Lehrer	189
VII	Danksagung.....	190

I Abkürzungsverzeichnis

∞	unendlich
ADAR	<i>double-stranded RNA-specific adenosine deaminase</i>
Ak	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zelle
BSA	Bovines Serumalbumin
bp	Basenpaar
CARD	<i>caspase activation and recruitment domains</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cRNA	Komplementäre RNA
CTD	C-terminale Domäne
CTL	C-Typ-Lektin
Da	Dalton
DAMP	<i>danger associated molecular pattern</i>
DC	dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
eIF	Eukaryotischer Initiationsfaktor
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbant Assay</i>
EMCV	Encephalomyocarditisvirus
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	Fetales Kälberserum
h	hour (Stunde)
HA	Hämagglutinin
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HS	Hitzeschock
IAV	Influenza-A-Virus
IFIT	<i>interferon induced protein with tetratricopeptide repeats</i>
IFN	Interferon
IKK	IκB Kinasen
IL	Interleukin
IRAK	Interleukin-1 Rezeptor-assoziierte Kinase 1
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
ISG	IFN-stimuliertes Gen
ISRE	<i>IFN stimulated response element</i>

IκB	Inhibitor von kappaB
Jak	Januskinase
Ko	<i>Knockout</i>
LGP2	<i>laboratory of genetics and physiology 2</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>leucine rich repeats</i>
M	Matrixprotein
m ⁶ A	N6-Methyladenosin
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
MAVS	<i>mitochondrial antiviral signalling protein</i>
MBL	Mannose-bindendes Lektin
MDA5	<i>melanoma differentiation-associated antigen 5</i>
mESC	Murine embryonale Stammzelle
METTL	<i>Methyltransferase-like</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
miRNA	Mikro-RNA
mRNA	<i>messenger RNA</i>
Mx	<i>myxovirus resistance protein</i>
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NA	Neuraminidase
NF-κB	<i>nuclear factor κ B</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NLR	Nod-like Rezeptor
NLRP	<i>NOD-, LRR and pyrin domain-containing</i>
NP	Nukleoprotein
NS	Nichtstruktur-Protein
OAS	Oligoadenylatsynthetase
PA	<i>polymerase acidic protein</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PB	<i>polymerase basic protein</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS ⁺⁺	PBS mit Ca ²⁺ Mg ²⁺
PBS ^{def}	PBS ohne Ca ²⁺ Mg ²⁺
pDC	plasmazytoide dendritische Zelle
PKR	dsRNA-activated protein kinase
PRR	<i>pattern-recognition receptor</i>

PR8	Influenzastamm A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)
RIG-I	<i>retinoic acid-inducible gene 1</i>
RLR	RIG-like Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonucleoprotein
rRNA	Ribosomale RNA
RSV	Rous-Sarcoma-Virus
RT	Raumtemperatur
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
ss	einzelsträngig
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
TAK1	<i>Tat-assoziierte Kinase 1</i>
TIR	Toll/ Interleukin-1 receptor
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	<i>tumor necrosis factor receptor-associated factor</i>
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR domain-containing adaptor inducing IFNβ</i>
tRNA	Transfer-RNA
ü.N.	über Nacht
ÜS	Überstand
UTR	Untranslatierte Region
WHO	Weltgesundheitsorganisation
wt	Wildtyp
YTHDF	<i>YTH domain-containing family protein</i>
MeRIP-Seq	<i>methylated RNA immunoprecipitation sequencing</i>

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Struktureller Aufbau der RLRs.....	8
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung eines Influenza-A-Virions.....	13
Abbildung 1.3: Strukturformel von N6-Methyladenosin (m ⁶ A).	23
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Regulation von N6-Methyladenosin.....	26
Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des MeRIP-Seq.	61
Abbildung 3.2: Graphische Darstellung zur Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation.....	72
Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des 8-Plasmid-Systems nach E. Hoffmann.	78
Abbildung 4.1: Kontrolle der mRNA-Anreicherung und Fragmentierung der mRNA für MeRIP-Seq.....	88
Abbildung 4.2: Kontrolle der Spezifität des anti-m ⁶ A-Antikörpers.....	89
Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der GGACT-Motive in der cRNA des Influenzastamms PR8.	91
Abbildung 4.4: Schematische Darstellung der viralen mRNAs von HA, NA und NS mit den eingefügten Mutationen im GGACT-Motiv.....	96
Abbildung 4.5: Schematische Darstellung der Genotypen der rekombinanten PR8-Viren und ihre Bezeichnungen.....	98
Abbildung 4.6: Wachstumsanalysen mit den rekombinanten Viren NS _{mut1-2} , NA _{mut1-3} , HA _{mut1-4} , [HA/NA] _{mut} und [NS/HA/NA] _{mut}	100
Abbildung 4.7: Wachstumsverhalten der Viren NS _{mut1-2} , NA _{mut1-3} , HA _{mut1-4} , [HA/NA] _{mut} und [NS/HA/NA] _{mut} in kompetitiven Infektionsversuchen mit dem wt-Virus.....	102
Abbildung 4.8: Quantifizierung der viralen HA-mRNA-Expression während einer Influenzainfektion in CaCo2-Zellen.....	103
Abbildung 4.9: Expression der viralen Proteine HA und M in CaCo2-Zellen nach Infektion mit den verschiedenen rekombinanten Viren.....	105

Abbildung 4.10: Quantifizierung der infektiösen Partikel im Zellüberstand der für die Western Blot-Analyse infizierten CaCo2-Zellen.....	106
Abbildung 4.11: Infektion humaner pDCs mit den verschiedenen rekombinanten Viren und Messung der IFN-α-Sekretion.	108
Abbildung 4.12: Schematische Darstellung der Genotypen der rekombinanten PR8-Viren mit Einzelmutationen im HA und ihre Bezeichnungen.	109
Abbildung 4.13: Wachstumsanalysen mit den rekombinanten Viren HA_{mut1-4}, HA_{mut1}, HA_{mut2}, HA_{mut3} und HA_{mut4}.	111
Abbildung 4.14: Wachstumsverhalten der Viren HA_{mut1-4}, HA_{mut1}, HA_{mut2}, HA_{mut3} und HA_{mut4} in kompetitiven Infektionsversuchen mit dem wt-Virus.....	113
Abbildung 4.15: Quantifizierung der viralen HA-mRNA-Expression während einer Influenzainfektion in CaCo2-Zellen.....	114
Abbildung 4.16: Expression der viralen Proteine HA und M in CaCo2-Zellen nach Infektion mit den verschiedenen HA-Einzelmutanten.	116
Abbildung 4.17: Quantifizierung der infektiösen Partikel im Zellüberstand der für die Western Blot-Analyse infizierten CaCo2-Zellen.....	117
Abbildung 4.18: Qualitätskontrollen für die NGS-Analyse am Beispiel der RNA aus den mit wt-Virus infizierten CaCo2-Zellen.	119
Abbildung 4.19: Grafische Darstellung der detektierten m⁶A-Positionen in den mRNAs des PR8-Virus.....	121
Abbildung 4.20: Vergleich der detektierten m⁶A-Positionen in den mRNAs des HA-Segments vom wt-Virus und dem Virus HA_{mut1-4}.	123
Abbildung 4.21: Quantifizierung der mRNAs von METTL3, METTL14, FTO, AlkBH5, YTHDF1 und YTHDF2 in A549- und CaCo2-Zellen während einer Influenzainfektion.....	127
Abbildung 4.22: Quantifizierung der YTHDF2- und IFIT1-mRNA in IFN- behandelten A549-Zellen.	129
Abbildung 4.23: YTHDF2-Expression in den CaCo2 YTHDF2-CRISPR-Cas- Zellen im Vergleich mit HeLa-Zellen und humanen PBMCs.....	130
Abbildung 4.24: YTHDF2-Expression in verschiedenen humanen Zelllinien.	131

Abbildung 4.25: YTHDF2-Expression von Influenza-infizierten CaCo2- und Calu3-Zellen.....	132
Abbildung 5.1: Vergleich der m⁶A-Positionen in der HA-mRNA des wt-Virus mit der m⁶A-Kartierung von Courtney <i>et al.</i> (2017).	156

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TLRs und ihre Liganden.....	7
Tabelle 2: Sequenzanalyse zur Konservierung der m⁶A-Motive in den Segmenten HA, NA und NS.	93
Tabelle 3: Sequenzanalyse zur Konservierung der m⁶A-Motive in den Segmenten HA, NA und NS bei gleicher Aminosäuresequenz im Vergleich zum PR8-Virus.....	95
Tabelle 4: Tabellarische Darstellung der m⁶A-Peakpositionen und der Sequenzen unter den Peaks.....	125

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem im Überblick

Das Wort *Immunität* leitet sich vom lateinischen Wort *immunis* ab, welches „frei, verschont sein“ bedeutet. Im medizinischen Kontext bezeichnet es die Unempfindlichkeit eines Organismus gegenüber infektiösen Erregern und schädlichen Substanzen, denen unser Körper über die Atemwege, die Haut und den Verdauungstrakt ständig ausgesetzt ist. Auch körpereigene Veränderungen können die Unversehrtheit des Organismus gefährden und müssen kontrolliert werden. Die Herstellung und Aufrechterhaltung dieses Schutzes ist die Aufgabe des Immunsystems, welches sich aus einem interaktiven Netzwerk aus Organen, Zellen und Molekülen zusammensetzt.

Das Immunsystem kann anhand der Schnelligkeit und Spezifität der Reaktionen in zwei Teile untergliedert werden: das angeborene und das adaptive bzw. erworbene Immunsystem.

Das angeborene Immunsystem stellt die erste, schnelle Verteidigungslinie gegen Pathogene dar, die zunächst durch die chemischen, physikalischen und mikrobiellen Barrieren der Haut und Mukosa an der Invasion gehindert werden. Die Aktivierung des angeborenen Immunsystems, welches sich aus Zellen und humoralen Faktoren zusammensetzt, erfolgt über eine Vielzahl von Keimbahn-codierten Rezeptoren, den sogenannten *pattern recognition receptors* (PRR). Diese erkennen hochkonservierte Strukturen von Pathogenen oder geschädigten Zellen und werden auf der Zelloberfläche, im Zytoplasma oder in endosomalen Strukturen exprimiert. Durch die Erkennung pathogener Strukturen wird zum einen eine Entzündungsreaktion herbeigeführt, die das Pathogen in den meisten Fällen bereits eliminieren kann, zum anderen wird gleichzeitig das adaptive Immunsystem aktiviert. (Hoffmann und Akira 2013) Die adaptive Immunität setzt zeitlich verzögert ein. Dafür besitzt sie im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem ein nahezu unbegrenztes Spektrum an spezifischen Erkennungsrezeptoren. Die hochspezifischen Rezeptoren für die Antigenerkennung befinden sich auf den Zellen des adaptiven Immunsystems, den Lymphozyten. Diese werden in B- und T-Lymphozyten unterteilt. Menschliche B-Zellen reifen im Knochenmark und differenzieren bei Aktivierung zu Plasmazellen, die große Mengen Immunglobuline produzieren. T-Zellen hingegen reifen im Thymus und werden durch Peptide von Pathogenen aktiviert, die auf speziellen Oberflächenmolekülen, den *major histocompatibility complex* (MHC)-Molekülen, präsentiert werden. Man unterscheidet dabei anhand von Funktion und Struktur MHC-Moleküle der Klassen I

und II. MHC-I-Moleküle werden, mit Ausnahme von Erythrozyten, auf allen Körperzellen exprimiert, während die Expression von MHC-II auf professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC) beschränkt ist. Die große Vielfalt der B- und T-Zellrezeptoren wird durch das Prinzip der somatischen Rekombination ermöglicht. Ihre Gene codieren nicht für fertige Rezeptoren, sondern bestehen aus Genelementen, die im Laufe der Zellentwicklung in einem irreversiblen Prozess miteinander kombiniert werden. Durch die Vielzahl der Möglichkeiten bei der Rekombination kann mit einem limitierten Genmaterial ein nahezu unendliches Repertoire an Antigenerkennungsrezeptoren geschaffen werden. Dieser zufallsgesteuerte Prozess hat zur Folge, dass sich auch Zellen mit Rezeptorspezifitäten für körpereigene Antigene entwickeln. Diese werden jedoch bereits während der Zellreifung eliminiert, um eine Autoimmunreaktion zu verhindern. Am Ende dieses Selektionsprozesses verlässt nur ein geringer Teil der Zellen den Thymus bzw. das Knochenmark als reife Lymphozyten. Binden diese Zellen an ihr spezifisches Antigen in den sekundären lymphatischen Organen, beginnt ihre Proliferation und Differenzierung zu Effektorzellen. Diese Klone der Antigen-spezifischen B- und T-Lymphozyten haben bestimmte Funktionen, die zu der Eliminierung des Pathogens durch das Immunsystems beitragen. Zudem entwickelt sich ein Teil der Effektorzellen zu spezifischen Gedächtniszellen, die im Falle eines erneuten Kontakts mit dem gleichen Antigen eine schnellere Immunantwort ermöglichen. (Murphy 2012; Schütt und Bröker 2011)

1.2 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist der evolutionär ältere Teil des Immunsystems und lässt sich in seinen Grundprinzipien bereits in einfachen mehrzelligen Organismen finden. Es besteht aus verschiedenen Abwehrmechanismen: die erste Barriere stellt das Haut- und Schleimhautsystem dar. Die Zell-Zell-Kontakte der Epithelzellen, sowie der saure pH-Wert und die Sekretion antimikrobieller Peptide und Enzyme verhindern das Eindringen von Fremdkörpern und Pathogenen. Wird die epitheliale Barriere dennoch überwunden, stehen Zellen des angeborenen Immunsystems zur Verfügung, die verschiedene Funktionen bei der Immunabwehr übernehmen. Besonders wichtig dabei sind die im Gewebe vorhandenen Makrophagen. Durch Phagozytose nehmen sie Infektionserreger auf, welche durch Fusion der Phagosomen mit dem Lysosom abgetötet werden. (Murphy 2012) Die Immunreaktion wird dabei vor allem durch die Erkennung sogenannter *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) durch die PRR eingeleitet. Zu den PAMPs zählen unter anderem Peptidoglycan und Lipopolysaccharid aus der Zellwand von Bakterien sowie bakterielle und virale

Nukleinsäuren. Durch die Bindung dieser Strukturen an die PRR werden die Zellen aktiviert und sezernieren daraufhin proinflammatorische Zytokine und Chemokine, wie IL-6, IL-1 β und CXCL8, die eine Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe induzieren. Durch Phagozytose und Freisetzung weiterer Entzündungsmediatoren, Sauerstoffradikalen und antimikrobieller Peptide tragen sie zu einer Eliminierung der Infektion bei. (Beutler 2009; Ishii *et al.* 2008) Durch Veränderungen in den Endothelzellen wird außerdem eine Gefäßerweiterung, eine verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen und eine erhöhte Gefäßpermeabilität induziert. Dadurch wird die Extravasation weiterer Immunzellen, wie Granulozyten und Monozyten, sowie der Transport weiterer Effektormoleküle in das betroffene Gewebe erleichtert und so die Eliminierung des Pathogens sowie die Reparatur des geschädigten Gewebes gefördert (Imhof und Aurrand-Lions 2004; Ley *et al.* 2007). Ebenfalls zum angeborenen Immunsystem zählt das Komplementsystem, welches aus verschiedenen, löslichen Serumproteinen besteht. Durch Antigen-Antikörper-Komplexe oder Pathogenstrukturen wird eine Enzymkaskade ausgelöst, in deren Verlauf biologisch-aktive Spaltprodukte entstehen, welche zu einer Opsonierung und damit verstärkten Phagozytose von Pathogenen beitragen. Außerdem wird der sogenannte Membranangriffskomplex gebildet, der Poren in der Zellmembran bildet und so seine Zielzelle lysiert. (Schütt und Bröker 2011). Parallel zu den entzündlichen Prozessen wird die adaptive Immunantwort induziert, wobei dendritische Zellen (DC) eine Schlüsselrolle spielen. DCs befinden sich in verschiedenen Geweben, wo sie durch Makropinozytose ständig Substanzen aus ihrer Umgebung aufnehmen. Werden sie durch ein Antigen aktiviert, migrieren sie über die Lymphbahnen in die Lymphknoten, wo sie die Antigene über MHC-Moleküle auf ihrer Oberfläche präsentieren. Zusammen mit Zytokinen und kostimulatorischen Molekülen bewirken sie eine Aktivierung der Lymphozyten. (Banchereau *et al.* 2000) DCs gehören damit, zusammen mit B-Zellen und Makrophagen, zu den sogenannten professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APC).

Ein Subtyp der DCs sind die plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs). Nach ihrer Entwicklung im Knochenmark zirkulieren sie im Blut und wandern in periphere Gewebe und in die sekundären lymphatischen Organe ein. Werden sie durch die Erkennung von fremden Nukleinsäuren aktiviert, produzieren sie große Mengen an IFN α , welches einen antiviralen Status in den Nachbarzellen induziert und die virale Replikation in bereits infizierten Zellen einschränkt (McNab *et al.* 2015; Swiecki und Colonna 2015). Dieser antivirale Status ist durch die Expression bestimmter Proteine charakterisiert, darunter RNase L, ADAR1 und PKR, welche durch RNA-Veränderungen

und -Degradation sowie Translationsinhibition zu einer Einschränkung der Virusausbreitung beitragen (Bowie und Unterholzner 2008).

Durch die unterschiedlichen Zelltypen und ihre PRR ist das angeborene Immunsystem in der Lage, verschiedene Infektionserreger zu erkennen und den Organismus vor Schäden zu schützen. Damit eine Immunantwort nicht zu einer Schädigung des Organismus selbst führt, ist eine genaue Unterscheidung zwischen körpereigenen und -fremden Strukturen essentiell.

1.3 Muster-erkennende Rezeptoren

Die Erkennung mikrobieller Strukturen ist ein zentrales Element der angeborenen Immunität und wird, wie bereits erwähnt, durch eine Vielzahl von Muster-erkennenden Rezeptoren, den PRRs, ermöglicht. Diese erkennen evolutionär konservierte Strukturen von Bakterien, Pilzen, Viren und Parasiten und induzieren über verschiedene Signalkaskaden eine Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen sowie die Expression kostimulatorischer Moleküle (Ishii *et al.* 2008). Damit sind sie ein wichtiger Teil der ersten Verteidigungslinie gegen Pathogene. Neben körperfremden Strukturen können auch körpereigene Bestandteile zu einer Aktivierung von PRRs führen. Sogenannte *damage associated molecular patterns* (DAMPs) werden von sterbenden oder entarteten Zellen freigesetzt und führen ebenfalls zu einer Entzündungsreaktion, welche den Organismus vor Schädigungen durch körpereigene Prozesse schützt (Bianchi 2007).

Im Gegensatz zu den Rezeptoren der erworbenen Immunität werden PRRs nicht durch somatische Rekombination generiert, sondern sind in der Keimbahn codiert. PRR können anhand ihrer Lokalisation und Funktion in verschiedene Klassen eingeteilt werden. Sie können membrangebunden vorliegen, im Zytoplasma gelöst sein, oder in sezernierter Form vorliegen. Zu den sezernierten PRR gehört das Mannose-bindende Lektin (Lamblin *et al.*), welches hauptsächlich eine Opsonisierung von Pathogenen und eine Aktivierung des Komplementsystems bewirkt. Zu den Membran-gebundenen PRRs zählen zum einen die C-Typ-Lektine (CTLs) und Scavenger-Rezeptoren, die auf Makrophagen, DCs und Neutrophilen die Phagozytose der gebundenen Partikel vermitteln, und zum anderen die *Toll-like* Rezeptoren (TLRs), die auf der Zelloberfläche oder im Endosom Signalwege einleiten, die die Expression bestimmter Effektormoleküle induzieren (Brubaker *et al.* 2015; Murphy 2012). Der chemotaktische fMet-Leu-Phe-Rezeptor auf Makrophagen und DCs bindet an mikrobielle Polypeptide und führt zu einer Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zum Ort der Infektion. Die zytoplasmatischen, signalgebenden Rezeptoren können weiter in verschiedene Gruppen unterteilt werden: die *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I) *like receptors*

(RLRs), die *nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) like receptors (NLRs)* und die *absent in melanoma like receptors (ALRs)*. NLRs detektieren vor allem bakterielle Bestandteile und DAMPs und können daraufhin verschiedene Signalwege aktivieren. NOD1 und NOD2 erkennen Bestandteile des Peptidoglycans und aktivieren den Transkriptionsfaktor NFκB, sodass proinflammatorische Zytokine freigesetzt werden. NALP1 und NALP3 dagegen werden auch durch Bindung von Substanzen aktiviert, die bei einer Zellschädigung freigesetzt werden, und induzieren eine Aktivierung der Caspase-1, was zu einer Aktivierung des Inflammasoms beiträgt. RLRs führen vor allem zu einer antiviralen Antwort, die durch die Bindung viraler Nukleinsäurestrukturen ausgelöst wird. Sie vermitteln die Induktion von antiviralen Typ-I-Interferonen. Die ALRs, zu denen die Rezeptoren AIM2 und IFIT16 gehören, erkennen intrazelluläre DNA und vermitteln, ebenso wie die NLRs eine Aktivierung des Inflammasoms und die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine. (Brubaker *et al.* 2015; Creagh und O'Neill 2006)

1.3.1 Toll-like Rezeptoren

Die TLRs zählen zu den am besten charakterisierten PRRs und sie erkennen ein breites Spektrum an PAMPs. Ihre Entdeckung erfolgte im Jahr 1997 bei der Suche nach einem Säugetierhomolog des Proteins Toll, welches in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* an der Abwehr von Infektionen beteiligt ist (Lemaitre *et al.* 1996; Medzhitov *et al.* 1997). Mittlerweile wurden in Säugetieren 13 verschiedene TLRs identifiziert, wobei die TLRs 1-10 im menschlichen System exprimiert werden, die TLRs 1-9 sowie 11-13 im murinen System (Brubaker *et al.* 2015). TLRs erkennen Strukturen aus Bakterien, Viren, Pilzen, Parasiten und Mycoplasmen und können von verschiedenen Immunzellen, aber auch von Epithelzellen verschiedener Organe exprimiert werden. Man findet sie entweder auf der Zelloberfläche oder in intrazellulären Vesikeln, wie dem Endosom, dem Lysosom oder dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) (s. Tabelle 1). TLRs gehören zu den Typ-I-Transmembranglykoproteinen und bestehen aus einer N-terminalen extrazellulären Domäne aus *leucine rich repeats (LRRs)*, einer Transmembrandomäne und einer Toll-IL-1 Rezeptor (TIR)-Domäne, die für die Aktivierung von Signalwegen verantwortlich ist (Kumar *et al.* 2009). Durch Bindung ihres Liganden formen die Komplexe Homo- oder Heterodimere mit andern TLRs, deren Struktur sich als essentiell für die weitere Signaltransduktion herausgestellt hat (Jin und Lee 2008). So bildet TLR2 vor allem Heterodimere mit TLR1 und -6, wobei der TLR-Bindungspartner sowie beteiligte Corezeptoren, wie CD14 und CD36, die Ligandenspezifität und Funktion des Rezeptorkomplexes beeinflussen (Brubaker *et al.* 2015). Dieses Prinzip ermöglicht die

Erkennung eines relativ breiten Spektrums an PAMPs durch einen einzelnen Rezeptorkomplex. Die Liganden-induzierte Dimerisierung der TIR-Domäne führt anschließend zu einer Rekrutierung von verschiedenen intrazellulären Adaptormolekülen, welche ebenfalls eine TIR-Domäne enthalten. Das Protein MyD88 wird dabei von allen TLRs, mit Ausnahme des TLR3, genutzt. Während die meisten TLRs MyD88 direkt rekrutieren können, benötigen TLR2 und TLR4 dafür zusätzlich das Adaptormolekül TIRAP. MyD88 führt zu einer Rekrutierung und Aktivierung verschiedener Kinasen, darunter IRAK-Kinasen, TRAF6, TAK1 und I κ B-Kinasen, die letztlich die Phosphorylierung des inhibitorischen Faktors *inhibitor of κ B* (I κ B) vermitteln. Dieser wird dadurch degradiert und entlässt den Transkriptionsfaktor NF κ B, der daraufhin in den Kern transloziert, wo er die Induktion proinflammatorischer Zytokine, wie TNF α , IL-6 und IL-1 β , Chemokine und kostimulatorischer Moleküle vermittelt. MyD88-abhängige Signalwege können zudem auch IRF7 aktivieren und so zu einer Produktion von Typ-I-IFN führen. Die Expression von IRF7 ist in den meisten Zellen jedoch gering und wird erst durch eine Stimulation mit Typ-I-IFN erhöht (Kawai und Akira 2008). TLR3 und TLR4 sind in der Lage, über einen MyD88-unabhängigen Signalweg die Transkription von antiviralen Typ-I-Interferonen zu aktivieren. Dafür wird das Adaptormolekül TRIF rekrutiert, wobei im Falle des TLR4 zusätzlich das Molekül TRAM benötigt wird, welches die TIR-Domäne mit TRIF verbindet. TRIF interagiert anschließend mit TRAF3, welches die induzierbaren-I κ B-Kinasen (IKKi) aktiviert, die an der Aktivierung von IRF3 und IRF7 beteiligt sind, sodass Interferon-induzierte Gene transkribiert werden. Des Weiteren induziert TRIF über die Kinasen TRAF6, RIP1 und TAK1 die Translokation von NF κ B in den Kern und damit die Sekretion proinflammatorischer Zytokine. Während TLR3 allein den TRIF-abhängigen Signalweg induzieren kann, ist TLR4 in der Lage, NF κ B sowohl über den TRIF- als auch den MyD88-abhängigen Signalweg zu aktivieren.

Wie bereits erwähnt, spielen pDCs eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Virusinfektion, indem sie nach Aktivierung durch TLR-Liganden große Mengen an Typ-I-IFN produzieren. Die Erkennung viraler Nukleinsäuren wird in pDCs hauptsächlich durch TLR7 und TLR9 vermittelt. Während bei den meisten Zellen die IRF7-Induktion von einer vorherigen Stimulation durch IFN- β abhängig ist, exprimieren pDCs auch ohne vorherigen IFN-Kontakt hohe Level an IRF4, IRF7 und IRF8. So wird eine schnelle IFN-Antwort auf eine Virusinfektion ermöglicht (Barchet *et al.* 2002; Gilliet *et al.* 2008). TLR9 spielt eine wichtige Rolle bei der Erkennung von DNA-Viren wie HSV1 oder HSV2 (Lund *et al.* 2003), TLR7 vermittelt dagegen eine antivirale Antwort auf ssRNA-Viren wie Influenza, HIV-1, Sendai-Virus und VSV (Heil *et al.* 2004; Lund *et al.* 2004). Es konnte gezeigt werden, dass RLRs und ihre Adaptorproteine in

konventionellen DCs und Fibroblasten essentiell für die Erkennung von Virusinfektionen sind, dass diese in pDCs für eine antivirale Antwort jedoch nicht benötigt werden. Nukleinsäuren von Viren, die mit der Plasmamembran fusionieren und ihr Genom in das Zytoplasma abgeben, können durch Autophagie in endosomale Vesikel gelangen und dort von TLRs erkannt werden (Lee *et al.* 2007). Dieser Mechanismus könnte erklären, warum pDCs keine zytoplasmatischen PRRs benötigen.

TLR	Ligand	Lokalisation
TLR1	bakterielle Lipopeptide	Zelloberfläche
TLR2	Lipoteichonsäure, Zymosan, Lipopeptide (Pam ₃ CSK ₄), Lipoarabinomannan	Zelloberfläche
TLR3	virale dsRNA, Poly(I:C)	intrazellulär
TLR4	LPS, Mannan, Hüllproteine von RSV	Zelloberfläche
TLR5	Flagellin	Zelloberfläche
TLR6	Lipoteichonsäure, Zymosan, Lipopeptide	Zelloberfläche
TLR7	ssRNA-Viren (VSV, Influenza), Resiquimod (R848), Imiquimod	intrazellulär
TLR8	virale ssRNA, Resiquimod (R848)	intrazellulär
TLR9	bakterielle und virale CpG-DNA	intrazellulär
TLR10	bisher nicht bekannt	Zelloberfläche
TLR11	Profilin von <i>Toxoplasma gondii</i> , uropathogene Bakterien	intrazellulär
TLR12	Profilin von <i>Toxoplasma gondii</i>	intrazellulär
TLR13	bakterielle 23S rRNA	intrazellulär

Tabelle 1: TLRs und ihre Liganden (Koblansky *et al.* 2013; Kumar *et al.* 2009; Lee und Kim 2007; Pifer *et al.* 2011; Song *et al.* 2015)

1.3.2 RIG-I-ähnliche Rezeptoren

Während TLR7 und TLR9 wichtig für die Erkennung von Virusinfektionen in pDCs sind, erkennen die meisten anderen Zelltypen virale RNA durch die RLRs. Anders als TLRs werden die RLRs in den meisten Geweben exprimiert und kommen in nahezu allen Körperzellen vor. Bei den RLRs handelt es sich um zytosolische Sensoren für virale Genome und Replikationsintermediate. Sie gehören zur Superfamilie 2 der RNA-Helikasen und setzen sich aus drei verschiedenen Mitgliedern zusammen: *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I), *melanoma differentiation-associated antigen 5* (MDA5) und *laboratory of genetics and physiology 2* (LGP2).

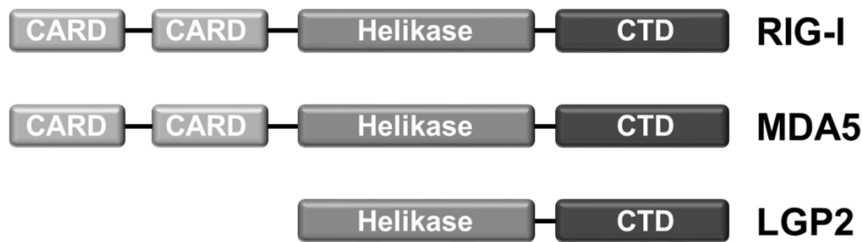


Abbildung 1.1: Struktureller Aufbau der RLRs. RLRs bestehen aus zwei N-terminalen CARD-Domänen, welche bei LGP2 fehlen, einer Helikase-Domäne und der C-terminalen RNA bindenden Domäne (CTD). Modifiziert nach Zinzula und Tramontano (2013).

Sie bestehen aus einer RNA-bindenden, C-terminalen Domäne (CTD) und einer zentralen DExD/H-Box Helikase-Domäne. Bei RIG-I und MDA5 folgen auf die Helikase-Domäne zwei N-terminale *caspace activation and recruitment domains* (CARDs) (s. Abbildung 1.1). Die Helikase-Domäne und die CTD binden virale RNA, wobei die CTD essentiell für die RNA-Erkennung ist. Die Aktivierung von Signalwegen wird durch die CARD-Domäne vermittelt, welche bei LGP2 fehlt. Die Funktion von LGP2 ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch deuten Studien auf eine regulatorische Rolle hin (Satoh *et al.* 2010; Venkataraman *et al.* 2007). Obwohl RIG-I und MDA5 beide doppelsträngige RNA (dsRNA) erkennen, weisen sie in ihrer Spezifität erhebliche Unterschiede hinsichtlich Länge und Struktur der erkannten RNA auf. Ein wichtiger Ligand für RIG-I ist kurze, doppelsträngige RNA mit einem 5'Triphosphat (5'ppp-dsRNA). Solche Strukturen werden von negativsträngigen ssRNA-Viren gebildet, deren 3'- und 5'-untranslatierte Genom-Bereiche hybridisieren und eine „*panhandle*“-ähnliche Struktur ausbilden (Schlee *et al.* 2009). In Studien mit synthetischen RNAs konnten weitere RIG-I-Liganden identifiziert werden, darunter auch dsRNA mit einem 5'-Monophosphat (Takahasi *et al.* 2008). Die Frage, welche Kriterien eine RNA zu einem RIG-I-Liganden machen und ob dieser auch natürlicherweise während einer Virusinfektion von RIG-I erkannt wird, wird weiterhin diskutiert. Rehwinkel *et al.* (2010), Baum *et al.* (2010) und Weber *et al.* (2013) konnten jedoch zeigen, dass komplette virale RNAs und verkürzte RNAs aus *defective interfering* (DI) *particles* mit einem 5'-Triphosphat während einer Virusinfektion von RIG-I erkannt werden. RIG-I spielt daher eine wichtige Rolle bei der Erkennung von negativsträngigen ssRNA-Viren, unter anderem aus den Familien *Paramyxoviridae*, *Filoviridae* und *Orthomyxoviridae* (Baum *et al.* 2010; Cardenas *et al.* 2006; Rehwinkel *et al.* 2010). MDA5 erkennt im Gegensatz zu RIG-I eher lange dsRNA und ist daher wichtig für die Erkennung von Viren wie EMCV, Enteroviren (*Picornaviridae*) und Noroviren (*Calciviridae*), die während ihres Replikationszykluses dsRNA-Intermediate produzieren (Kato *et al.* 2006; McCartney *et al.* 2008). Allerdings konnte gezeigt werden, dass Paramyxoviren, die keine dsRNA-

Intermediate bilden, das *V-Protein* exprimieren, welches MDA5 inhibiert (Motz *et al.* 2013). Es ist somit wahrscheinlich, dass auch diese Viren MDA5-Liganden produzieren.

Unstimuliertes RIG-I liegt in einer monomerischen, autoinhibierten Konformation vor. Durch Bindung eines Liganden an die CTD findet eine Konformationsänderung statt, die mit der Exposition der CARDS einhergeht und die Interaktion mit Adaptormolekülen für die Signalweiterleitung ermöglicht (Kowalinski *et al.* 2011). RIG-I und MDA5 interagieren nach Aktivierung zunächst mit dem Adaptorprotein *mitochondrial antiviral signalling protein* (MAVS), welches zwei verschiedene Signalwege aktiviert: über die Aktivierung von TBK1/IKKi wird IRF3 und damit eine IFN-Antwort induziert, die Aktivierung des IKK-Komplexes dagegen führt zur Translokation von NFκB und damit zur Produktion proinflammatorischer Zytokine (Lee und Kim 2007).

1.3.3 Selbst-Fremd-Unterscheidung von Nukleinsäuren

Bakterien enthalten hochkonservierte Strukturen, wie das Lipopolysaccharid, die in eukaryotischen Zellen nicht vorkommen und deshalb von Immunzellen als fremde Strukturen erkannt werden. Nukleinsäuren kommen dagegen sowohl in eukaryotischen als auch in prokaryotischen Zellen und in Viren vor und ähneln sich in ihrer Struktur und chemischen Zusammensetzung. Da virale PAMPs vor allem durch die viralen Nukleinsäuren gebildet werden, ist die Erkennung von fremder RNA und DNA für das Immunsystem von besonderer Wichtigkeit. Nukleinsäure-erkennende Rezeptoren können daher in mehreren Klassen der PRR gefunden werden und können fremde und zelleigene Nukleinsäuren auf drei verschiedenen Ebenen unterscheiden: das erste Unterscheidungsmerkmal kann die Primärstruktur sein, welche Nukleotidzusammensetzung, chemische Modifikationen und die Sequenz beinhaltet. Die zweite Ebene der Unterscheidung wird durch Strukturen höherer Ordnung gebildet, darunter Sekundär- und Tertiärstrukturen. Die dritte Ebene beinhaltet Unterscheidungen aufgrund der Lokalisation von Nukleinsäuren in intrazellulären Kompartimenten und ihrer Verfügbarkeit als Liganden. Diese verschiedenen Ebenen der Unterscheidung werden, einzeln oder in kombinierter Form, von allen PRR genutzt. (Dalpke und Helm 2012; Schlee und Hartmann 2016)

TLR3 unterscheidet fremde RNA aufgrund ihrer Sekundärstruktur, denn er erkennt längere dsRNA, die bei Virusinfektionen in die Zelle gelangt oder während der Virusreplikation entsteht. Zwar kommen dsRNA-Strukturen auch in der Zelle vor, beispielsweise in tRNA und miRNA, diese sind aber relativ kurz und reichen für eine TLR3-Aktivierung nicht aus. Wie TLR3 befinden sich auch TLR7 und TLR9 in endosomalen Kompartimenten. Virale RNA liegt während des Replikationszyklus in der

Regel nicht im Endosom vor, kann aber durch Phagozytose viraler Partikel oder infizierter Zellen in die endo-/lysosomalen Kompartimente gelangen. Auch Autophagieprozesse spielen bei der Erkennung eine Rolle (Lee *et al.* 2007). TLR7 wird durch ssRNA mit GU-reichen Sequenzen aktiviert, welche oft in viraler RNA zu finden sind (Diebold *et al.* 2004; Heil *et al.* 2004). TLR9 erkennt bakterielle DNA aufgrund von mangelnder Methylierung und vielen CpG-Dinukleotiden. Diese werden in eukaryotischer DNA unterdrückt und sind außerdem stark methyliert (Bauer *et al.* 2001; Hemmi *et al.* 2000). Die strukturellen Unterschiede sind für eine Verhinderung der TLR9-Aktivierung durch endogene DNA jedoch nicht ausreichend. So konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Expression eines rekombinanten TLR9-Rezeptors an der Zelloberfläche auch die Erkennung von endogener DNA bewirkt (Barton *et al.* 2006). Den gleichen Effekt zeigt eine gesteigerte Verfügbarkeit zellulärer DNA, beispielsweise durch den *knockout* der DNase I (Yasutomo *et al.* 2001). Diese Studien machen deutlich, dass unter physiologischen Bedingungen auch die unterschiedliche Lokalisation von Rezeptor und Ligand bei den endosomalen TLRs eine Aktivierung durch endogene Nukleinsäuren verhindert. Das Zytoplasma ist unter physiologischen Bedingungen weitestgehend frei von zellulärer DNA, sodass die Unterscheidung von Fremd- und Eigen-DNA durch zytosolische Rezeptoren wie AIM2 ebenfalls aufgrund der Lokalisation erfolgt (Hornung *et al.* 2009).

Der zytoplasmatische PRR RIG-I erkennt virale RNA aufgrund von partiell doppelsträngigen Elementen („*panhandle*“-Struktur) und einem 5'-Triphosphat. Zelluläre RNAs weisen dagegen eine 5'-Cap-Struktur oder ein 5'-Monophosphat auf (Nallagatla *et al.* 2008). MDA5 erkennt, ähnlich wie TLR3, lange (>500 bp) dsRNA, die bei Viren häufig vorkommt, im Genom von Vertebraten jedoch selten zu finden ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Formation von endogenen MDA5-Liganden in eukaryotischen Zellen durch das RNA-Editierungsenzym ADAR1 verhindert werden kann (Liddicoat *et al.* 2015). Dieses katalysiert die Deaminierung von Adenosinbasen, was eine Umwandlung in Inosin bewirkt und die Ausbildung stabiler dsRNA-Strukturen, die häufig in nicht-codierenden Retrotransposons entstehen können, verhindert. In humanen Zellen führt eine verminderte ADAR1-Aktivität daher zu einer verstärkten MDA5-vermittelten Immunaktivierung (Pestal *et al.* 2015).

Ein weiteres wichtiges Unterscheidungsmerkmal sind chemische Nukleotidmodifikationen. Diese kommen in eukaryotischer RNA häufiger vor als in bakterieller RNA. Es konnte gezeigt werden, dass Modifikationen wie N6-Methyladenosin oder 5-Methylcytosin die Aktivierung von TLR3, -7 und -8 durch *in vitro*-transkribierte RNA verhindern können (Kariko *et al.* 2005). Besonders die 2'-O-Methylierung der Ribose konnte in mehreren Studien als ein wichtiges Merkmal eukaryotischer mRNAs, tRNAs

und rRNAs identifiziert werden, dessen Anwesenheit sich suppressiv auf TLR7 auswirkt (Robbins *et al.* 2007). Auch die 5'-Cap-Struktur eukaryotischer mRNAs ist durch 2'-O-Methylierung modifiziert. Einige Viren, wie Flaviviren oder Coronaviren, nutzen eigene 2'-O-Methyltransferasen, die ihre viralen mRNA-Caps ebenfalls methylieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit dieser Cap-Methylierung zu einer Steigerung der MDA5- und IFIT-abhängigen Interferon-Produktion in den infizierten Zellen führt (Daffis *et al.* 2010; Züst *et al.* 2011). Damit stellt die Cap-Methylierung ein weiteres Merkmal für die Unterscheidung von eigener und fremder RNA dar.

Eukaryotische tRNA ist die am stärksten modifizierte RNA-Spezies; bis zu 25% ihrer Nukleotide liegen in modifizierter Form vor. Unmodifizierte, *in vitro*-transkribierte tRNAs löst eine starke IFN-Antwort in pDCs aus (Gehrig *et al.* 2012). tRNA aus eukaryotischen Zellen und auch einige bakterielle tRNAs wirken jedoch nicht immunstimulatorisch. Insbesondere die 2'-O-Methylierung des Guanosins an Position 18 in tRNA verhindert nicht nur die Stimulation von TLR7, sondern wirkt sich antagonistisch auf die Antwort auf andere TLR7-Agonisten aus (Jöckel *et al.* 2012).

Neben der Erkennung fremder Nukleinsäure als PAMP kann jedoch auch die Aktivierung von PRR durch zelluläre Nukleinsäure als DAMP sinnvoll sein. So kann das Vorhandensein von endogener DNA im Zytoplasma auf eine Schädigung des Zellkerns oder der Mitochondrien hinweisen und eine Reaktion der Zelle erfordern. Kariko *et al.* (2004) konnten beispielsweise zeigen, dass endogene mRNA aus nekrotischen Zellen in DCs eine IFN α -Produktion über den TLR3 induziert. Die Erkennung von DAMPs kann aber auch an der Entstehung von Autoimmunerkrankungen oder chronischen Entzündungsprozessen beteiligt sein. Ein Mechanismus, der zur Pathogenese des systemischen *Lupus erythematoses* beiträgt, ist beispielsweise die Aktivierung des TLR9 bzw. TLR7 in DCs durch Immunkomplexe aus Autoantikörpern und endogenen DNA- oder RNA-Fragmenten (Lau *et al.* 2005; Means *et al.* 2005). Die strikte Unterscheidung von Nukleinsäuren in „fremd“ und „zelleigen“ funktioniert daher nicht immer fehlerfrei. Zudem nutzen Viren bei der Prozessierung ihrer RNAs zum Teil wirtseigene Prozesse und versuchen, die immunogenen Strukturen ihrer RNAs zu maskieren, um einer Immunerkennung zu entgehen.

1.4 Influenzaviren

1.4.1 Taxonomie und Struktur

Influenzaviren gehören zur Familie der *Orthomyxoviridae* und wurden im Jahr 1933 erstmals aus Menschen isoliert. Sie sind durch ein segmentiertes RNA-Genom in

Negativorientierung gekennzeichnet. Die Familie der *Orthomyxoviridae* wird in fünf Gattungen unterteilt: Influenza-A-, Influenza-B-, Influenza-C-, Thogotovirus und Isavirus. Die Einteilung der Influenzaviren in die Gattungen A, B und C basiert auf den unterschiedlichen serologischen Eigenschaften ihrer Matrix- (M) und Nukleoproteine (NP). Zudem unterscheiden sie sich in der Anzahl ihrer Gensegmente, ihrer Wirtsspezifität und ihrer Oberflächenproteine. Influenza-A- und -B-Viren weisen acht Gensegmente auf, Influenza-C-Viren haben dagegen nur sieben Gensegmente. Während Influenza-A- und -B-Viren auf ihrer Oberfläche zwei Arten von Glykoproteinen tragen, das Hämagglutinin (HA) und die Neuraminidase (NA), werden die Funktionen dieser beiden Proteine bei Influenza-C-Viren von einem einzigen Glykoprotein, dem Hämagglutinin-Esterase-Fusionsprotein, übernommen (Herrler und Klenk 1991). Influenza-A-Viren können außerdem neben dem Menschen zahlreiche andere Säugetiere und Vögel infizieren. Influenza-B-Viren wurden dagegen bisher nur aus Menschen und Robben, Influenza-C-Viren nur aus Menschen und Schweinen isoliert (Modrow *et al.* 2010). Das primäre natürliche Reservoir der Influenza-A-Viren wird in wildlebenden Wasservögeln vermutet (Webster *et al.* 1992). Influenza-A-Viren werden anhand ihrer unterschiedlichen Antigenität der Oberflächenglykoproteine in verschiedene Subtypen unterteilt. Bisher wurden 16 verschiedene HA- und 9 verschiedene NA-Subtypen in Wasservögeln identifiziert. (Fouchier *et al.* 2005; Webster *et al.* 1987). Zuletzt wurden zwei neue Influenza-A-Viren aus Fledermäusen und Flughunden isoliert (H17N10 und H18N11). Diese unterscheiden sich jedoch grundlegend von den bisher bekannten Subtypen (Tong *et al.* 2012; Tong *et al.* 2013). Die Nomenklatur für Influenzaviren wurde 1980 von der WHO standardisiert. Demnach setzt sich der Name für ein Virusisolat aus Genus und Wirtsspezies sowie Ort, Nummer und Jahr der Isolation zusammen. Bei humanen Influenzaviren wird die Wirtsspezies nicht angegeben, zudem wird bei Influenza-A-Viren zusätzlich in Klammern der Subtyp benannt.

Influenza-A-Viruspartikel haben einen Durchmesser von 80-120 nm und eine sphärische bis filamentöse Struktur. Ihre Hülle besteht aus einer Lipiddoppelschicht, die aus der infizierten Zelle stammt, und in die die Oberflächenproteine HA, NA und das Matrixprotein 2 (M2) eingebettet sind. Im Inneren befindet sich eine Schicht aus dem Matrixprotein 1 (M1), mit dem die Nukleokapside des viralen Genoms assoziiert sind. Diese bestehen aus den acht Gensegmenten, von denen jedes von Nukleoproteinen (NP) ummantelt ist. Zusätzlich sind die drei viralen Polymeraseproteine PB1, PB2 und PA mit den Enden der Nukleokapside assoziiert. (Webster *et al.* 1992) (s. Abbildung 1.2).

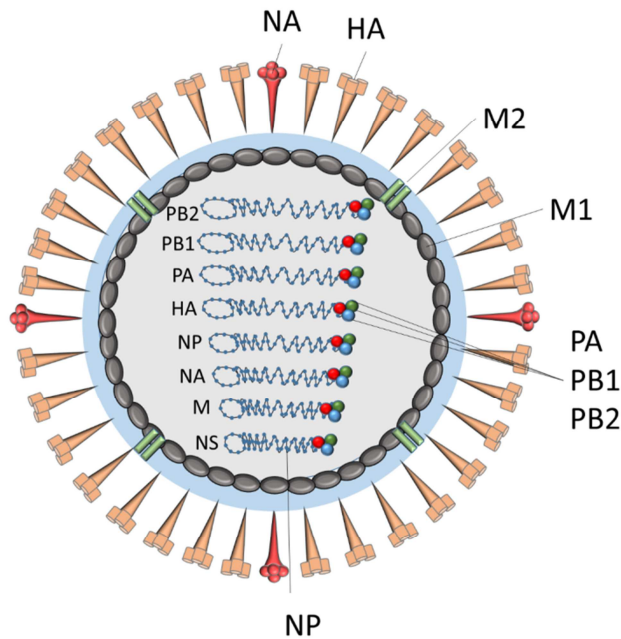


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung eines Influenza-A-Virions.

Die virale Hülle enthält die zwei Glykoproteine HA und NA, sowie das Protein M2. Die viralen Ribonukleoproteine bestehen aus den viralen RNA-Segmenten, an welche die drei Polymeraseproteine gebunden sind. Das Protein M1 ist sowohl mit der Virushülle als auch mit den Ribonukleoproteinen assoziiert.

Segment 1: PB2, Segment 2: PB1, Segment 3: PA, Segment 4: HA, Segment 5: NP, Segment 6: NA, Segment 7: M, Segment 8: NS
Modifiziert nach Subbarao und Joseph (2007).

Diese Strukturen aus Proteinen und Nukleinsäure werden als virale Ribonukleoproteine (vRNP) bezeichnet. Die meisten der acht viralen Gensegmente codieren für ein einziges Protein. Eine Ausnahme stellen die Segmente 7 und 8 dar, die durch alternatives Spleißen für jeweils zwei Proteine codieren (M1 und M2 sowie NS1 und NS2). Für beide Segmente konnte gezeigt werden, dass unter bestimmten Bedingungen bei einigen Viren noch ein weiteres Protein durch alternatives Spleißen produziert wird, das Protein M42 für Segment 7 und das Protein NS3 für Segment 8 (Selman *et al.* 2012; Wise *et al.* 2012). Ihre Funktionen sind jedoch noch weitestgehend unverstanden. Das Segment 2 codiert außerdem über zwei verschiedene Leseraster für die Proteine PB1 und PB1-F2 (Chen *et al.* 2001). Über die Verwendung eines alternativen Startcodons wird aus dem Leseraster für das PB1-Protein zusätzlich das Protein PB1-N40 translatiert, das damit eine aminoterminal verkürzte Version des PB1-Proteins darstellt (Wise *et al.* 2009). Auch für das Segment 3 wurde beschrieben, dass über alternative Startcodons drei verkürzte PA-Varianten translatiert werden: PA-X, PA-N155 und PA-N182 (Jagger *et al.* 2012; Muramoto *et al.* 2013). Diese verkürzten Varianten der Polymeraseproteine, sowie die Proteine M42 und NS3 sind jedoch für eine Infektion nicht essentiell und lassen sich nur in infizierten Zellen, nicht im Viruspartikel, nachweisen.

Das Virusgenom der Influenza-A-Viren besteht aus negativsträngiger RNA, es codiert also nicht direkt für die viralen Proteine, sondern muss erst durch die virale RNA-Polymerase in mRNA umgeschrieben werden. Der codierende Bereich jedes Segments wird auf beiden Seiten von nicht-codierenden Regionen flankiert. Diese beinhalten eine segmentspezifische und eine hochkonservierte Region. Letztere wird

durch die 13 Nukleotide am 5'-Terminus und die 12 Nukleotide am 3'-Terminus gebildet (Desselberger *et al.* 1980). Diese Bereiche sind bei allen Influenza-A-Viren und allen Segmenten identisch und partiell komplementär, sodass die lineare RNA eine pseudo-zirkuläre Form annimmt. Die „*panhandle*“-ähnliche Struktur dient als Promotor für die Replikation und Transkription (Flick *et al.* 1996). Zwischen der codierenden und der hochkonservierten Region befindet sich die segmentspezifische Sequenz mit variabler Länge, die ebenfalls unter allen Influenza-A-Viren konserviert vorliegt.

1.4.2 Replikation

Der Replikationszyklus der Influenzaviren kann in verschiedene Stadien unterteilt werden. Als erstes findet der Eintritt in die Wirtszelle statt, anschließend werden die viralen RNPs in den Kern transportiert. Darauf folgt die Transkription und Replikation des viralen Genoms, der Export der vRNPs aus dem Kern und schließlich der Zusammenbau der neuen Viruspartikel und der Austritt aus der Wirtszelle.

Für den Eintritt in die Wirtszelle ist das HA entscheidend. Es liegt als Homotrimer in Form von Spikes in der Virushülle vor und bindet an Sialinsäuren (meist N-Acetylneuraminsäure) auf der Zelloberfläche. Sialinsäuren sind entweder durch $\alpha(2,3)$ - oder durch $\alpha(2,6)$ -Bindungen an endständige Zuckermoleküle von Glykoproteinen gebunden. Diese zwei Bindungstypen sind wichtig für die Spezifität des HAs. Das HA von humanen Influenzaviren zeigt eine Spezifität für $\alpha(2,6)$ -gebundene Sialinsäuren, während das HA von aviären Viren eher an $\alpha(2,3)$ -gebundene Sialinsäuren bindet. Dieser Unterschied wird dadurch bedingt, dass die Epithelzellen der humanen Trachea hauptsächlich $\alpha(2,6)$ -gebundene Sialinsäuren aufweisen, im Intestinaltrakt von Wasservögeln, dem Replikationsort der aviären Viren, dagegen zumeist $\alpha(2,3)$ -gebundene Sialinsäuren vorliegen (Couceiro *et al.* 1993; Rogers *et al.* 1983a; Rogers *et al.* 1983b). In der Trachea von Schweinen konnte sowohl der humane als auch der aviäre Rezeptor gefunden werden, sodass sie sowohl von humanen als auch von aviären Influenzaviren infiziert werden können. Bei der Entstehung von Influenza-Pandemien kommt Schweinen daher eine besondere Rolle zu (Ito *et al.* 1998).

Die Bindung des HAs an die Glykoproteine löst eine Rezeptor-vermittelte Endozytose aus, sodass das Viruspartikel in die endosomalen Kompartimente gelangt. Durch den sauren pH-Wert in den Endosomenvesikeln kommt es zu einer Konformationsänderung im HA, die die Freilegung des Fusionspeptids der Untereinheit HA₂ bewirkt und so zu einer Verschmelzung der Virushülle mit der Endosomenmembran führt. Durch das saure Milieu im Endosom wird zugleich auch der Ionenkanal M2 aktiviert, der einen Protoneneinstrom in das Virusinnere bewirkt, sodass die Bindung zwischen NP und M1 gelöst wird und die viralen

Ribonukleoproteine (vRNP) in das Zytoplasma entlassen werden. Von dort werden sie in den Kern transportiert, wo die Transkription und Replikation startet. Der Promotor für die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase befindet sich in der 3'-nicht-codierenden Region. Für die Initiation der Transkription bedienen sich die Influenzaviren der Methode des „5'-Cap-Stehlens“ (*cap snatching*): Das an das 3'-Ende der vRNA gebundene PB2 bindet an das 5'-Ende einer zellulären mRNA und schneidet durch seine Endonukleaseaktivität das 5'-Ende inklusive Cap-Struktur und 10-15 weitere Nukleotide ab (Plotch *et al.* 1981). Da die terminale Base am 3'-Ende der viralen RNA (vRNA) immer ein Uridin ist, kommt es zu einer Hybridisierung eines Adeninrests der zellulären mRNA mit dem terminalen Uridin der vRNA. Diese Methode bewirkt nicht nur den Transkriptionsstart, sondern behindert auch die Translation zellulärer mRNAs, sodass die zellinternen Prozesse nahezu komplett in die virale Replikationsaktivität eingebunden werden. An dem freien 3'-OH-Ende leitet der Polymerasekomplex die Transkription ein. 17 bis 22 Nukleotide vor dem 5'-Ende folgt auf die codierende Region eine Uridin-reiche Sequenz, die ein Stottern der Polymerase bewirkt und so zur Polyadenylierung der viralen mRNAs führt (Poon *et al.* 1999; Robertson *et al.* 1981). Die Segmente 7 und 8 werden anschließend durch die zelluläre *Splicing*-Maschinerie gespleißt und die viralen mRNAs ins Zytoplasma exportiert, wo die viralen Proteine translatiert werden. Die membranassoziierten Proteine HA, NA und M2 werden an der Membran des ER translatiert und von dort zur Zelloberfläche transportiert. Dabei wird das HA, das als Vorläuferprotein HA₀ synthetisiert wird, durch endogene Proteasen in seine Untereinheiten HA₁ und HA₂ gespalten und so aktiviert. Dieser Schritt ist essentiell für die Infektiosität der Viren und eine wichtige Determinante für die Pathogenität von Influenzaviren (Bosch *et al.* 1979). Verschiedene HAs können von unterschiedlichen Proteasen gespalten werden. Dabei ist die Art der Aminosäuren an der Spaltstelle entscheidend. Liegt dort ein einzelnes Arginin oder Lysin vor, findet die Spaltung bei aviären Viren durch Trypsin-ähnliche Proteasen statt (Klenk *et al.* 1977). Deren Expression ist auf den aviären Respirations- und Intestinaltrakt beschränkt. Besteht die Spaltstelle jedoch aus dem multibasischen Konsensusmotiv R-X-R/K-R, kann das HA durch Proteasen wie Furin gespalten werden, die in vielen Organen und Geweben exprimiert werden (Stieneke-Gröber *et al.* 1992). Dies führt zu einer systemischen Erkrankung mit schweren Verläufen. Multibasische Spaltstellen weisen vor allem Viren der Subtypen H5 und H7 auf. Diese werden als hochpathogene aviäre Influenzaviren bezeichnet. Die Influenzaviren der Säugetiere weisen eine monobasische Spaltstelle auf. Es konnte gezeigt werden, dass beim Menschen Serin-Transmembranproteasen des Typs 2, wie die *human airway trypsin-like protease* (HAT) oder die TMPRSS2, für die Aktivierung des HAs verantwortlich sind (Böttcher *et*

al. 2006). Diese werden hauptsächlich in den Atemwegen exprimiert. HAT wird in der Plasmamembran exprimiert, TMPRSS2 dagegen in intrazellulären Kompartimenten (Böttcher-Friebertshäuser *et al.* 2014).

Die neu translatierten Proteine PB1, PB2, PA, NP, NS1, NS2 und M1 werden aufgrund ihrer Kernlokalisierungssignale anschließend zurück in den Kern transportiert, wo die Replikation des viralen Genoms initiiert wird (Davey *et al.* 1985; Greenspan *et al.* 1988; Martin und Helenius 1991). Es wird vermutet, dass dafür die Akkumulation von neu synthetisierten NP- und Polymeraseproteinen im Kern notwendig ist (Vreede *et al.* 2004). Für die Replikation wird zunächst eine komplementäre RNA (cRNA) synthetisiert. Dieser Prozess ist Primer-unabhängig und erfolgt durch sogenannte terminale Initiation. Dabei wird an den Nukleotiden U1 und C2 am 3'-Ende der vRNA ein pppApG-Dinukleotid synthetisiert, welches die Elongation durch die virale Polymerase ermöglicht. Für die Synthese der vRNA anhand des cRNA-Templates findet dagegen eine interne Initiation statt. Das pppApG-Dinukleotid wird intern an den Positionen 4 und 5 des 3'-Endes synthetisiert und rehybridisiert anschließend mit den terminalen Nukleotiden an der Position 1 und 2, sodass der Polymerase ein freies 3'-OH-Ende für die Elongation zur Verfügung steht (Deng *et al.* 2006). Die neuen vRNAs werden von NP-, PB2-, PB1- und PA-Proteinen gebunden, sodass neue vRNPs gebildet werden. Diese binden an M1 und werden durch die Exportfunktion des NS2-Proteins aus dem Kern ins Zytoplasma transportiert (Martin und Helenius 1991; O'Neill *et al.* 1998). Durch Interaktion mit zellulären Proteinen gelangen die vRNPs über einen Mikrotubuli-abhängigen Transportprozess zur apikalen Plasmamembran, wo die HA-, NA- und M2-Proteine in die Membran eingelagert sind (Amorim *et al.* 2011). Durch die Interaktion von M1 mit HA, NA und M2 und den vRNPs wird die Knospung der viralen Partikel ausgelöst (Hutchinson und Fodor 2013). Bei diesem Schritt ist die Aktivität der NA wichtig. Sie spaltet die Sialinsäuren von Glykoproteinen der Zellmembran und der Virusoberfläche und verhindert so eine Aggregation der Viren und das Haften der Viren auf der Zelloberfläche (Palese *et al.* 1974).

1.4.3 Pathogenese

Influenzaviren werden durch Tröpfcheninfektion übertragen und führen nach einer Inkubationszeit von ein bis fünf Tagen zu den typischen Symptomen der Grippe. Dazu gehören plötzlich einsetzendes Fieber, Gliederschmerzen, Husten und Halsschmerzen, die für etwa drei bis sieben Tage anhalten. Menschen mit chronischen Lungen- oder Herzerkrankungen haben ein hohes Risiko für die Entwicklung schwerer Komplikationen, darunter akute Bronchitis, primäre virale Pneumonie sowie Myo- und Perikarditis. Oft werden auch Lungenentzündungen durch sekundäre bakterielle

Infektionen verursacht, beispielsweise durch *Streptococcus pneumoniae* oder *Haemophilus influenzae*. (Modrow *et al.* 2010)

Die Epithelzellen des Respirationstrakts sind die primären Zielzellen der Influenzaviren und produzieren während einer Infektion große Mengen an Viren, die anschließend auch Alveolarmakrophagen infizieren können (Fujisawa *et al.* 1987; Hofmann *et al.* 1997). Der nekrotische Zelltod der Epithelzellen und die apoptotischen Makrophagen sowie die Virusinfektion selbst führen zu einer Erkennung von PAMPs und DAMPs durch PRRs, die eine Sekretion pyrogener Zytokine und Chemokine einleitet. Die darauffolgende Infiltration des infizierten Gewebes durch Leukozyten ist entscheidend für die Beseitigung der Infektion. Eine Dysregulation dieser frühen Immunprozesse kann jedoch einen zusätzlichen Pathogenitätsfaktor darstellen, der mit hohen Mortalitätsraten assoziiert ist. (La Gruta *et al.* 2007) So konnte gezeigt werden, dass Infektionen mit dem pandemischen H1N1-Virus von 1918 und mit hochpathogenen Viren des Subtyps H5N1 mit einer außergewöhnlich starken Entzündungsreaktion, bedingt durch die erhöhte Produktion von Zytokinen und Chemokinen, einhergehen und damit die Schädigungen der Lunge verstärken (Cheung *et al.* 2002; Kash *et al.* 2006; McAuley *et al.* 2015). Zudem können reaktive Stickstoff- und Sauerstoffmetabolite, die von infizierten Makrophagen freigesetzt werden, zu der Pathogenese einer Pneumonie beitragen (Karupiah *et al.* 1998; Schwarz 1996). Die Schwere einer Influenzainfektion wird daher einerseits durch die intrinsische Virulenz und andererseits durch die Stärke der angeborenen Immunantwort auf die Infektion bedingt, die bei einer Dysregulation der beteiligten Prozesse ebenfalls zu einer Schädigung des Wirts beitragen kann (Iwasaki und Pillai 2014).

Influenzaviren verursachen saisonale Epidemien mit weltweit etwa 250.000 bis 500.000 Todesfällen pro Jahr und gehören damit zu den häufigsten Verursachern von Atemwegsinfektionen (WHO 2014). Besonders bei älteren Menschen, Kindern und chronisch Kranken können bei einer Grippeerkrankung schwere Komplikationen auftreten. Zusätzlich zu den jährlichen Epidemien können Influenzaviren Pandemien verursachen, bei denen bis zu 50% der Weltbevölkerung infiziert werden kann und deutlich höhere Mortalitätsraten als bei den saisonalen Infektionen erreicht werden können. Eine Pandemie tritt vor allem dann auf, wenn ein Virus mit einer neuen Kombination von Oberflächenglykoproteinen, gegen die in der Bevölkerung keine neutralisierenden Antikörper vorliegen, auf den Menschen übertragen wird. Eine solche Reassortierung wird als *Antigen shift* bezeichnet und beinhaltet den Austausch von Gensegmenten, vor allem für das HA und/oder NA, zwischen verschiedenen Viren in einem Wirt. Sowohl die Influenzapandemien von 1957 und 1968, als auch die „Schweinegrippe“-Pandemie von 2009 wurden durch ein solches Reassortierungs-

ereignis ausgelöst (Scholtissek *et al.* 1978; Smith *et al.* 2009). Die virale RNA-Polymerase hat zudem keine Korrekturfunktion und inkorporiert mit einer Häufigkeit von mehr als 10^{-5} pro Stelle falsche Basen in den komplementären Gegenstrang (Drake 1993). Dies führt regelmäßig zu Proteinmutationen und damit auch zu Veränderungen der Antigenität der Oberflächenproteine. Eine solche Veränderung wird als *Antigendrift* bezeichnet und bewirkt, dass ein Influenzasubtyp über einen langen Zeitraum in der Bevölkerung zirkulieren kann und ein Impfstoff gegen Influenza nur für wenige Monate bis Jahre Schutz bietet (Taubenberger und Morens 2008).

1.4.4 Angeborene Immunantwort und Evasionsstrategien

Die Infektion mit Influenzaviren erfolgt über den Respirationstrakt, dessen Epithel mit einer Muzinschicht bedeckt ist. Diese stellt die erste Barriere für die Influenzaviren dar, da die hochglykosylierten Proteine mit ihren endständigen Sialinsäuren Liganden für das HA darstellen und so die weitere Verbreitung der Viren einschränken können. Dieser Schutzmechanismus wird jedoch durch die Aktivität der Neuraminidase, die Sialinsäuren abspaltet, abgeschwächt (Matrosovich *et al.* 2004a; Ohuchi *et al.* 2006). Nach Infektion der respiratorischen Epithelzellen und der damit verbundenen Überwindung der epithelialen Barriere, können weitere Zelltypen in den submucosen Bereichen infiziert werden, darunter Alveolarmakrophagen und DCs (Manicassamy *et al.* 2010). Die Erkennung der viralen Infektion durch zelluläre PRRs vermittelt die Produktion von Interferonen, Chemokinen, proinflammatorischen Zytokinen und Eicosanoiden. Dadurch werden Entzündungsprozesse eingeleitet und weitere Immunzellen, darunter Monozyten und NK-Zellen, in das Lungengewebe rekrutiert, die durch Abtöten und Phagozytose von infizierten Zellen die virale Infektion eindämmen (Hashimoto *et al.* 2007; Manicassamy *et al.* 2010; Perrone *et al.* 2008). Des Weiteren wird die adaptive Immunantwort aktiviert.

Eine Influenzainfektion wird durch die PRRs TLR3, 7, RIG-I, MDA-5 und NLRP3 vom angeborenen Immunsystem erkannt. TLR3 wird im Endosom durch dsRNA aktiviert. Da die zelluläre RNA-Helikase UAP56 von Influenzaviren genutzt wird um die Bildung dsRNA-Strukturen zu verhindern (Wisskirchen *et al.* 2011), sind vermutlich andere, bisher unbekannte RNA-Strukturen für die Aktivierung von TLR3 verantwortlich. TLR3 wird von humanen alveolaren und bronchialen Epithelzellen exprimiert und ist an der Produktion proinflammatorischer Zytokine als Antwort auf eine Influenzainfektion beteiligt (Guillot *et al.* 2005). Es konnte gezeigt werden, dass TLR3 zum einen die Entzündungsreaktion fördert und damit zu Lungenschädigungen beitragen kann, zum anderen aber auch die antivirale Resistenz fördert. Ein TLR3-*knockout* in Mäusen führt

zwar zu einer erhöhten Viruslast, aber auch zu einer höheren Überlebensrate (Le Goffic *et al.* 2006).

TLR7 wird vor allem von pDCs exprimiert und erkennt ssRNA, die durch Endozytose viraler Partikel in das Endosom gelangt (Diebold *et al.* 2004). Die Rolle des TLR7 bei Influenzainfektionen konnte in Experimenten mit Inzucht-Mausstämmen, wie C57BL/6, noch nicht eindeutig geklärt werden. In diesen Mäusen ist die Immunantwort gegen Influenza aufgrund von Mutationen und Deletionen in den Genen für *myxovirus resistance proteins 1* und *2* (Mx1 und Mx2) jedoch gestört (Staeheli *et al.* 1988). In Studien mit diesen Mäusen konnte keine Beteiligung des TLR7 an der Immunität gegen Influenza gezeigt werden (Jeisy-Scott *et al.* 2012), ebenso wenig eine Rolle der pDCs (GeurtsvanKessel *et al.* 2008; Wolf *et al.* 2009). In einer Studie mit Mx-exprimierenden Mäusen konnte dagegen gezeigt werden, dass sowohl der *knockout* von TLR7 als auch eine Depletion der pDCs zu einer höheren Letalität bei einer IAV-Infektion führte (Kaminski *et al.* 2012). Die Mx-Defizienz bei vielen Mausstämmen könnte daher die widersprüchliche Studienlage zu der Beteiligung des TLR7 an der IAV-Immunität erklären.

RIG-I spielt eine wichtige Rolle bei der Immunerkennung und Typ-I-IFN-Produktion in Epithelzellen, DCs und Alveolarmakrophagen (Kato *et al.* 2006). Bei einer Influenzainfektion werden verschiedene RNA-Strukturen durch RIG-I erkannt: zum einen werden durch die teilweise komplementären Genomenden kurze 5'ppp-dsRNA-Strukturen („*panhandle*“-Strukturen) gebildet, die einen Liganden für RIG-I darstellen (Liu *et al.* 2015a). Zum anderen wurde auch ein 5'Triphosphat-unabhängiger Mechanismus der Erkennung beschrieben, bei dem eine U/A-reiche Region aus der 3'UTR der Influenza-RNA von RIG-I erkannt wird (Davis *et al.* 2012). Einen weiteren Liganden stellen *defective interfering* (DI) Genome dar, die durch Deletionen in den Gensegmenten entstehen und längere dsRNA-Strukturen mit einem 5'Triphosphat enthalten. Diese stellen einen optimalen Liganden für RIG-I dar und werden gegenüber den partiell doppelsträngigen *panhandle*-Strukturen bevorzugt (Baum *et al.* 2010; Weber-Gerlach und Weber 2016). Es konnte gezeigt werden, dass eine experimentelle Stabilisierung der doppelsträngigen *panhandle*-Region durch die Entfernung von *mismatches* zu einer verringerten viralen Transkription und zu einer stärkeren RIG-I-Aktivierung und IFN-Induktion führt (Liu *et al.* 2015a), was darauf hindeutet, dass es sich bei der natürlichen Nukleotidzusammensetzung dieser Region um eine Evasionsstrategie handelt, die eine starke RIG-I-Aktivierung verhindert.

Replikation und Transkription sind für eine RIG-I-Aktivierung nicht zwingend notwendig, da RIG-I an die *panhandle*-Struktur der in die Zelle eintretenden Nukleokapside bindet und so bereits während der Eintrittsphase des Virus aktiviert wird (Weber *et al.* 2013).

Der Polymerasekomplex scheint jedoch vor einer Detektion durch RIG-I zu schützen, da in Experimenten die Dissoziation der Polymeraseuntereinheiten zu einer verstärkten RIG-I-Aktivierung führt. Denselben Effekt zeigt eine PB2-Variante mit einer geringeren NP-Affinität und einer damit assoziierten Instabilität des Nukleokapsids. (Weber *et al.* 2015) Neben der indirekten Restriktion der viralen Replikation durch Aktivierung von IRF3 und NFκB und der daraus resultierenden IFN-Produktion, kann RIG-I die virale Replikation auch direkt durch die Bindung an die viralen Nukleokapside hemmen, was in Experimenten mit einer mutierten RIG-I-Variante gezeigt wurde, die keine IFN-Antwort induzieren kann (Weber *et al.* 2015). Onomoto *et al.* (2012) konnten zeigen, dass während einer Influenzainfektion antivirale Stress-Granula gebildet werden, in denen RIG-I lokalisiert ist. Diese Stress-Granula sind essentiell für die IFN-Produktion, da sie vermutlich eine räumliche Nähe zwischen RIG-I und der viralen RNA herstellen, sodass diese effektiver erkannt wird. Zudem werden antivirale Proteine zu den Stress-Granula rekrutiert, was die Inhibition der viralen Replikation ermöglicht ohne die Translation der Wirtszelle stark zu beeinträchtigen.

Es konnte gezeigt werden, dass MDA5 für eine Produktion von Typ-I-Interferonen während einer Influenzainfektion nicht benötigt wird (Kato *et al.* 2006), was für eine alleinige Rolle von RIG-I bei der zytosolischen Erkennung einer Influenzainfektion spricht. Neuere Studien deuten jedoch darauf hin, dass auch MDA5 eine Rolle bei der Abwehr einer Influenzainfektion spielt, möglicherweise durch einen IFN-unabhängigen Mechanismus (Benitez *et al.* 2015). Da Influenzaviren während ihres Replikationszyklus keine langen dsRNA-Intermediate produzieren, werden vermutlich bislang nicht identifizierte Strukturen während einer Influenzainfektion durch MDA5 erkannt.

Eine weitere zelluläre Abwehrstruktur, die durch eine Influenzainfektion aktiviert wird, ist der NLRP3-Inflammasom-Komplex. Dieser setzt sich aus verschiedenen Proteinen zusammen: *NOD*-, *LRR* and *pyrin domain-containing 3* (NLRP3), dem Adaptorprotein ASC und der Pro-Caspase-1. NLRP3 wird von myeloiden Zellen, wie Monozyten, Makrophagen, DCs, aber auch von bronchialen Epithelzellen exprimiert (Guarda *et al.* 2011; Pothlichet *et al.* 2013). Infolge einer Aktivierung des Komplexes, beispielsweise durch eine Zellschädigung, kommt es zu einer Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen. Dafür sind zwei Signale notwendig. Das erste Signal wird durch die Stimulation von TLRs und/oder dem IL-1 Rezeptor induziert und bewirkt die Translation von Pro-IL-1β, Pro-IL-18 und Pro-IL-33. Das zweite Signal bewirkt die Aktivierung und Spaltung der Pro-Caspase-1 und wird durch Erkennung von DAMPs, welche durch Schädigungen der Wirtszelle entstehen, induziert. Die aktivierte Caspase-1 bewirkt die Spaltung von Pro-IL-1β und Pro-IL-18 in ihre reife Form, die anschließend von der

Zelle sezerniert wird. Das 2. Signal wird während einer Influenzainfektion zum einen durch den M2-induzierten Protonenstrom in das Golgi-Netzwerk induziert (Ichinohe *et al.* 2010), zum anderen durch aggregiertes PB1-F2-Protein in Lysosomen (McAuley *et al.* 2013).

Wie in Abschnitt 1.3 beschrieben, führt die Stimulation der TLRs und der RIG-I-ähnlichen Rezeptoren über die Aktivierung von IRF3 bzw. IRF7 zur Produktion von Typ-I-Interferonen. Über die Bindung an den IFN-Rezeptor auf der infizierten Zelle und auf den umliegenden Zellen wird der JAK/STAT-Signalweg induziert. Hierbei assoziiert IRF9 mit den phosphorylierten Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT2. Dieser Komplex gelangt in den Zellkern und bindet an *IFN stimulated response elements* (ISRE), was die Transkription zahlreicher *IFN stimulated genes* (ISG) bewirkt und so einen antiviralen Status sowohl in den infizierten Zellen als auch in den umliegenden Zellen induziert. (Ivashkiv und Donlin 2013) Zu den wichtigsten ISGs zählen das humane MxA-Protein, die RNA-aktivierte Proteinkinase (PKR), die IFN-induzierten Transmembranproteine (IFITMs), die *IFN-induced proteins with tetratricopeptide repeats* (IFITs) und das 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase (OAS)/RNase L-System (McNab *et al.* 2015). Einige dieser ISGs interagieren mit der viralen RNA und regulieren die virale oder zelluläre mRNA Translation (Li *et al.* 2015). So wird die PKR durch virale dsRNA aktiviert und phosphoryliert die alpha-Untereinheit des eukaryotischen Initiationsfaktors 2 (eIF2), wodurch die Translation von mRNAs inhibiert wird (Levin und London 1978). IFIT-Proteine binden an virale RNA mit einem 5'-Triphosphat und inhibieren die virale Replikation und Translation (Pichlmair *et al.* 2011).

Auch das OAS/RNase L-System wird durch dsRNA aktiviert und führt sowohl zur Degradation von viraler ssRNA als auch von zellulärer RNA, wodurch zum einen die virale Proteinsynthese gehemmt wird und zum anderen zelluläre Prozessen gestört werden, die für die virale Replikation benötigt werden (Silverman 2007). Außerdem kommt es dadurch zu einer Amplifikation der antiviralen Immunantwort, da die entstehenden RNA-Fragmente wiederum stimulatorisch auf MDA5 und RIG-I wirken (Malathi *et al.* 2007).

Um diese antiviralen Mechanismen zu umgehen, haben Influenzaviren zahlreiche Gegenstrategien entwickelt, von denen einige bereits erwähnt wurden. Eine Strategie ist das „Verstecken“ von PRR-Liganden. Ein Beispiel dafür ist die Bindung von dsRNA durch das NS1-Protein und die Maskierung der *panhandle*-Struktur durch den Polymerasekomplex, was die Aktivierung von dsRNA-erkennenden Proteinen inhibiert oder abschwächt (Min und Krug 2006; Weber *et al.* 2015). Eine weitere Strategie ist die direkte Interaktion mit Komponenten der antiviralen Signalwege. Solche Mechanismen sind für mehrere Influenzaproteine bekannt. NS1 interagiert beispielsweise mit der

Ubiquitinligase TRIM25, die die Ubiquitylierung der CARD-Domäne von RIG-I vermittelt. Durch die Interaktion mit NS1 wird die Ubiquitylierung verhindert und so die RIG-I-vermittelte Signaltransduktion inhibiert (Gack *et al.* 2009). Studien deuten darauf hin, dass NS1 nicht nur indirekt durch Bindung von dsRNA die RIG-I- und PKR-abhängige Signalwege inhibiert, sondern auch durch die direkte Interaktion mit diesen Proteinen ihre Funktion einschränkt (Li *et al.* 2006; Mibayashi *et al.* 2007). Durch die NS1-vermittelte Degradation des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors 4B (eIF4B) wird außerdem die Expression von IFITM3 reduziert, welches als ISG eine wichtige Rolle bei der Restriktion der Virusreplikation spielt (Wang *et al.* 2014a). Auch für die Polymeraseuntereinheiten PB2, PB1 und PA konnte eine Inhibition der RIG-I-vermittelten Aktivierung des IFN β -Promotors durch die direkte Interaktion mit MAVS nachgewiesen werden (Graef *et al.* 2010; Iwai *et al.* 2010). Das Protein PB2-F2, welches nicht in allen Influenzaviren zu finden ist und mit einer hohen Virulenz assoziiert ist, interferiert ebenfalls mit RIG-I/MAVS und inhibiert so die IFN-Antwort, was zu einer verstärkten Pathogenität *in vivo* führt (Dudek *et al.* 2011). Eine weitere Strategie zur Unterdrückung der antiviralen Immunantwort ist das Maskieren von viralen PRR-Liganden als „Selbst“-Struktur. Einen solchen Mechanismus stellt beispielsweise die bereits in Abschnitt 1.3.3 erwähnte 2'-O-Methylierung der viralen mRNA Cap-Struktur dar. Diese wurde für Flaviviren und Coronaviren beschrieben und führt zu einer reduzierten viralen Sensitivität für die Suppression durch IFIT-Proteine bzw. zu einer geringeren MDA5-vermittelten IFN-Produktion (Daffis *et al.* 2010; Züst *et al.* 2011). Für Influenzaviren wurde bisher jedoch keine solche Maskierungsstrategie beschrieben (Zinzula und Tramontano 2013).

1.5 RNA-Modifikationen

RNA-Moleküle verschiedenster Organismen enthalten neben den vier Standardnucleosiden Adenosin, Guanosin, Uracil und Cytidin zahlreiche modifizierte Nucleoside. Mehr als 100 verschiedene Modifikationen sind bisher bekannt (Machnicka *et al.* 2013). Sie entstehen während der RNA-Reifung durch Enzym-katalysierte, chemische Veränderungen an den Primärtranskripten. Ihre Menge und Verteilung ist dabei stark abhängig vom Organismus, aus dem die RNA stammt und von der Art der RNA. Generell steigt der Gehalt an Modifikationen mit der evolutionären Entwicklung von Organismen. So enthält RNA aus Säugerzellen deutlich mehr Modifikationen als bakterielle RNA. Aufgrund dieser Unterschiede kann auf dieser Ebene auch eine Unterscheidung von Selbst- und Fremd-RNA durch das angeborene Immunsystem erfolgen und so eine Regulation von Immunantworten stattfinden (Kariko *et al.* 2005). Modifizierte Nucleoside konnten bisher in zahlreichen RNA-Typen nachgewiesen

werden, darunter ribosomale RNA (rRNA), mRNA, *small nuclear* RNA (snRNA), Mikro-RNA (miRNA), *small interfering* RNA (siRNA) und Transfer-RNA (tRNA), wobei rRNA und tRNA den größten Anteil an Modifikationen aufweisen. (Kariko *et al.* 2005; Machnicka *et al.* 2013; Yi und Pan 2011) Man unterscheidet dabei Modifikationen an der Base und an der 2'-Hydroxylgruppe der Ribose. Sie können durch das enzymatische Entfernen, Anfügen oder den Austausch von chemischen Gruppen entstehen. Eine der häufigsten Modifikationen ist dabei das Anfügen einer Methylgruppe. Die 2'-O-Methylierungen an der Ribose können an allen vier Standardnukleosiden auftreten. Beispiele für die Methylierung von Basen sind das N6-Methyladenosin (m^6A) und das 5-Methylcytosin. Die Methylierungen können dabei an verschiedenen Stellen im Basenring angefügt sein. Beim 5-Methylcytosin ist das 5. Atom im Pyrimidinring methyliert, N6-Methyladenosin entsteht durch die Methylierung der Aminogruppe an Position 6 des Ringsystems (s. Abbildung 1.3).

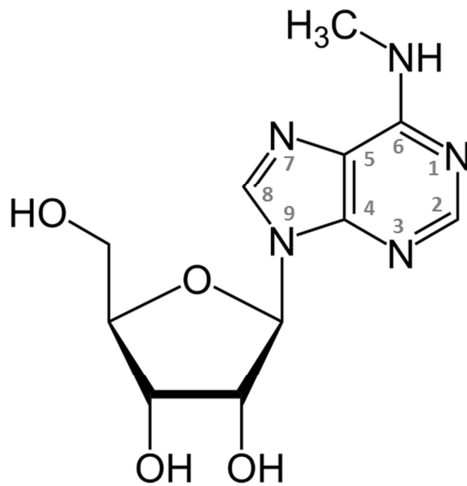


Abbildung 1.3: Strukturformel von N6-Methyladenosin (m^6A). N6-Methyladenosin entsteht durch das Anfügen einer Methylgruppe an die Aminogruppe der Position 6 im Purinring. Die Nummern der Atome im Purinkern sind in grau dargestellt.

Neben der Veränderung einzelner chemischer Gruppen, finden auch größere Veränderungen an den Basen statt. Ein Beispiel dafür ist die Isomerisierung von Uridin zu Pseudouridin.

Mit dem breiten Spektrum an RNA-Modifikationen steht der Zelle ein Mechanismus zur Verfügung, mit dem sich die Information der RNA ohne eine Veränderung ihrer Sequenzabfolge erweitern lässt. Durch ihren Einfluss auf die Struktur der RNA beeinflussen die Modifikationen auch die RNA-Stabilität und können so die Expression von Genen und damit zahlreiche zelluläre Prozesse regulieren (Meyer und Jaffrey 2014). Indem sie die Zugänglichkeit von RNA-Bindungsstellen für regulatorische Proteine verändern, können sie direkt Einfluss auf RNA-Protein-Interaktionen nehmen und so beispielsweise die Translationseffizienz und das Spleißen beeinflussen (Meyer *et al.* 2015; Zhao *et al.* 2014; Zhou *et al.* 2015). Diese Mechanismen wurden für m^6A

beschrieben, die genauen Funktionen vieler anderer Modifikationen sind jedoch noch nicht geklärt.

1.5.1 N6-Methyladenosin

1.5.1.1 Vorkommen und Regulation

N6-Methyladenosin (m^6A) ist die am häufigsten vorkommende Modifikation in eukaryotischer mRNA und ist in zahlreichen Organismen zu finden, darunter Bakterien, Hefen, Pflanzen und Säugetiere (Bodi *et al.* 2010; Deng *et al.* 2015; Dominissini *et al.* 2012; Meyer *et al.* 2012; Nichols 1979). Sie wurde 1974 zum ersten Mal in mRNA nachgewiesen, kommt aber auch in rRNA, snRNA, *long non-coding* RNA (lncRNA) und tRNA vor (Desrosiers *et al.* 1974; Machnicka *et al.* 2013). Insgesamt sind etwa 0,1 bis 0,4% aller Adenosine durch N6-Methylierung modifiziert (Dubin und Taylor 1975; Perry *et al.* 1975). Enzymatische Studien mit isolierter RNA konnten zeigen, dass die Methylierung in der Konsensussequenz RRm⁶ACH ([G/A/U][G>A]m⁶AC[U>A>C]) auftritt. Demnach ist das Motiv GGACU die am häufigsten methylierte Sequenz (Csepany *et al.* 1990; Harper *et al.* 1990; Kane und Beemon 1985). Diese Konsensussequenz konnte auch in späteren Transkriptom-weiten Analysen durch *next generation sequencing* (NGS) bestätigt werden. Eine Anreicherung von N6-methylierten Adenosinen konnte dabei in mehr als 7000 Transkripten, vor allem in den 3' untranslatierten Regionen (UTR), in der Nähe von Stopcodons und in langen, internen Exons beobachtet werden. Diese Anreicherungen wiesen eine starke Konservierung zwischen dem murinen und humanen Transkriptom, sowie zwischen gesundem Gewebe und Tumorgewebe auf, was eine elementare Rolle dieser Modifikation in zellulären Prozessen nahelegt. Nur für einzelne m^6A -Stellen konnte eine Veränderung unter Zellstressbedingungen beobachtet werden. (Dominissini *et al.* 2012; Meyer *et al.* 2012) Auch in 5'-UTRs konnte eine vermehrte Adenosin-N6-Methylierung unter Zellstress-Bedingungen nachgewiesen werden (Zhou *et al.* 2015). Der Unterschied zwischen der statistischen Häufigkeit des Motivs und dem Anteil an N6-methylierten Adenosinen macht deutlich, dass nicht jede Konsensussequenz methyliert wird. Auch konnte gezeigt werden, dass der Methylierungsstatus an einer Stelle in humaner lncRNA oder mRNA zwischen 6% und 80% variieren kann (Liu *et al.* 2013).

Der Methylierungsstatus des Transkriptoms ist nicht statisch, sondern unterliegt dynamischen Prozessen. In den letzten Jahren konnte die Beteiligung diverser Enzyme an diesen Prozessen nachgewiesen werden (s. Abbildung 1.4). Die N6-Methylierung von Adenosin wird durch einen Multiproteinkomplex katalysiert, der aus den Enzymen *Methyltransferase-like* 3 und 14 (METTL3, METTL14), dem Wilms Tumor1-assozierten

Protein (WTAP) und dem Protein KIAA1429 besteht. S-Adenosylmethionin dient dabei als Methyl donor. Der Kern des Komplexes wird von METTL3 und METTL14 gebildet, WTAP und KIAA1429 stellen regulatorische Untereinheiten dar (Bokar *et al.* 1997; Liu *et al.* 2014; Schwartz *et al.* 2014). METTL3 und METTL14 weisen beide eine Methyltransferaseaktivität auf, die sich bei Mischung beider Komponenten synergistisch verstärkt. Für beide Enzyme konnte *in vitro* eine Sequenzspezifität für das Konsensusmotiv nachgewiesen werden (Liu *et al.* 2014). WTAP bindet an den METTL3-METTL14-Komplex und führt zu einer Translokation des Komplexes zu Strukturen im Kern (*nuclear speckles*), welche eine hohe Dichte an *Splicing*-Faktoren aufweisen (Ping *et al.* 2014). Die Lokalisation von METTL3, METTL14 und WTAP in *nuclear speckles* spricht dafür, dass die N6-Methylierung von Adenosin im Kern stattfindet. Jedoch konnte in anderen Studien auch eine Methyltransferaseaktivität in zyttoplasmatischen Extrakten und eine zyttoplasmatische Lokalisation von METTL3 in embryonalen Stammzellen und humanen Krebszellen nachgewiesen werden (Chen *et al.* 2015; Harper *et al.* 1990; Lin *et al.* 2016). Ob die zyttoplasmatische Lokalisation von METTL3 auch mit einer zyttoplasmatischen Methylierung von RNA *in vivo* einhergeht, ist bislang ungeklärt.

Als Demethylasen für m⁶A wurden die Enzyme AlkB Homolog 5 (AlkBH5) und das *fat mass and obesity-associated protein* (FTO) identifiziert (Jia *et al.* 2011; Zheng *et al.* 2013). Beide Enzyme gehören zur Familie der AlkB-Proteine, welche Fe(II)- und α -Ketoglutarat-abhängige oxidative Demethylierungen von RNA und DNA katalysieren. In *in vitro*-Studien wurde FTO zunächst als Demethylase für N3-Methylthymidin in ssDNA und N3-Methyluridin in ssRNA identifiziert (Gerken *et al.* 2007; Jia *et al.* 2008). Einige Jahre später konnte gezeigt werden, dass m⁶A *in vitro* und *in vivo* ein Hauptsubstrat für FTO darstellt (Jia *et al.* 2011). Ein Einzelnukleotid-Polymorphismus im ersten Intron von FTO wird mit einem erhöhten Körpermasseindex und einem erhöhten Risiko für Übergewicht in der Bevölkerung assoziiert, woraus der Name für das Enzym abgeleitet wurde (Dina *et al.* 2007; Frayling *et al.* 2007). Sowohl AlkBH5 als auch FTO sind, wie der Methyltransferasekomplex, in *nuclear speckles* lokalisiert (Jia *et al.* 2011; Zheng *et al.* 2013).

Neben den Methyltransferasen und Demethylasen wurden in *pull-down*-Experimenten mit anschließender Massenspektrometrie die Proteine 1-3 der YTH-Familie als potentielle Bindungsproteine für m⁶A identifiziert (Dominissini *et al.* 2012). In späteren Studien wurden diese Proteine als *reader*-Proteine für m⁶A identifiziert: sie binden durch ihre YTH-Domäne an die Methylierung innerhalb des Konsensusmotivs und steuern so m⁶A-abhängige Prozesse (Li *et al.* 2014; Wang *et al.* 2014b; Zhang *et al.* 2010). Für *YTH-domain family member 2* (YTHDF2) wurde gezeigt, dass es durch die

Interaktion mit m⁶A-haltiger mRNA den Transport zu *processing bodies* und so den Abbau der mRNA fördert (Wang *et al.* 2014b). Laut einer Studie aus dem Jahr 2015 weist YTHDF1 eine gegenteilige Funktion auf und fördert die Translation von m⁶A-enthaltenden mRNAs, indem es mit der zellulären Translationsmaschinerie interagiert (Wang *et al.* 2015). Shi *et al.* konnten zeigen, dass YTHDF3 in Synergie mit YTHDF1 die Translation methylierter Transkripte verstärkt und durch eine Kooperation mit YTHDF1 und YTHDF2 die Translation und den Abbau von mRNAs reguliert. Dies deutet auf eine Interaktion der YTHDF-Proteine hin, die den RNA-Metabolismus in der Zelle m⁶A-abhängig reguliert (Shi *et al.* 2017). Auch die Proteine hnRNPA2B1 und hnRNPC wurden als m⁶A *reader* identifiziert. Für beide Proteine konnte eine Rolle bei der Regulation des mRNA-Spleißens nachgewiesen werden, hnRNPA2B1 spielt außerdem eine Rolle bei der Prozessierung von miRNAs (Alarcon *et al.* 2015; Liu *et al.* 2015b). HnRNPC bindet an m⁶A-induzierte Sekundärstrukturen der mRNA. Der Mechanismus der Bindung von hnRNPA2B1 an m⁶A ist dagegen noch nicht geklärt.

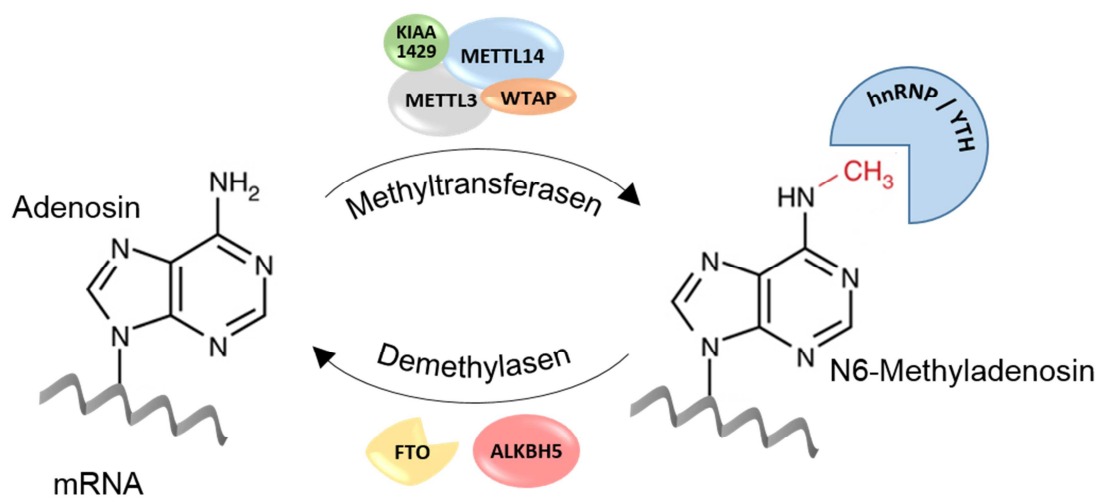


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Regulation von N6-Methyladenosin. Die Methylierung wird durch einen Multiproteinkomplex, bestehend aus METTL3, METTL14, WTAP und KIAA1429, vermittelt. Das Entfernen der Methylierung wird durch Demethylasen wie FTO und AlkBH5 katalysiert. Zu den Proteinen, die an m⁶A binden und seine Funktion vermitteln, zählen die YTH- und die hnRNP-Proteine. Modifiziert nach Zhao *et al.* (2017).

1.5.1.2 Funktionen von N6-Methyladenosin

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass nahezu alle Schritte des RNA-Metabolismus von m⁶A reguliert werden, was wiederum zahlreiche physiologische Prozesse beeinflusst.

Obwohl m⁶A keinen Einfluss auf die Watson-Crick-Basenpaarung hat, kann es die Sekundärstruktur der RNA verändern und bestimmte Strukturen für RNA-bindende Proteine, wie das hnRNPC, zugänglich machen (Liu *et al.* 2015b). Dominissini *et al.* (2012) konnten nachweisen, dass Transkripte, welche durch alternatives Spleißen

prozessiert werden, besonders viele Adenosin-N6-Methylierungen aufweisen und diese vor allem in den Exons auftreten. Passend dazu konnte gezeigt werden, dass durch FTO-Depletion induzierte, erhöhte m⁶A-Level die Bindung des Serin/Arginin-reichen Splicingfaktors 2 und damit den Erhalt der Target-Exons bei der RNA-Prozessierung fördern (Zhao *et al.* 2014). Für eine Rolle von m⁶A bei der mRNA-Reifung spricht ebenfalls die Lokalisation der Methyltransferasen und Demethylasen in den *nuclear speckles*. Die Depletion von METTL3 führt außerdem zu einer Inhibition des mRNA-Kernexports in humanen und murinen Zellen, während die AlkBH5-Defizienz den gegenteiligen Effekt induziert (Fustin *et al.* 2013; Zheng *et al.* 2013). Auch die Translation von mRNAs wird nachweislich durch m⁶A beeinflusst. Zum einen konnte gezeigt werden, dass durch die Bindung von YTHDF1 an methylierte Transkripte die Translation durch die Interaktion mit Initiationsfaktoren verstärkt wird (Wang *et al.* 2015), zum anderen konnte ein Mechanismus beschrieben werden, durch den METTL3 die Translation von Onkogenen in humanen Krebszellen durch die Rekrutierung von eIF3 fördert (Lin *et al.* 2016). Dieser Mechanismus ist unabhängig von der Methyltransferaseaktivität des Enzyms. Des Weiteren wurde gezeigt, dass unter Stressbedingungen bestimmte mRNAs in ihrer 5'UTR durch m⁶A modifiziert werden, was zu einer selektiven Translation dieser RNAs führt (Zhou *et al.* 2015). Laut Meyer *et al.* (2015) kann m⁶A in der 5'UTR eine *cap*-unabhängige Translationsinitiation bewirken. Der letzte Schritt des RNA-Metabolismus, der Abbau von mRNA, wird ebenfalls durch m⁶A reguliert. Generell wurden m⁶A-Modifikationen mit einer reduzierten RNA-Stabilität in Verbindung gebracht, da eine reduzierte Expression der Methyltransferasen die Expression ihrer Target-RNAs erhöht (Liu *et al.* 2014). Ob dies das Resultat einer direkten Destabilisierung durch m⁶A oder von indirekten Regulationsmechanismen ist, ist bislang jedoch nicht geklärt. Allerdings konnte, wie in Abschnitt 1.5.1.1 bereits erwähnt, gezeigt werden, dass die Interaktion von m⁶A-haltiger RNA mit YTHDF2 den Transport zu *processing bodies* bewirkt und den Abbau der methylierten RNA beschleunigt. Da die m⁶A-bindenden Proteine zum Teil gegensätzliche Funktionen aufweisen, wird vermutet, dass die Modifikation durch m⁶A eine Möglichkeit bietet, die Expression von Genen relativ schnell kurzfristigen Bedürfnissen der Zelle anzupassen. Die Methyltransferasen und Demethylasen könnten dabei den Gehalt von m⁶A in bestimmten RNAs vorgeben, die dann durch die *reader*-Proteine in bestimmte funktionelle Gruppen für erhöhte Translation oder Abbau sortiert werden (Zhao *et al.* 2017).

Viele Studien deuten darauf hin, dass m⁶A durch die Regulation des RNA-Metabolismus zahlreiche zelluläre Prozesse beeinflusst. Beispielsweise führt die Inhibition von Methylierungsprozessen zu einer Verlängerung des circadianen

Rhythmus in Zelllinien und in Mäusen. *Clock*-Gentranskripte weisen dabei einen reduzierten Gehalt an m⁶A auf und werden verstärkt im Kern zurückgehalten. Eine ähnliche Verlangsamung der RNA-Prozessierung konnte durch einen METTL3-*knockdown* erzielt werden. (Fustin *et al.* 2013)

AlkBH5-defiziente Mäuse weisen einen erhöhten m⁶A-Gehalt in ihrer mRNA auf und zeigen eine gestörte Spermatogenese, die mit einer reduzierten Expression beteiligter Gene und einer verringerten Fruchtbarkeit einhergeht (Zheng *et al.* 2013). In murinen embryonalen Stammzellen (mESCs) konnte durch Microarray-Analysen eine verringerte Expression von Pluripotenzfaktoren als Resultat eines METTL3- und METTL14-*knockdowns* nachgewiesen werden, was für eine Rolle von m⁶A bei der Stammzelldifferenzierung spricht (Wang *et al.* 2014c). Im Widerspruch dazu konnten Geula *et al.* (2015) in METTL3-*knockout* mESCs eine reduzierte Expression von differenzierungsassoziierten Genen, eine verstärkte Expression von Pluripotenzgenen und den Erhalt des naiven Zellstatus beobachten, was die embryonale Letalität eines METTL3-*knockouts* erklären könnte. Viele dieser Studien haben den Einfluss von m⁶A auf zelluläre Prozesse indirekt durch das Ausschalten der Methyltransferasen oder Demethylasen untersucht. Über den unmittelbaren Einfluss bestimmter m⁶A-Modifikationen ist bislang wenig bekannt. Ebenso wenig ist klar, inwieweit Adenosin-N6-Methylierungen durch Unterschiede in ihrer Position, Verteilung oder Häufigkeit unterschiedliche zelluläre Effekte vermitteln.

1.5.1.3 N6-Methyladenosin bei Viren

Wie bereits erwähnt, ist die m⁶A-Modifikation evolutionär konserviert und in Organismen verschiedener Spezies zu finden. Da Viren bei der Replikation auf die Wirtszelle angewiesen sind und die gleichen Enzyme und Prozesse für ihre Zwecke nutzen, ist es wahrscheinlich, dass auch sie die Regulationsmechanismen dieser Modifikation nutzen. Tatsächlich konnten in der mRNA von verschiedenen Viren, die im Kern replizieren, m⁶A gefunden werden. Unter diesen Viren befindet sich das Simian-Virus 40, das Rous-Sarcoma-Virus (RSV), das Adenovirus und das Influenza-A-Virus (IAV) (Kane und Beemon 1985; Krug *et al.* 1976; Lavi und Shatkin 1975; Narayan *et al.* 1987; Sommer *et al.* 1976). Obwohl das Vorkommen von m⁶A in viraler RNA seit mehr als 40 Jahren bekannt ist, wurde erst im Jahr 2016 die erste Studie veröffentlicht, die einen Einfluss von m⁶A auf die Funktion viraler mRNA zeigt: Kennedy *et al.* (2016) konnten zum einen die Lokalisation von m⁶A in HIV-1 mRNA durch *photocrosslinking*-unterstützte m⁶A-Sequenzierung präzise bestimmen und zum anderen einen positiven Einfluss der m⁶A-Modifikationen auf die virale Genexpression nachweisen, welcher durch die Rekrutierung der YTHDF-Proteine vermittelt wird. Im gleichen Jahr

identifizierten auch Lichinchi *et al.* (2016a) die Positionen von m⁶A-Modifikationen in HIV-mRNA und konnten zeigen, dass die Virusinfektion zu einer generellen Steigerung des m⁶A-Gehalts sowohl in zellulären als auch viralen Transkripten führt und dass eine veränderte Expression von METTL3, METTL14 und AlkBH5 die virale Replikation beeinflusst. N6-methylierte Adenosine konnten ebenso in genomischer RNA von Hepatitis-C-Viren, Dengue-Viren, Zika-Viren, Gelbfieber-Viren und West-Nil-Viren identifiziert werden, welche zur Familie der *Flaviviridae* zählen und ein positivsträngiges RNA-Genom aufweisen (Gokhale *et al.* 2016). Dabei wurde ein negativer Einfluss der Modifikation auf die Produktion von Viruspartikeln festgestellt. Anders als die zuvor erwähnten Viren, replizieren Flaviviren nicht im Kern, sondern im Zytoplasma, was die Vermutung unterstützt, dass die N6-Methylierung von Adenosin auch im Zytoplasma stattfinden kann (Chen *et al.* 2015; Harper *et al.* 1990; Lin *et al.* 2016). Welchen Einfluss m⁶A in der mRNA anderer Viren, beispielsweise der Influenzaviren, auf die Replikation hat, ist bislang nicht bekannt.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit soll N6-Methyladenosin in der mRNA des Influenzastammes A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) (PR8) nachgewiesen werden und der Einfluss von m⁶A auf die Replikation der Influenzaviren untersucht werden. Zwar deuten frühere Studien bereits darauf hin, dass die mRNA von Influenzaviren N6-Methyladenosin enthält, die genauen Positionen konnten jedoch mit den damals zur Verfügung stehenden Methoden nicht bestimmt werden (Krug *et al.* 1976; Narayan *et al.* 1987). Eine Methode für die Transkriptom-übergreifende Lokalisation von m⁶A wurde im Jahr 2012 von Dominissini *et al.* und Meyer *et al.* entwickelt und soll in dieser Arbeit für die Kartierung von m⁶A in der Influenza-mRNA eingesetzt werden. Für die Analyse sollen humane Zelllinien mit Influenzaviren infiziert und die zelluläre mRNA-Fraktion angereichert werden. Durch die Immunpräzipitation methylierter RNA-Fragmente und anschließendem *next generation sequencing* sollen gezielt die mRNAs der Influenzaviren auf die Präsenz von m⁶A untersucht werden.

Nach der Positionsbestimmung der methylierten Adenosine soll der Einfluss der Methylierung auf die Replikationsfähigkeit der Influenzaviren anhand ausgewählter m⁶A-Positionen untersucht werden. Die N6-Methylierung von Adenosin ist die häufigste Modifikation in eukaryotischer mRNA und wird durch einen Enzymkomplex aus verschiedenen Methyltransferasen innerhalb des Konsensusmotivs RRm⁶ACH katalysiert. Durch Bindung der YTHDF-Proteine, für die eine Rolle beim Abbau und bei der Translation von mRNA diskutiert wird, reguliert m⁶A wichtige Prozesse innerhalb der Zelle (1.5.1). Es ist daher anzunehmen, dass sich m⁶A auch auf die Replikation von

Viren auswirkt. So konnte für HIV bereits gezeigt werden, dass m⁶A-Modifikationen in der viralen mRNA die Translation viraler Proteine fördern (Kennedy *et al.* 2016).

Um die Auswirkungen von m⁶A auf die Replikation der Influenzaviren zu untersuchen, sollen rekombinante Influenzaviren mit Mutationen an bestimmten m⁶A-Positionen generiert werden. Diese Mutationen sollen die Methylierung an dieser Position der mRNA verhindern, sich jedoch nicht auf die Aminosäuresequenz des Proteins auswirken. Die Charakterisierung der Wachstumseigenschaften und der RNA- und Proteinexpression der Wildtyp-Viren im Vergleich zu den Viren mit reduziertem m⁶A-Gehalt soll den Einfluss von m⁶A auf die virale Replikation aufzeigen. Auch soll in Stimulationsversuchen mit humanen, primären Immunzellen untersucht werden, ob die verschiedenen rekombinanten Viren sich in der Höhe der induzierten Interferonantwort unterscheiden, da bereits bekannt ist, dass m⁶A das immunstimulatorische Potential von RNA reduzieren kann (Kariko *et al.* 2005).

Ergänzend zu diesen Fragestellungen soll überprüft werden, ob die Expression der m⁶A-assoziierten Enzyme während einer Influenzainfektion reguliert wird. Eine erhöhte oder reduzierte Expression der Methyltransferasen, Demethylasen oder der *reader*-Proteine stellt ein zusätzliches Indiz für die Bedeutung von m⁶A während einer Influenzainfektion dar und kann zum anderen Hinweise darauf geben, welche Enzyme an der Steuerung m⁶A-abhängiger Prozesse während der Infektion beteiligt sind.

Aus diesen Informationen könnte sich ein Ansatzpunkt für neue Therapien gegen Influenzaviren ergeben, die auf dem Eingriff in den Methylierungsprozess basieren.

2 Material

2.1 Geräte

Gerät	Modell	Firma, Firmensitz
Analysewaage	R160P-D1	Satorius GmbH, Göttingen
Bakterieninkubator	Innova 4200	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Bioanalyser	Agilent 2100 Bioanalyser	Agilent, Santa Clara, USA
Blot-Imager System	ChemiDoc XRS	BioRad, Hercules, USA
Blotmodul	Xcell II Mini Cell (EI9001)	Novex, San Diego, USA
Eismaschine	AF 10	Scotsman Ice Systems, Ipswich, UK
Fluorometer	Qubit®	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Gel-Imager System		Fröbel Labortechnik, Lindau
Heizblock	TS-100 Thermoshaker	PeqLab, Erlangen
HPLC	Dionex Ultimate 3000 System	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Inkubator (Zellkultur)	HERA cell 240	Heraeus, Hanau
Luminometer	Orion II Microplate	Berthold Detection Systems, Pforzheim
Magnetrührer	MR 2002	Heidolph, Schwabach
Mikroliterpipetten		Eppendorf, Hamburg
Mikroplattenwaschgerät	Skan Washer 400	Molecular Devices, Ismaning
Mikroskop	Labovert	Leitz, Bielefeld
pH-Meter	pH523	WTW, Weilheim
Pipettierhilfe	Pipetboy comfort	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Plattenphotometer	Emax	Molecular Devices, Ismaning
Präzisionswaage	P1000	Mettler Toledo, Gießen
Rüttler	REAX 2000	Heidolph, Schwabach
Spektrometer	NanoDrop-1000	Thermo Scientific,

		Wilmington, USA
Thermocycler	iCycler	BioRad, Hercules, USA
Thermocycler qPCR	MJ Mini	BioRad, Hercules, USA
Tischzentrifugen	Picofuge	Stratagene, Amsterdam, NL
Wasserbad	-	Köttermann Labortechnik, Uetze/Hänigsen
Werkbank	LaminAir HLB 2448	Heraeus, Hanau
Zählkammer	Neubauer, improved	W. Schreck, Hofheim

2.2 Chemikalien

Chemikalien	Firma, Firmensitz
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Acetonitril (HPLC-grade)	Roth, Karlsruhe
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agarose „UltraPure™“	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid (NH₄Cl)	Roth, Karlsruhe
Ampicillin Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Bicin	Roth, Karlsruhe
BIS-TRIS	Roth, Karlsruhe
Bovine Serum Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Chloroformisoamylalkohol	AppliChem, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
Di-Natrium-EDTA	Roth, Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na₂HPO₄ x 2H₂O)	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	PJK, Kleinblittersdorf
DOTAP Transfection Reagent	Roth, Karlsruhe
Essigsäure (C₂H₄O₂)	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure EDTA	Roth, Karlsruhe

Glycerol	Roth, Karlsruhe
Guanidiniumthiozyanat	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Igepal-CA-630	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogencarbonat KHCO_3	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat KH_2PO_4	Roth, Karlsruhe
Kanamycinsulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
LB Medium	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumacetat	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Methanol (HPLC-grade)	Roth, Karlsruhe
MOPS	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid (NaF)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphatdihydrat $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	Roth, Karlsruhe
Natriumvanadat (Na_3VO_4)	Roth, Karlsruhe
Natronlauge, 1N	Roth, Karlsruhe
o-Phenylendiamin-Tabletten	Sigma-Aldrich, München
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe
Phenol, wassergesättigt	Roth, Karlsruhe
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCL)	Merck, Darmstadt
Sarkosyl	Sigma-Aldrich, Steinheim
Schwefelsäure (H_2SO_4)	Roth, Karlsruhe
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim
TRIS-Acetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris-Base	Roth, Karlsruhe

Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Serva, Heidelberg
Tween20	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid 30% (H₂O₂)	AppliChem, Darmstadt
Zinkchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zitronensäure (C₂H₈O₇)	Roth, Karlsruhe

2.3 Puffer

Puffer	Zusammensetzung
10x PBS-Puffer	2.7 mM KCl, 1.5 mM KH ₂ PO ₄ , 137 mM EDTA, 6.5 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7.4
4% Paraformaldehyd in PBS^{def}	4 g PFA ad 100 ml PBS ^{def}
50x TAE-Puffer	40 mM Tris, 0.1% Essigsäure, 1 mM EDTA in H ₂ O
6x Probenpuffer (Lämmli, für SDS PAGE)	12% SDS, 12.5% 2-Mercaptoethanol, 60% Glycerol, 0.375 mM TrisBase, pH 6.8 mit HCl einstellen, gesättigte Bromphenolblaulösung zugeben
Blockpuffer (ELISA)	1% BSA, 0.05% Tween20 in 1x PBS
Blockpuffer (Western Blot)	5% Milchpulver, 0.1% Tween20 in 1x PBS
DEPC-H₂O	1 ml DEPC ad 1 l ddH ₂ O, 2x autoklavieren
Eluent A (HPLC)	5 mM Ammoniumacetat in HPLC-grade H ₂ O, pH auf 6.0 mit 10% Essigsäure einstellen
Eluent B (HPLC)	40% Acetonitril in HPLC-grade H ₂ O
Eluent C (HPLC)	66% Methanol in HPLC-grade H ₂ O
Eluent D (HPLC)	20% Methanol in HPLC-grade H ₂ O
FACS-Puffer	2% FCS, 0.01% Na-Azid, 2 mM EDTA in PBS ^{def}
Firefly-Assay-Puffer	470 µM D-Luziferin 270 µM Coenzym A 33,3 µM DTT 530 µM ATP

	1,07 mM $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 2,76 mM MgSO_4 20 mM Tricin 0,1 mM EDTA
IP-Puffer, 5x	50 mM Tris-HCl, 750 mM NaCl, 0,5% (vol/vol) Igepal-CA-630 in upH_2O
Liposomen-Puffer	20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.1% in DEPC; pH 7.4 → 3h rühren, 2x autoklavieren
Lösung D	4 M Guanidiniumthiozyanat, 25 mM Natriumcitrat, pH 7.0, 0,5% (wt/vol) Sarkosyl, kurz vor Gebrauch 0,1 M 2-Mercaptoethanol zugeben
Lysepuffer für DNA-Isolation	10 mM TrisHCL (pH8.0), 25 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,5% SDS in ddH_2O
MOPS-Puffer, pH 7.0	2 M MOPS, 50 mM $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$, 10 mM EDTA in ddH_2O
Substratpuffer (ELISA)	38 mM $\text{C}_2\text{H}_8\text{O}_7$, 66 mM Na_2HPO_4 , pH 5.0
Transferpuffer (Western Blot)	25 mM Bicine, 25 mM BisTris, 1 mM EDTA, pH 7.2
Waschpuffer (ELISA)	0.05% Tween20 in 1x PBS
Waschpuffer (Western Blot)	0.1% Tween20 in 1x PBS

2.4 Reagenzien

Name	Firma, Firmensitz
6x DNA Loading Dye	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Brilliant II SYBR Green Master Mix	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
DOTAP	Roth, Karlsruhe
Dream Taq Green PCR Master Mix	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Glycogen (5 mg/ml)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Humanes IFN-alpha	Peprtech, Rocky Hill, USA
Humanes IL-6 (rekombinant)	Peprtech, Rocky Hill, USA
Lipofectamine 2000	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Pancoll Human	PAN-Biotech, Aidenbach
Protease Inhibitor Cocktail	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Protein A-Sepharose® 4B Conjugate	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

Reporter Lysis Buffer 5x	Promega, Mannheim
RIPA-Puffer	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
SuperSignal™ West Dura	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
SuperSignal™ West Femto	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
SYBR Gold	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Taq PCR Master Mix	Qiagen, Hilden
TriReagent® Solution	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
TrueBlue™ Substrate	KPL, Gaithersburg, USA
ExtraZol	BLIRT S.A., Danzig, Polen
Magna ChIP™ Protein A+G Magnetbeads	Merck Millipore, Darmstadt

2.5 Kits

Kit	Firma, Firmensitz
GeneJET Gel Extraction Kit	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
GenElute™ mRNA Miniprep Kit	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
NucleoBond® Xtra Maxi EF Kit	Macherey-Nagel, Düren
pGEM®-T Easy Vector System	Promega, Mannheim
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Plasmacytoid Dendritic Cell Isolation Kit II, human	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Qubit® RNA Assay Kit	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
RNase-free DNase Set	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
T7 Scribe Standard RNA IVT Kit	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
ExtractMe Total RNA Kit	BLIRT S.A., Danzig, Polen
Magna MeRIP™ m⁶A Kit	Merck Millipore, Darmstadt
RNA Clean & Concentrator™-5 Kit	ZymoResearch, Irvine, USA
RNA 6000 Pico Total RNA Kit	Agilent, Santa Clara, USA

2.6 Medien

2.6.1 Medien für Bakterien

Medium	Firma, Firmensitz
LB-Agar (Lennox)	Roth, Karlsruhe
LB-Medium (Lennox)	Roth, Karlsruhe
SOC Outgrowth Medium	New England Biolabs, Ipswich, USA

2.6.2 Medien und Zusätze für Zellkultur

Medium	Zusammensetzung
Infektionsmedium	DMEM High Glucose (4,5 g / l) mit 2 mM L-Glutamin, 100 Units/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 0,1% BSA
Infektionsmedium mit FCS	DMEM High Glucose (4,5 g / l) mit 2 mM L-Glutamin, 100 Units/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2% FCS
Kulturmedium (DMEM supp.)	DMEM High Glucose (4,5 g / l) mit 2 mM L-Glutamin, 100 Units/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10% FCS, 0.1% 2-Mercaptoethanol
PBMC-Medium	RPMI 1640 mit 2 mM L-Glutamin, 100 Units/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1x Aminosäuren, 1 mM Natriumpyruvat, 2% AB Serum

Medium/Zusatz	Firma, Firmensitz
2-Mercaptoethanol	Life Technologies, Carlsbad, USA
7,5% Natriumbicarbonatlösung	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
AB-Serum	Biochrom, Berlin
BSA-Lösung, 35%, BioXtra	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
DMEM High Glucose (4,5 g / l)	PAN-Biotech, Aidenbach
Dulbecco's PBS ^{def} (1x)	PAN-Biotech, Aidenbach
Fetales calf serum (FCS)	Biochrom, Berlin
L-Glutamin 200 mM (100x)	PAA, Cölbe
MEM Non-Essential Amino Acids	GE Healthcare, Freiburg

Solution (100x)	
OptiMEM	Life technologies, Carlsbad, USA
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAN-Biotech, Aidenbach
RPMI 1640	PAN-Biotech, Aidenbach
Trypsin-TPCK	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

2.7 Zellen

2.7.1 prokaryotische Zellen

Name	Herkunft
DH5α, chemisch kompetente E.coli	Institut für Immunologie, Marburg

2.7.2 Primäre eukaryotische Zellen

Name	Herkunft
Humane Vorhautfibroblasten	Institut für Immunologie, präpariert 1987 von Dr. Marianne Nain

2.7.3 Zelllinien

Name	Herkunft
A549	Humane epitheliale Lungenkarzinomzellen
CaCo2	Humane epitheliale Kolonkarzinomzelle
Calu3	Humane epitheliale Lungenkarzinomzellen
HEK TLR2/CD4 NFκB Luziferase	Humane embryonale Nierenepithelzellen
HEK293F	Humane embryonale Nierenepithelzellen
HeLa	Humane Zervixkarzinomzellen
MDCK-H	Epitheliale Hundenierenzellen

2.8 Vektoren und rekombinante Plasmide

Name	Herkunft
pHW2000	Dr. Erich Hoffmann (Hoffmann <i>et al.</i> 2000), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Mikhail Matrosovich, Institut für Virologie, Marburg
pHW2000-PB2	
pHW2000-PB1	
pHW2000-PA	
pHW2000-HA	
pHW2000-NP	
pHW2000-NA	
pHW2000-M	
pHW2000-NS	
pGEM-T® easy	
pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459)	Addgene, Cambridge, USA

2.9 Viren

Name	Herkunft
A/Puerto Rico/8/1934 H1N1	Allantoisflüssigkeit, Institut für Immunologie, Marburg

2.10 Nukleinsäuren und Nukleotide

2.10.1 Marker

Name	Firma/Firmensitz
GeneRuler™ 1 kb DNA ladder	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
GeneRuler™ 1 kb DNA ladder	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
RNA Loading Dye 2x	New England Biolabs, Ipswich, USA

2.10.2 DNA-Oligonukleotide für IVT

Name	Sequenz	Herkunft
ITS2	5'- TAA TAC GAC TCA CTA	Kloniert in pGEM-Vektor, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Stephanie Jung
	TAG GGG GCG TGT TGC GTG	
	CGG TGT GGT GGT GGG GGA	
	GGA GGA AGG CGG GTC CGG	
	AAG GGG AAG GGT GCC GGC	
	GGG GAG AGA GGG TCG GGG	

	GAG CGC GTC CCG GTC GCC
	GCG GTT CGC CGC CCG CCC
	CCG GTG GCG GCC CGG CGT
	CCG GCC
	GAC CGC CGC TCC CGC GCC
	CCT CCT CCT CCC CGC CGC
	CCC TCC TCC GAG GCC CCG
	CCC GTC CTC CTC GCC CTC
	CCC GCG CGT ACG CGC GCC
	C -3'

2.10.3 Primer

Alle Primer wurden von der Firma Metabion, Martinsried, synthetisiert.

Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung	Annealing-Temp. PCR (Taq)
hMETTL3 fw	CAAGCTGCACTTCAG ACGAA	qPCR METTL3	55 °C
hMETTL3 rv	GCTTGGCGTGTGGTC TT		55 °C
hMETTL14 fw II	GAACTAGAAATGCAA CAGGATG	qPCR METTL14	55°C
hMETTL14 rv III	TGAGGTCTATGTCCA GTGTC		55°C
hALKBH5 fw	CTATGCTTCAGATCG CCTG	qPCR ALKBH5	55°C
hALKBH5 rv	GGTTCTCTTCCTTGTC CATC		55°C
hFTO fw	GACACTTGGCTCCCT TATC	qPCR FTO	55°C
hFTO rv	CTGGCTTCTCGGAGA ATTAG		55°C
PHW-50 fw	CTCACTATAGGGAGA CCC	Sequenzierprimer für pHW2000-Vektor	-
PHW-50 rv	GAGGTATATCTTTCGC TCC		-
Bm-NS fw	TATTCGTCTCAGGGA GCAAAGCAGGGTG	Klonierungs-, PCR- und Sequenzierungsprimer NS/HA	55°C
Bm-NS/HA rv	ATATCGTCTCGTATTA GTAGAAACAAGGGTG TTT		55°C
PB1_885 fw	CCAATTCTCAGGACA CCGAAC	Sequenzierungsprimer PB1	-
PA_713 fw	GATGGATTCTGAACCG AACGGC	Sequenzierungsprimer PA	-
Ba-NA-1 fw	TATTGGTCTCAGGGA GCAAAGCAGGAGT	PCR- und Klonierungsprimer NA	55°C
Ba-NA-1413 rv	ATATGGTCTCGTATTA GTAGAAACAAGGAGT TTTTT		55°C

NA-mutG1065A fw	TTTGGATAGGAAGGA CCAAAAGTCACAGTT C	Mutageneseprimer NA	46°C (Phusion)
NA-mutG1065A rv	CCCATGTCTGGAAC GTGACTTTTGGTC		46°C (Phusion)
PB2_717 fw	GACTCAAGGAACATG CTGGG	Sequenzierungsprimer PB2	-
Bm-HA-1 fw	TATTCGTCTCAGGGA GCAAAAGCAGGGG	PCR- und Klonierungsprimer HA	55°C
Uni12_IAV-RT	AGCAAAAGCAGG	Influenza Universal-RT- Primer	-
NA-Seq_536 fw	CATGGGCTGGCTAAC AATCG	Sequenzierungsprimer NA	-
NA-Seq_740 rv	AATTTTGTACGAGGC CAGCC		-
HA-Seq_770 fw	CTGGACCTTGCTAAA ACCCG	Sequenzierungsprimer HA	-
HA-Seq_959 rv	CTGGTAAGGGAGACT GCTGT		-
hYTHDF1 fw	ACACCCAGAGAACAA AAGGACA	qPCR YTHDF1	55°C
hYTHDF1 rv	AGTAGACCACGGAGC CTCAT		55°C
hGAPDH fw	CGTCTTCACCACCAT GGAGA	qPCR GAPDH	55°C
hGAPDH rv	CGGCCATCACGCCAC AGTTT		55°C
hYTHDF2 fw	CAAGGCCCAATAATG CATATACTG	qPCR YTHDF2	55°C
hYTHDF2 rv	CCGTTGCTCAGCTGT CCATA		55°C
HA-A1031G fw	AGGATGGTTACAGGG CTAAGGAACATTCCG	Mutageneseprimer für die HA-Einzelmutanten	55°C (Phusion)
HA-A1031G rv	GGAATGTTCCCTTAGC CCTGTAACCATCCTC		55°C (Phusion)
HA-T1106G fw	GAAGGGGGATGGAC GGGAATGATAGATG		55°C (Phusion)
HA-T1106G rv	CATCTATCATTCCCGT CCATCCCCCTTC		55°C (Phusion)
HA-mutG1379C fw	CTACTGGAAAATGAA CGCACTCTGGATTT C		55°C (Phusion)
HA-G1379C rv	GGAAATCCAGAGTGC GTTCAATTTTCCAGTAG		55°C (Phusion)
HA-G1526C fw	GAAATGGCACTTATG ATTATCCCAA		55°C (Phusion)
HA-G1526C rv	CATAAGTGCCATTTCT TACACTTTC		55°C (Phusion)

YTHDF2 sgRNA 1 sense	CACCGGGAACCTTAC TTGAGTCCAC	CRISPR-Cas9 sgRNA 1 für Ligation in	-
YTHDF2 sgRNA 1 antisense	AAACGTGGACTCAAG TAAGGTTCCC	pSpCas9(BB)-2A-Puro- Vektor	-
YTHDF2 sgRNA 2 sense	AAACTGTCAGATTCT ACTTACCCC	CRISPR-Cas9 sgRNA 2 für Ligation in	-
YTHDF2 sgRNA 2 antisense	CACCGGGGTAAGTAG GAATCTGACA	pSpCas9(BB)-2A-Puro- Vektor	-
YTHDF2 DNA 1 fw	GGGACATTTTCACTG GCGAC	CRISPR-Cas9- Sequenzierprimer	63°C (Phusion)
YTHDF2 DNA 1 rv	GAAATTGCGCCACTA CACCC	sgRNA 1	63°C (Phusion)
YTHDF2 DNA 2 fw	CTCAGGCCTCCCAAG TAGAC	CRISPR-Cas9- Sequenzierprimer	63°C (Phusion)
YTHDF2 DNA 2 rv	TGCATCTGGTAGGAA GTGGG	sgRNA 2	63°C (Phusion)
HA-SeqPCR-fw	TCAAGCTGGGAGGAT GAACT	Sequenzierungsprimer	55°C
HA-SeqPCR-rv	GGAGACCAAAAGCAC CAGTG	HA für Mutationskontrolle	55°C
IAV-HA-fw	CGACTATGAGGAGCT GAGGG	qPCR-Primer HA	55°C
IAV-HA-rv	TGCCGTTACTCCGTTT GTGT	qPCR-Primer HA	55°C
M1-H1N1-fw	TGGGGCCAAAGAAAT CTCAC	qPCR-Primer M	55°C
M1-H1N1-rv	GTTGCACATACCAGG CCAAA	qPCR-Primer M	55°C

2.10.4 HPLC-Standards

Name	Firma/Firmensitz
2'-Desoxyadenosin	Sigma-Aldrich, Steinheim
2'-Desoxycytidin	Sigma-Aldrich, Steinheim
2'-Desoxyguanosin	Sigma-Aldrich, Steinheim
2'O-Methyladenosin	Sigma-Aldrich, Steinheim
2'O-Methylcytidin	Sigma-Aldrich, Steinheim
2'O-Methylguanosin	Sigma-Aldrich, Steinheim
2'O-Methyluridin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Adenosin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cytidin	Sigma-Aldrich, Steinheim

Guanosin	Sigma-Aldrich, Steinheim
N6-Methyladenosin	TriLink Biotechnologies, San Diego, USA
Thymidin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Uridin	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.11 Stimuli

Name	Sequenz/Beschreibung	Firma/Firmensitz
CpG2216 PTO	5'-GsGsG GGA CGA TCG TCsGs GsGsGsGsG-3' (s=Thiol-modifizierte Phosphatgruppen)	TIB Molbiol, Berlin
LPS	Lipopolysaccharid aus <i>E.coli</i>	Sigma Aldrich, Steinheim
R848	Resiquimod, TLR7/8-Agonist	InvivoGen, San Diego, USA
RNA40 PD	5'-GCCCGUCUGUUGUGACUC-3'	IBA, Göttingen

2.12 Enzyme

Name	Firma/Firmensitz
Benzonase® Nuklease	Novagen, San Diego, USA
Bsal	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
DNase I, RNase free	Roche, Mannheim
Esp3I (BsmBI)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
NdeI	New England Biolabs, Ipswich, USA
Neuraminidase (Vibrio cholerae)	Sigma-Aldrich, Steinheim
NotI	New England Biolabs, Ipswich, USA
Nuklease P1	Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteinase K	Roche, Mannheim
Phusion Polymerase HS II	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
PvuII	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
RiboLock RNase Inhibitor	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
RNase A	Qiagen, Hilden
RNase H	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Sal I	New England Biolabs, Ipswich, USA
Shrimp Alkaline Phosphatase	Sigma-Aldrich, Steinheim
Snake Venom Phosphatase	Sigma-Aldrich, Steinheim

Streptavidin-Peoxidase-Konjugat	Roche, Mannheim
T4 DNA Ligase	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

2.13 Antikörper

2.13.1 ELISA-Antikörper

Name	Spezies	Firma/Firmensitz
anti-human IFN-alpha	Maus	eBioscience, San Diego, USA
anti-human IFN-alpha, HRP-Konjugat	Maus	eBioscience, San Diego, USA
anti-human IL-6	Ratte	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-human IL-6, Biotin-Konjugat	Ratte	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-m⁶A, polyklonal	Kaninchen	Synaptic Systems, Göttingen
anti-rabbit, HRP-Konjugat	Ziege	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA

2.13.2 Western Blot-Antikörper

Name	Spezies	Firma/Firmensitz
Anti-human YTHDF-2, polyklonal	Kaninchen	Proteintech, Manchester, UK
Anti-IAV H1N1 HA, polyklonal	Kaninchen	Sino Biological Inc., Peking, China
anti-Maus, HRP-Konjugat	Ziege	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
anti-rabbit, HRP-Konjugat	Ziege	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
anti-Influenza-NP, Hybridomaüberstand HB-65TM	Maus	Eigenbestand (Zellen von ATCC®)
anti-Influenza-M, Hybridomaüberstand HB-64TM	Maus	Eigenbestand (Zellen von ATCC®)

2.13.3 FACS-Antikörper

Name	Spezies	Firma/Firmensitz
Anti-human BDCA-2, FITC-Konjugat	Maus	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach

2.13.4 Antikörper für Immunfärbung

Name	Spezies	Firma/Firmensitz
anti-Influenza-NP, Hybridomaüberstand HB-65	Maus	Eigenbestand
anti-Maus, HRP-Konjugat	Ziege	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA

2.13.5 Antikörper für IP und RNA-ELISA

Name	Spezies	Firma/Firmensitz
anti-m ⁶ A, polyklonal	Kaninchen	Synaptic Systems, Göttingen
anti-rabbit, HRP-Konjugat	Ziege	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA

2.14 Verbrauchsmaterialien

Name	Firma, Firmensitz
6-well Platten	Sarstedt, Nümbrecht
96well Flachbodenplatte	Greiner Bio-One, Frickenhausen
96well Maxisorp Platte Nunc	Thermo Fisher Scientific, Denmark
96well Rundbodenplatte	Sarstedt, Nümbrecht
96well Rundbodenplatte, microcon unsteril	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Filterspitzen (10µl, 100µl, 1000µl)	Sorenson Bioscience, USA
Handschuhe	NOBA Verbandmittel, Wetter
Kanülen (20G,24G)	Becton Dickinson, Heidelberg
Kombitips	Eppendorf, Hamburg
Micro BioSpin™ Säulen, RNase-free	BioRad, Hercules, USA
Microcon® YM-10	Merck Millipore, Darmstadt
Pasteurpipette	Otto Kobe, Marburg
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Frickenhausen

Plastikpipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
PVDF „Immobilon-P“ Transfermembran	Merck Millipore, Darmstadt
Reaktionsgefäß 0,2ml	Biostep, Jahnsdorf
Reaktionsgefäß 0,5ml / 1,5ml / 2,0ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß 15ml / 50ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
RunBlue SDS Protein Gele 4-12%	Expedeon, Swavesey, UK
Spitzen (10µl, 100µl, 1000µl)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Spritze „Omnifix“ (10ml)	Braun, Melsungen
Sterilfilter 0,45µm	Sigma-Aldrich, München
Tube-Streifen (clear 0,2 ml) und Deckel	BioRad, Hercules, USA
Whatman Papier „GB003“	Schleicher + Schuell, Dasse
Zellkulturflaschen (25, 75, 175 cm²)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellsieb 30µm Nylon	Falcon Becton Dickinson, USA
Amicon® Ultra-2 mL 3K Filter Unit	Merck Millipore, Darmstadt

2.15 Software

Name	Firma, Firmensitz
BioEdit	Ibis Biosciences, Carlsbad, USA
BioPrint	MWG Biotech, Ebersberg
Cell Quest Pro	BD Bioscience, San Jose, USA
CFX Manager	BioRad, Hercules, USA
Chromeleon	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FlowJo	Tree Star, Ashland, USA
Image Lab	BioRad, Hercules, USA
SoftMax Pro v5	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
2100 Expert Software	Agilent, Santa Clara, USA

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Durch Agarosegelelektrophorese können DNA- und RNA-Fragmente anhand ihrer Größe aufgetrennt werden. Das Agarosegel wird an eine Stromquelle angeschlossen, sodass im Gel ein elektrisches Feld erzeugt wird. Dieses bewirkt, dass sich die durch Phosphatgruppen negativ geladene Nukleinsäure während der Elektrophorese in Richtung der Anode bewegt.

Für die Elektrophorese von DNA wurde TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE), für RNA-Elektrophorese ein Morpholinopropansulfonsäure-Puffer (MOPS) verwendet. Um eine Degradation der RNA durch RNasen zu vermeiden, wurden Gelschlitten, Gelkammer und Kamm zuvor für 30 min mit einer 3%igen Wasserstoffperoxidlösung behandelt.

Für das Agarosegel wurde die entsprechende Menge Agarose im jeweiligen Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und auf einen abgedichteten Gelschlitten mit eingesetztem Kamm gegossen. Nach dem Aushärten wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer gelegt und mit dem entsprechenden Laufpuffer vollständig bedeckt. Die mit Ladepuffer versetzten Proben wurden in einem Volumen von 5-20 µl in die Geltaschen pipettiert, ebenso 7 µl eines DNA-Markers. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 7 Volt/cm durchgeführt. Anschließend wurde das Gel für 10 min in einer wässrigen Ethidiumbromidlösung (2 µg/ml) inkubiert. Die Analyse erfolgte mit einer UV-Lampe mit 300 nm Wellenlänge und dem Programm „BioPrint“ von MWG BioTech.

3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion

Für PCRs wurde der „DreamTaq Green PCR Master Mix“ (Thermo Scientific) verwendet.

Ein PCR-Ansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Volumen	Stockkonzentration	Endkonzentration
12,5 µl DreamTaq Green PCR Master Mix (2x)	2x	1x
0,6 µl Primer forward	10 µM	200 nM
0,6 µl Primer reverse	10 µM	200 nM
3 µl cDNA	-	< 20 ng
ad 30 µl H ₂ O		

Das Grundprogramm der PCR wurde wie folgt durchgeführt:

Prozess	Temperatur	Dauer	Zykluszahl
Denaturierung	95°C	5 min	1
Denaturierung	95°C	30 s	
Anlagerung	50-60°C (T_m Primer – 5°C)	30 s	25 - 40
Extension	72°C	1 min/kb	
Finale Extension	72°C	5 min	1
Kühlung	4°C	∞	1

Die PCR-Produkte wurden anschließend durch Gelelektrophorese analysiert.

3.1.3 Gezielte Mutagenese durch PCR

Gezielte Mutationen in einer DNA-Sequenz können durch eine PCR-basierte Methode eingefügt werden (Heckman und Pease 2007). Dabei werden zwei Primerpaare erstellt: zwei gegenläufige Primer, welche die in die DNA einzufügende Mutation tragen und sich an dieser Stelle überlappen und je ein, das Gen flankierender, *forward*- und *reverse*-Primer. Im ersten Schritt werden 2 PCRs mit der zu mutierenden Plasmid-DNA durchgeführt: eine mit dem mutagenen *fw*-Primer und dem flankierenden *rv*-Primer und eine mit dem mutagenen *rv*-Primer und dem flankierenden *fw*-Primer. Beide PCR-Produkte werden anschließend in einer 2. PCR kombiniert und mit den flankierenden Primern amplifiziert. Nach Restriktionsverdau können diese anschließend in einen Vektor kloniert werden. In dieser Arbeit wurde diese Methode genutzt, um Mutationen in den Gensegmenten von NA und HA einzufügen. Dabei wurden folgende Primer verwendet (Sequenzen der Primer s. 2.10.3):

Mutageneseprimer für die HA-Einzelmutanten:

HA-mutA1031G fw

HA-mutA1031G rv

HA-mutT1106G fw

HA-mutT1106G rv

HA-mutG1379C fw

HA-mutG1379C rv

HA-mutG1526C fw

HA-mutG1526C rv

Flankierende Primer für HA:

Bm-NS/HA rv
Bm-HA-1 fw
Mutageneseprimer NA:
NA-mutG1065A fw
NA-mutG1065A rv
Flankierende Primer für NA:
Ba-NA-1 fw
Ba-NA-1413 rv

Die PCRs wurden folgendermaßen durchgeführt:

1. PCR mit je einem Mutageneseprimer und einem flankierenden Primer:

Volumen	Stockkonzentration	Endkonzentration
5 µl 5x Phusion HF Buffer (Thermo)	5x	1x
0,5 µl 10 mM dNTP-Mix	10 µM	200 nM
1,25 µl Primer fw	10 µM	500 nM
1,25 µl Primer rv	10 µM	500 nM
1 µl Plasmid-DNA		20 ng
0,25 µl Phusion Polymerase HS II (Thermo)	2 U/µl	0,125 U
ad 25 µl H ₂ O		

PCR-Programm:

Temperatur	Dauer	Zykluszahl
98°C	30 sec	1
98°C	10 sec	
Tm-Primer + 3°C	30 sec	12
72°C	50 sec	
72°C	5 min	1
4°C	∞	1

Die PCR-Produkte wurden anschließend auf einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt, die entsprechenden Banden ausgeschnitten und die Produkte mittels DNA-Gelextraktion (s. 3.1.9) aus dem Gel gereinigt. Die 2. PCR wurde wie die erste durchgeführt, jedoch wurden statt der Plasmid-DNA als Template ca. 6 µl jedes PCR-Produkts aus der 1. PCR eingesetzt und 28 statt 12 Zyklen durchgeführt. Als Primer wurden dabei jeweils die beiden flankierenden Primer verwendet. Das PCR-Produkt

wurde anschließend erneut auf einem Agarosegel aufgetrennt und aus dem Gel gereinigt. Da die flankierenden Primer für HA und NA Schnittstellen für BsmBI bzw. BsaI enthalten, konnte das PCR-Produkt anschließend wie in Abschnitt 3.1.4.2 beschrieben, in den pHW2000-Leervektor kloniert werden. Die Vermehrung des Plasmids in Bakterien und die anschließende Überprüfung der Mutationen durch Sequenzierung wurde, wie ab Abschnitt 3.1.5 beschrieben, durchgeführt.

3.1.4 Klonierung von Gensegmenten

3.1.4.1 Klonierung in den pGEM®-T Easy Vektor

Die pGEM®-T easy-Vektoren (Promega) sind linearisierte Vektoren mit einem einzelnen 3'-terminalen Thymidin an beiden Enden. PCR-Produkte, die mit thermostabilen Polymerasen generiert wurden, enthalten in der Regel einen Adenosin-Überhang an ihren Enden, sodass eine einfache Ligation mit den pGEM-Vektoren möglich wird.

Für die Umklonierung von Gensegmenten aus dem pHW2000-Vektor wurde das Gensegment zunächst mit den Restriktionsenzymen Sall und NaeI, wie in Abschnitt 3.1.8 beschrieben, aus dem Vektor geschnitten und anschließend durch DNA-Gelextraktion gereinigt.

Um die 5'-Überhänge aufzufüllen und die Adenosin-Überhänge zu generieren, wurden 3 µl des Gelextraktionsprodukts mit 3 µl des Taq PCR Master Mix (QIAGEN) gemischt und für 20 min bei 72°C in der PCR-Maschine inkubiert. Um die dNTPs aus dem Reaktionsgemisch zu entfernen, erfolgte dann eine Aufreinigung mithilfe des GeneJet PCR Purification Kits (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben und anschließender Konzentrationsbestimmung am NanoDrop.

Die Ligation wurde mit einem Verhältnis von Insert zu Vektor von 3:1 wie folgt durchgeführt:

- 50 ng pGEM-T Easy Vektor
- x µl Insert (s. Formel)
- 0,5 µl DNA Ligase
- 1 µl 10x Ligase-Puffer
- ad 10 µl H₂O

Die Menge des Inserts wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{ng \text{ Vektor} \times kb \text{ Insert}}{3,0 kb \text{ Vektor}} \times \frac{3}{1} = ng \text{ Insert}$$

Die Ligation erfolgte über Nacht bei 4°C. Transformation von chemisch kompetenten Bakterien und Minipräparation wurden durchgeführt wie in Abschnitt 3.1.5 und 3.1.6

beschrieben. Um die erfolgreiche Ligation des Inserts zu kontrollieren, wurde ein Restriktionsverdau mit PvuII und anschließend eine Gelelektrophorese durchgeführt. Die DNA mit ligiertem Insert wurde durch die Firma Seqlab sequenziert (s. Abschnitt 3.1.7), um die Integrität und Orientierung des Inserts zu kontrollieren.

3.1.4.2 Klonierung aus dem pEX- in den pHW2000-Vektor

Für die Klonierung von Gensegmenten aus dem pEX-Vektor oder von PCR-Produkten (s. 3.1.3) in den pHW2000-Vektor wurden der Restriktionsverdau und die Ligation in einem einzelnen Ansatz durchgeführt (wie durch Czudai-Matwich *et al.* (2013) beschrieben). Dies ist möglich, da sowohl das Insert aus dem pEX-Vektor als auch der pHW2000-Vektor mithilfe des Restriktionsenzym Esp3I geschnitten werden können, dessen Restriktionsstelle außerhalb der Enzym-spezifischen Erkennungssequenz liegt. Die durch Esp3I geschnittenen Vektoren können durch die im Ansatz ebenso vorhandene DNA-Ligase wieder religieren, sodass sich ein Gleichgewicht zwischen Restriktion und Ligation einstellt. Sobald das Insert in den pHW2000-Vektor ligiert wird, ist jedoch die Erkennungssequenz für Esp3I nicht mehr vorhanden und es kann keine Restriktion des Vektors mehr stattfinden. Der pHW2000-Vektor mit ligiertem Insert akkumuliert in der Reaktion.

Die Restriktion/Ligation wurde wie folgt durchgeführt:

- 25 ng Vektor pHW2000blue
- 25 ng pEX-Vektor mit Insert oder 3,5 µl gelextrahiertes PCR-Produkt
- 2,5 µl Tango-Puffer
- 0,5 µl 100 mM DTT
- 0,5 µl 100 mM ATP
- 0,5 µl T4-DNA-Ligase
- 0,5 µl Esp3I (BsmBI) (5 U)
- ad 25 µl H₂O

Der Ansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert, anschließend erfolgte die Inaktivierung der Enzyme für 20 min bei 65°C. Um die in der Reaktion verbliebenen, religierten Vektoren ohne Insert zu entfernen, wurden erneut 0,5 µl Esp3I sowie 0,25 µl 100 mM DTT zugegeben und der Ansatz für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend folgte die Transformation und Isolierung der Plasmid-DNA aus den Bakterien.

Für die Restriktion des Neuraminidase-Gensegments aus dem pEX-A2-Vektor muss das Enzym BsaI verwendet werden, jedoch weist auch der Vektor intern eine solche Enzym-spezifische Erkennungssequenz auf. Daher wurde der pEX-A2-Vektor mit NA-Insert zunächst durch die Enzyme EcoRI und NotI verdaut und das Insert durch DNA-Gelextraktion gereinigt. Anschließend wurde der Restriktions/Ligationsansatz wie oben

beschrieben durchgeführt, jedoch wurden zusätzlich zu Esp3I 0,5 µl des Enzyms Bsal zugegeben, um die passenden Überhänge im Insert zu generieren.

3.1.5 Transformation chemisch kompetenter E.coli

Für Transformationen wurden chemisch kompetente E.coli DH5α verwendet. Zu 50 µl Bakterienkultur wurden 2 µl Ligationsansatz oder 50-500 ng Plasmid-DNA gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert, dann folgte ein Hitzeschock für 30 s bei 42°C im Wasserbad, welcher die Aufnahme des Plasmids durch die Zellen bewirkt. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien mit 200 µl SOC-Medium versetzt und für 1-2 h bei 37°C geschüttelt. Dieser Schritt ermöglicht die Expression der im Plasmid codierten, Antibiotikaresistenz-vermittelnden Enzyme. Anschließend wurde die Kultur auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin bzw. 25 µg/ml Kanamycin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Mit den Vektoren pGEM-T® easy und pHW2000blue kann eine Blau-Weiß-Selektion durchgeführt werden. Dafür wurden die LB-Platten mit 40 µl X-Gal (20 mg/ml) und 40 µl IPTG (30 mg/ml) beschichtet und vor dem Ausstreichen der Bakterien für 60 min im Brutschrank getrocknet. Durch die Insertion des gewünschten Gens in den Vektor wird der Leserahmen für das Enzym β-Galaktosidase zerstört, welches den gelben Farbstoff X-Gal in einen blauen Farbstoff umsetzen kann. Klone, die den leeren Vektor enthalten, wachsen daher in blauen Kolonien, während Klone, die den Insert-tragenden Vektor aufgenommen haben, ein weißes Erscheinungsbild zeigen.

3.1.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Für die Aufreinigung von bis zu 20 µg Plasmid-DNA wurde das GeneJET Plasmid Miniprep Kit von Thermo Scientific verwendet. Dafür wurden 3 ml LB-Ampicillin-Medium mit einer steril entnommenen Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte aus 2 ml der Bakterienkultur nach Herstellerangaben, eluiert wurde mit 50 µl H₂O.

Für eine Isolierung von bis zu 1000 µg Plasmid-DNA wurde das NucleoBond® Xtra Maxi EF Kit von Macherey-Nagel eingesetzt. Zunächst wurde hierbei eine 3 ml LB-Ampicillin-Vorkultur wie oben beschrieben angelegt und für ca. 3 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Diese Vorkultur wurde anschließend zum Animpfen einer 200-300 ml LB-Ampicillin-Kultur verwendet, die nach einer Inkubation über Nacht für die Plasmid-Isolation eingesetzt wurde. Die DNA-Isolation erfolgte nach Herstellerangaben, das DNA-Pellet wurde zum Schluss in 500 µl H₂O gelöst.

3.1.7 DNA-Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden von der Firma SeqLab (Göttingen) nach der Didesoxymethode durchgeführt. Pro Sequenzierungsansatz wurden 1,2 µg Plasmid und 30 pmol Primer in einem Gesamtvolumen von 15 µl eingesetzt. Die Standardprimer T7 und SP6 wurden der Probe nicht vorher beigemischt, sondern firmenintern zugegeben. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm BioEdit sowie BLAST® (NCBI).

3.1.8 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für den Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen wurden pro Ansatz 1 µg DNA in einem Volumen von 50 µl eingesetzt. Der Verdau erfolgte mit 10 U des jeweiligen Enzyms im vom Hersteller empfohlenen Puffer für 1-3 h bei 37°C oder über Nacht bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Enzym durch Hitze inaktiviert oder eine Gelelektrophorese mit anschließender Gelextraktion durchgeführt (s. Abschnitt 3.1.9).

3.1.9 DNA-Gelextraktion

Um DNA-Fragmente einer bestimmten Länge nach elektrophoretischer Auftrennung aus einem Agarosegel zu isolieren, wurde das GeneJET Gel Extraction Kit von Thermo Scientific verwendet. Nach der Elektrophorese wurde das Agarosegel zunächst mit Ethidiumbromid gefärbt, wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben. Anschließend wurde das DNA-Fragment unter UV-Belichtung mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Dieser Schritt erfolgte, zum Schutz der DNA, auf einer Glasplatte, die auf den UV-Tisch gelegt wurde. Die Aufreinigung mithilfe des Kits wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, eluiert wurde in H₂O.

3.1.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

3.1.10.1 Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop

Die Konzentration von RNA- oder DNA-Lösungen kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen werden. Eine $OD_{260} = 1$ entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml RNA. Mithilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes, das einen linearen Zusammenhang zwischen der Absorption einer Lösung und der Konzentration des gelösten Stoffes beschreibt, kann so die Konzentration einer Nukleinsäure berechnet werden. Da Proteine ein Absorptionsmaximum von 280 nm aufweisen, gibt der Quotient aus OD_{260} und OD_{280} Auskunft über die Reinheit der Probe. Die Quantifizierung von Nukleinsäuren erfolgte mit dem Spektrophotometer NanoDrop 1000.

3.1.10.2 Konzentrationsbestimmung mittels Qubit® Fluorometer

Für RNA-Proben mit einer geringen Konzentration wurde das Qubit® RNA Assay Kit (Thermo Scientific) verwendet. Der Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Analyse wurden 15 µl jeder RNA-Probe mit 185 µl der Qubit-Arbeitslösung gemischt und zusammen mit den verdünnten Standards im Qubit® Fluorometer gemessen.

3.1.10.3 Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle mithilfe des Agilent 2100 Bioanalyzers

Für die Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle von kleinen Mengen RNA mit niedriger Konzentration wurde das Agilent 6000 Pico Total RNA Kit verwendet. Dafür werden 1 µl der RNA-Probe mit einer Konzentration von mindestens 50 und maximal 5000 pg/µl benötigt. Die Analyse erfolgte nach Herstellerangaben.

3.1.11 RNA-Isolation aus eukaryotischen Zellen

3.1.11.1 RNA-Extraktion nach Chomczynski und Sacchi

Bei der RNA-Isolationmethode nach Chomczynski und Sacchi handelt es sich um eine Flüssig-Flüssig-Extraktion, die auf der unterschiedlichen Löslichkeit von RNA, DNA und Proteinen in zwei nicht-mischbaren Flüssigkeiten basiert. Mit dieser Methode können die drei Verbindungen aus einem Zellysat durch Phasenseparation getrennt voneinander isoliert werden (Chomczynski und Sacchi 1987).

Die Zellen werden dafür zunächst in einer denaturierenden Lösung mit Guanidiniumthiozyanat lysiert, welche die Denaturierung von Proteinen und damit auch endogenen Ribonukleasen bewirkt. Nach der Zugabe von Phenol und Chloroform und Trennung der Phasen durch Zentrifugation bleibt die RNA bei einem pH-Wert von 4.8 in der wässrigen Phase gelöst, während Proteine und kleine DNA-Fragmente in die organische Phase übertreten. Große DNA-Fragmente verbleiben in der Interphase. Die RNA kann anschließend mithilfe von Isopropanol aus der wässrigen Phase präzipitiert werden.

Die Methode wurde wie folgt durchgeführt:

- Zellyse mit 1 ml Lösung D pro 1×10^7 Zellen durch Resuspendieren
- Zugabe von 0,1 ml 2 M Natriumacetat pH 4.0 und 0,4 ml Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) pro ml Lösung D, mit der Hand schütteln
- Proben 15 min auf Eis kühlen
- Zentrifugation für 30 min bei 3000 g, 4°C
- wässrige Phase in neues Gefäß überführen

- Zugabe von 1 ml Isopropanol pro ml Lösung D
- 10 min bei RT inkubieren
- Zentrifugation für 45 min bei 3000 g, 4°C
- Überstand verwerfen
- Waschen des Pellets mit 1 ml 75% Ethanol pro ml Lösung D
- Zentrifugation für 10 min bei 3000 g, 4°C
- Pellet an der Luft trocknen
- Zugabe von upH₂O (Menge je nach Pelletgröße), RNA auf Eis quellen lassen
- Konzentrationsbestimmung am NanoDrop

3.1.11.2 RNA-Extraktion mittels TriReagent®/ExtraZol

Für kleinere Mengen Zellen oder für die Aufreinigung von RNA aus Virusproben wurde TriReagent® (Thermo Scientific) oder ExtraZol (BLIRT) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine fertige Mischung aus u.a. Phenol und Guanidiniumthiozyanat. Die RNA-Isolation wurde jeweils nach den Herstellerangaben durchgeführt.

3.1.12 DNase-Behandlung von RNA

Um DNA-Kontaminationen in einer RNA-Probe zu entfernen, wurde die RNA nach der Extraktion mit RNase-freier DNase I (Roche) behandelt. Dafür wurden bis zu 10 µg RNA in einem Reaktionsvolumen von 50-100 µl eingesetzt und mit 2 U DNase I im entsprechenden Puffer für 20-30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die RNA wie folgt extrahiert und gefällt: der Reaktionsansatz wurde mit 1 Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol versetzt, geschüttelt und bei 3000 g für 2 min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und 1 Volumen Chloroform zugegeben. Nach erneutem Schütteln wurde die Probe für 2 min bei 3000 g zentrifugiert. Die RNA befindet sich nun in der oberen Phase und wurde nach Zugabe des 2,5-fachen Volumens Ethanol und einem 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat bei -80°C für eine Stunde oder mindestens über Nacht bei -20°C präzipitiert. Durch Zentrifugation bei 30.000 g wurde die RNA pelletiert und mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde zum Schluss getrocknet und in 20-50 µl H₂O gelöst.

3.1.13 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird RNA mithilfe einer Reversen Transkriptase in einzelsträngige DNA umgeschrieben. Dafür kann ein genspezifischer Primer verwendet werden, sodass nur die Sequenz von Interesse transkribiert wird. Alternativ können Oligo-(dT)-Primer für mRNAs oder Random Primer für alle RNAs verwendet werden.

Die reverse Transkription wurde mit dem „RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit“ von Thermo Scientific wie folgt durchgeführt:

- 200 ng RNA
- 1 μ l Random Primer oder 2 μ l genspezifischer Primer (10 μ M Stock)
- ad 6 μ l H₂O

Inkubation für 5 min bei 65°C

Zugabe von:

- 2 μ l 5x Reaction Buffer
- 1 μ l dNTP-Mix (10mM)
- 0,5 μ l RiboLock RNase Inhibitor
- 0,5 μ l Reverse Transkriptase

Der Reaktionsansatz wurde für 60 min bei 42°C inkubiert und das Enzym anschließend für 5 min bei 70°C inaktiviert. Für alle weiteren Versuche wurde der cDNA-Ansatz 1:3 mit H₂O verdünnt und bei -20°C gelagert.

3.1.14 Quantitative PCR (qPCR)

Die quantitative PCR (qPCR) beruht auf dem Prinzip der normalen PCR und wird für die Quantifizierung von RNA-Mengen eingesetzt. Die Quantifizierung erfolgt beispielsweise durch den Einsatz eines fluoreszierenden Farbstoffes wie SYBR Green, der in die DNA interkaliert und so zu einer exponentiellen Zunahme der Fluoreszenz während der PCR führt. Die Fluoreszenzintensität wird nach jedem Zyklus gemessen und korreliert mit der Menge an Template-DNA. Je mehr Template-DNA vorhanden ist, desto früher überschreitet die gemessene Fluoreszenz einen bestimmten Grenzwert. Der Zyklus bei dem dies auftritt, wird als Ct-Wert (*cycle threshold*) oder Cp-Wert (*crossing point*) bezeichnet und ist umso kleiner, je mehr Template-DNA in der Probe vorhanden ist. Der Ct-Wert kann anschließend für eine relative Quantifizierung nach der $\Delta\Delta$ Ct-Methode verwendet werden: hierfür ist es notwendig, neben dem Transkript von Interesse auch die Expression eines Kontrollgens zu messen, welche während des Zellzyklus möglichst stabil bleibt und durch die experimentelle Behandlung nicht beeinflusst wird. Dieses ermöglicht eine Normierung der Ct-Werte. Zudem muss bei dem qPCR-Experiment der Gruppe, die einer experimentellen Behandlung unterzogen wurde, eine Kontrollgruppe gegenübergestellt werden, die diese Behandlung nicht erhalten hat. Das Resultat der $\Delta\Delta$ Ct-Berechnung ist dann die n-fache Expression nach Behandlung gegenüber unbehandelten Zellen, normiert auf das Kontrollgen.

Der Ansatz für die qPCR mit dem Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix von Agilent setzte sich wie folgt zusammen:

10 µl 2× Brilliant II SYBR Green Master Mix (Agilent)

0,5 µl Primer for/rev (10 µM Stock)

7 µl H₂O

2 µl cDNA-Template 1:3 verdünnt (s. Abschnitt 3.1.13)

Die qPCR wurde in einem BioRad MJ Mini™ Thermocycler mit der Software CFX Manager nach folgendem Programm durchgeführt:

1: 95°C	5 min
2: 95°C	5 sec
3: 55°C	30 sec
4: 72°C	20 sec
Plate Read	
5: Go to 2, 34x	
6: Melt Curve 65°C to 95°C: Increment 0,5 °C for 5 sec	
Plate Read	

Die Ct- bzw. Cp-Werte wurden nach der Regression-Methode durch das Programm CFX-Manager (BioRad) bestimmt und für die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Berechnung verwendet:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{Target}} - \text{Ct}_{\text{Referenz}}$$

Standardabweichung s des ΔCt -Werts:

$$s = (s_{\text{Target}}^2 + s_{\text{Referenz}}^2)^{1/2}$$

$\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert:

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{Behandlung}} - \Delta\text{Ct}_{\text{Kontrolle}}$$

Die Standardabweichung des $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werts ist gleich der Standardabweichung des ΔCt -Werts.

Der Bereich für die Target-Expression im Vergleich zu den Kontrollproben ist dann $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, wobei $\Delta\Delta\text{Ct} + s$ und $\Delta\Delta\text{Ct} - s$ eingesetzt werden.

3.1.15 *In vitro* Transkription (IVT)

Bei der *in vitro* Transkription (IVT) wird anhand eines DNA-Templates mithilfe von RNA-Polymerasen RNA synthetisiert. Dafür werden eine lineare DNA mit einem entsprechenden Promotor, Ribonukleosidtriphosphate, ein Puffersystem mit DTT und Magnesiumionen und eine RNA-Polymerase benötigt. Aufgrund ihrer hohen Selektivität für den eigenen Promotor und der schnellen Transkriptionsrate wird dabei vor allem die T7-RNA-Polymerase aus dem T7-Phagen verwendet.

Für die IVT eines Inserts aus einer Plasmid-DNA musste das Template zunächst linearisiert werden. Dafür wurde die DNA mit Restriktionsendonukelase, wie in Abschnitt 3.1.8 beschrieben, verdaut. Für das Plasmid pGEM[®]-T Easy, welches für die meisten in vitro Transkriptionen verwendet wurde, wurde das Enzym NdeI eingesetzt. Der Verdau erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur, anschließend wurde das Enzym für 20 min bei 65°C hitzeinaktiviert.

Die IVT wurde mit dem T7 Scribe Standard RNA IVT Kit von Biozym wie folgt durchgeführt:

750 ng DNA-Template

+ 2 µl T7-Puffer

+ 1,5 µl ATP

+ 1,5 µl CTP

+ 1,5 µl UTP

+ 1,5 µl GTP

+ 2 µl DTT

+ 0,5 µl RNase-Inhibitor

+ 2 µl T7-Polymerase

ad 20 µl H₂O

Inkubation für 1 h bei 37°C

Anschließend wurde die Reaktion mit der im Kit enthaltenen DNase nach Herstellerangaben behandelt. Für die Aufreinigung der IVT-RNA wurden die RNase-freien Micro Bio-Spin[™] Säulen mit Tris-Puffer der Firma BioRad verwendet. Auch hierbei wurde nach Herstellerangaben verfahren.

Die Größe der RNA wurde anschließend durch Gelelektrophorese, wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben, kontrolliert.

3.2 Methoden zur Detektion von N6-Methyladenosin in RNA

3.2.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC)

Durch Chromatografie können Substanzgemische in ihre Einzelbestandteile aufgetrennt und analysiert werden. Diese Trennung wird durch Verwendung einer mobilen und einer stationären Phase ermöglicht, mit denen die zu analysierende Substanz unterschiedliche Wechselwirkungen eingeht. Bei der HPLC fließt die mobile Phase mit hohem Druck durch eine Säule, die die stationäre Phase enthält. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Reversed Phase-HPLC besteht die stationäre Phase beispielsweise aus modifiziertem Kieselgel, welches durch die kovalente Bindung von Alkylketten vorwiegend apolare Eigenschaften aufweist. Apolare Substanzen

wechselwirken daher stärker mit der stationären Phase als polare und werden zurückgehalten. Bei einer Gradientenelution verändert sich die Zusammensetzung der mobilen Phase während der Analyse. Die Analyse beginnt mit einem polaren Eluenten, dem nach und nach ein apolares Fließmittel beigemischt wird. Dadurch eluieren mit der Zeit auch die apolaren Analyten.

In dieser Arbeit wurde die HPLC genutzt um die Nukleosidzusammensetzung von RNA-Proben zu untersuchen. Dafür musste zunächst ein Nuklease-Verdau durchgeführt werden: bis zu 20 µg RNA wurden in 70 µl 30 mM Ammoniumacetat, pH 5,0, mit 3 mM ZnCl₂ gelöst und 0,25 U P1-Nuklease pro µg RNA zugegeben. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 37°C oder 2 h bei 56°C. Für die Dephosphorylierung wurden anschließend 15 µl 100 mM Tris-HCl (pH 8,3), 15 µl 10 mM Magnesiumacetat und 0,125 U Shrimp Alkaline Phosphatase pro µg RNA zugegeben. Auf eine zweistündige Inkubation bei 37°C folgte ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 30000 g. Der Überstand wurde in HPLC-Röhrchen überführt und ggf. auf 120 µl mit Eluent A aufgefüllt.

Als Standards wurden folgende Nukleoside verwendet:

Nukleosid	Stockkonzentration	Endkonzentration
Cytidin	10 mM	30 µM
Guanosin	1 mM	20 µM
Adenosin	10 mM	30 µM
Uridin	10 mM	30 µM
2'-Desoxycytidin	10 mM	140 µM
2'-Desoxyguanosin	1 mM	30 µM
2'-Desoxyadenosin	10 mM	80 µM
Thymidin	10 mM	200 µM
2'O-Methyladenosin	10 mM	50 µM
2'O-Methylguanosin	1 mM	20 µM
2'O-Methylcytidin	10 mM	30 µM
2'O-Methyluridin	10 mM	30 µM
N6-Methyladenosin	7 mM	56 µM
Inosin	10 mM	30 µM

Alle Standards lagen in H₂O gelöst vor. N6-Methyladenosin wurde aus N6-Methyl-ATP durch Dephosphorylierung hergestellt: dafür wurden 80 µl der 10 mM Stocklösung mit 15 µl 100 mM Tris-HCl (pH 8,3), 15 µl 10 mM Magnesiumacetat, 0,25 µl Shrimp Alkaline Phosphatase (10 U/µl) und 2,5 µl Snake Venom Phosphatase (0,5 mU/µl) versetzt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe abzentrifugiert

und der Überstand als Stock mit einer Konzentration von 7 mM N6-Methyladenosin gelagert.

Für die Analyse wurden die Standards in einem Gesamtvolumen von 1 ml in Eluent A in oben genannter Endkonzentration gemischt.

Die HPLC-Analyse der Standards und Proben wurden mithilfe des „Dionex Ultimate 3000 System“ durchgeführt. Es wurde eine Supelcosil LC18 *reverse phase*-Säule (250 x 4.6 mm, 5 µm) mit vorgeschalteter C18 Schutzsäule (4 x 2 mm) verwendet (beide von Sigma). Die mobile Phase bestand aus Eluent A (5 mM Ammoniumacetat, pH 6,0) und Eluent B (40% Acetonitril). Nach der Injektion der RNA erfolgte die Trennung mit 100% Eluent A, gefolgt von einem 66-minütigen Gradienten zu 60% Eluent B bei einer Flussrate von 0,85 ml/min. Zum Schluss wurde die Säule einer isokratischen Elution für 20 min mit 100% Eluent B unterzogen. Die Detektion der eluierten Nukleoside erfolgte kontinuierlich durch UV-Spektrometrie bei 254 nm. Für die Auswertung und Bedienung der HPLC wurde das Programm Chromeleon verwendet.

3.2.2 MeRIP-Seq

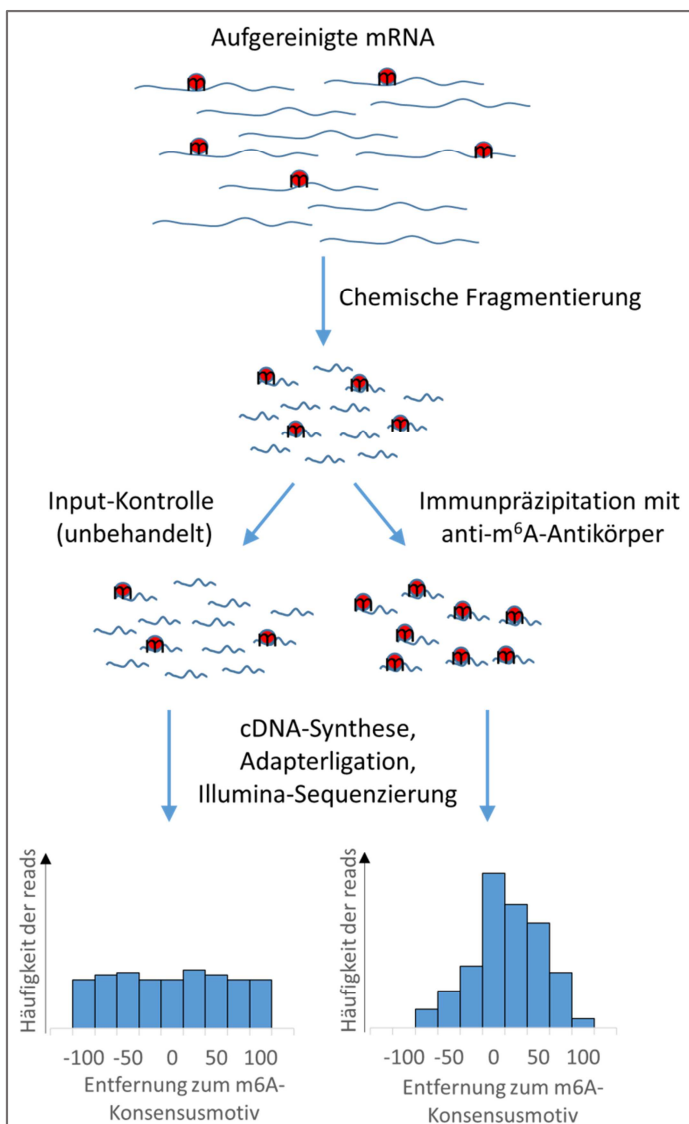


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des MeRIP-Seq. Zelluläre mRNA wird durch Behandlung mit Zinkchloridlösung in etwa 100 bp-lange Segmente fragmentiert. N6-Methyladenosin-haltige Fragmente werden in einer anschließenden Immunpräzipitation mit einem anti-m⁶A-Antikörper angereichert und zusammen mit einer nicht-immunpräzipitierten Probe durch NGS sequenziert. Sequenzmotive, die ein N6-Methyladenosin enthalten, sollten in der Sequenzierung der IP-Probe überdurchschnittlich oft auftreten und so die Positionen von N6-Methyladenosin anzeigen. Rote Kreise: N6-Methyladenosin. Modifiziert nach Dominissini *et al.* (2012) und Meyer *et al.* (2012).

MeRIP-Seq steht für *methylated RNA immunoprecipitation with next generation sequencing* und ermöglicht die transkriptomweite Detektion von N6-Methyladenosin (m⁶A). Die Methode wurde im Jahr 2012 von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen publiziert (Dominissini *et al.* 2012; Meyer *et al.* 2012). Dabei wird die gereinigte, zelluläre mRNA zunächst chemisch fragmentiert. Diese Fragmente mit einer Länge von etwa 100 bp werden in einer anschließenden Immunpräzipitation (IP) mit einem spezifischen Antikörper gegen m⁶A eingesetzt. Durch die Immunpräzipitation werden gezielt die RNA-Fragmente angereichert, die ein oder mehrere methylierte Adenosine enthalten. Ein Teil der fragmentierten RNA bleibt unbehandelt und dient als Input-Kontrolle für die nachfolgende Sequenzierung (s. Abbildung 3.1). Der Begriff *next generation sequencing* (NGS) umfasst verschiedene Hochdurchsatz-Techniken, bei denen Millionen DNA-Fragmente in einem einzigen Lauf sequenziert werden können. Dafür muss die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Für eine

Sequenzierung mit Geräten der Firma Illumina werden anschließend Adapter an die DNA-Fragmente ligiert und die cDNA-*library* durch PCR vervielfältigt. Anschließend wird die *library* auf eine Messzelle gegeben, die mit Millionen von Oligos beschichtet ist, welche komplementär zu den Adaptersequenzen sind. Dies führt zu einer Bindung der cDNA-Fragmente an die Messzelle. Durch Brückenamplifikation wird jedes einzelne Fragment weiter vervielfältigt und bildet ein sogenanntes klonales Cluster auf der Messzelle. Für die eigentliche Sequenzierung werden Sequenzierprimer an die Adaptersequenzen ligiert und die Synthese des komplementären Strangs beginnt. Dabei werden unterschiedlich fluoreszenzmarkierte dNTPs eingesetzt, die bei Einbau in den DNA-Strang ein Fluoreszenzsignal emittieren, das von einem Detektor erfasst wird. Jedes einzelne Cluster der Messzelle sendet so während der Synthese eine charakteristische Abfolge an verschiedenen Fluoreszenzsignalen, die die Sequenz des DNA-Stranges abbilden. Durch die gleichzeitige Erfassung der Fluoreszenzsignale aller Cluster auf der Messzelle werden so in einem einzigen Lauf alle vorhandenen DNA-Fragmente sequenziert. (Illumina 2016)

Durch die Anreicherung der m⁶A-enhaltenden RNA-Fragmente während der IP, wird das Sequenzmotiv, welches die Methylierung enthält, in den Sequenzierungen der IP-Probe im Vergleich zu der Input-Kontrolle überdurchschnittlich oft auftreten. Alle anderen Sequenzen hingegen sollten in beiden Proben gleichmäßig verteilt sein (s. Abbildung 3.1). Dieses Verfahren ermöglicht so den indirekten Nachweis und die Lokalisation von N6-Methyladenosin im Transkriptom.

Diese Methode wurde zu Beginn der Arbeit durchgeführt und zu einem späteren Zeitpunkt mit leicht abweichendem Protokoll wiederholt. Beide Varianten werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

3.2.2.1 Infektion und RNA-Isolation

Variante 1: Für die Infektion im 75cm²-Kulturflaschenformats wurden CaCo2-Zellen verwendet, die, wie in Abschnitt 3.5.4 beschrieben, mit 3 MOI des aus Allantoisflüssigkeit gereinigten Virus A/PR/8 infiziert wurden. Nach einer Inkubationszeit von 6 h wurden die Zellen in 10 ml Lösung D pro Kulturflasche lysiert. Die RNA-Isolation nach Chomczynski und Sacchi erfolgte wie in Abschnitt 3.1.11.1 beschrieben.

Variante 2: Die Infektion der CaCo2-Zellen wurde wie bei der 1. Variante durchgeführt, jedoch wurde mit 2 MOI des rekombinanten Virus A/PR/8 für 22 h infiziert. Die Lyse erfolgte in 4 ml ExtraZol pro Zellkulturflasche. Die darauffolgende RNA-Isolation wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.2.2.2 Anreicherung der mRNA

Für die Anreicherung der mRNA wurde bei beiden Varianten das GenElute™ mRNA Miniprep Kit (Sigma Aldrich) verwendet. Dieses basiert auf dem Prinzip der Hybridisierung der Poly(A)-Sequenz am 3'-Ende der mRNAs mit (dT)-Oligos, die an Polystyrene-Beads gekoppelt sind. Alle RNAs ohne eine Poly(A)-Sequenz können so aus dem RNA-Gemisch entfernt werden, was eine Anreicherung der zellulären mRNAs bewirkt.

Variante 1: Die Anreicherung der mRNA wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei pro Ansatz bis zu 210 µg RNA eingesetzt wurden. Die RNA wurde anschließend durch Ethanolpräzipitation aus dem Eluat aufgereinigt. Dafür wurde das Eluat mit dem dreifachen Volumen Ethanol versetzt sowie 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 0,2 µg/µl Glycogen zugegeben. Die Präzipitation erfolgte über Nacht bei -20°C. Durch Zentrifugation bei 3000 g wurde die RNA pelletiert und mit 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde zum Schluss getrocknet und in upH₂O gelöst.

Variante 2: Die Anreicherung der mRNA wurde ebenfalls nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei pro Ansatz bis zu 500 µg RNA eingesetzt wurden. Nach der ersten Anreicherungsrunde wurde das Eluat für eine zweite Anreicherungsrunde verwendet. Die anschließende Aufreinigung erfolgte mit dem RNA Clean & Concentrator™-5 Kit (ZymoResearch) nach Herstellerangaben.

3.2.2.3 Chemische Fragmentierung

Variante 1: Für die Fragmentierung der angereicherten mRNA in Fragmente von 100 Basenpaaren wurde Zinkchlorid verwendet. Pro Ansatz wurden 18 µg der mRNA mit 2 µl einer 100 mM Zinkchloridlösung und 2 µl einer 100 mM TrisHCL-Lösung vermischt. Der Ansatz wurde mit upH₂O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl ergänzt. Die Proben wurden für 5 min bei 94°C im PCR-Block inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden danach sofort 2 µl 0,5 M EDTA zugegeben. Anschließend wurde die RNA, wie in Abschnitt 3.2.2.2 beschrieben, präzipitiert und gereinigt. Die Kontrolle der Fragmentierung erfolgte mithilfe eines RNA-Agarosegels (s. 3.1.1).

Variante 2: Bis zu 15 µg mRNA wurden in einem Volumen von 18 µl mit 2 µl 10x Fragmentierungspuffer (aus Magna MeRIP™ m⁶A Kit, Millipore) versetzt und für 4 min im PCR-Block bei 94°C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 2 µl 0,5 M EDTA (Millipore) zugegeben. Die Aufreinigung erfolgte wie bei Variante 1. Die Kontrolle der Fragmentierung erfolgte mithilfe der Bioanalyzers (s. 3.1.10.3).

3.2.2.4 Immunpräzipitation, Aufreinigung und Ankonzentrierung

Ein Teil der fragmentierten RNA wurde für die Immunpräzipitation (IP) mit einem gegen m⁶A gerichteten Antikörper eingesetzt (rabbit anti-m⁶A, polyklonal). Die restliche RNA wurde als Input-Kontrolle aufbewahrt.

Variante 1: Der Ansatz für die IP setzte sich wie folgt zusammen:

Komponente	Volumen	Menge
Fragmentierte RNA	je nach Konzentration	20 µg
RiboLock (40 U/µl)	10 µl	400 U
IP-Puffer, 5x	200 µl	1x
Anti-m6A Antikörper (0,5 mg/ml)	15 µl	7,5 µg
H ₂ O	ad 1000 µl	

Die Ansätze wurden für 2 h bei 4°C in einem Reaktionsgefäß auf einem Drehrotor inkubiert. Währenddessen wurden pro Probe 200 µl Protein-A-Beads zweimal mit 1 ml 1x IP-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Beads für 2 h im Drehrotor in 1x IP-Puffer mit 0,5 mg/ml BSA geblockt und danach noch zweimal mit 1 ml IP-Puffer gewaschen. Zum Schluss wurde der Überstand abgenommen und der RNA-Antikörper-Ansatz zu den Beads gegeben. Die Reaktion inkubierte für weitere 2 h im Drehrotor bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen mit 1x IP-Puffer wurden die Beads in 50 µl PBS mit 5 µg Proteinase K und 0,5 µl RiboLock aufgenommen und über Nacht im Heizblock bei 56°C unter Schütteln inkubiert. Zum Schluss wurde die Proteinase K für 20 min bei 70°C inaktiviert und der RNA-haltige Überstand nach Zentrifugation von den Beads abgenommen. Der Überstand sowie die nicht immunpräzipitierte Input-RNA wurden anschließend über die RNase-freien Micro Bio-SpinTM Säulen mit Tris-Puffer (BioRad) nach Herstellerangaben gereinigt. Dabei wurden pro Säule 50 µl des Eluats verwendet. Von der Input-Kontroll-RNA wurden pro Säule 300 ng eingesetzt, insgesamt 1200 ng. Die RNA-Konzentration wurde mithilfe des Qubit® RNA Assay Kits (Thermo Scientific) im Qubit® Fluorometer gemessen (s. 3.1.10.2). Um eine Konzentrierung der RNA im IP-Eluat und eine Entsalzung zu erreichen, wurden die Microcon® YM-10 Filtereinheiten (Merck Millipore) verwendet. Auf jede Filtereinheit wurden 200 µl Probe gegeben und diese für 35 min bei 14000 x g zentrifugiert. Das Konzentrat wurde anschließend durch erneute Zentrifugation für 3 min bei 1000 x g mit umgedrehtem Filter in ein neues Tube überführt. Den Konzentraten wurden je 10 µl upH₂O zugesetzt und die RNA-Konzentration mithilfe des NanoDrop Spektrophotometers bestimmt.

Variante 2: Von jeder RNA-Probe wurden 5 Ansätze mit je 5 µg RNA für die Immunpräzipitation verwendet. Zunächst wurden für jede Reaktion 25 µl Magna ChIP

Protein A/G Magnetbeads (Millipore) in ein Reaktionsgefäß überführt und zweimal mit 250 µl 1x IP-Puffer gewaschen. Dafür wurde das Tube für 1 min in ein Magnettrack gestellt, bis der Überstand klar war. Der Überstand wurde durch Abpipettieren entfernt. Anschließend wurden die Beads in 100 µl 1x IP-Puffer resuspendiert. Pro Probe wurden 5 µg des m⁶A-Antikörpers (Synaptic Systems) zugeben und die Ansätze für 30 min unter Rotation bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Beads 3x mit je 500 µl 1x IP-Puffer gewaschen und die Überstände zum Schluss komplett abgenommen. Für die Immunpräzipitation wurde folgender Ansatz zu den Beads gegeben:

Komponente	Volumen	Menge
Fragmentierte RNA	je nach Konzentration	5 µg
RiboLock (40 U/µl)	5 µl	200 U
IP-Puffer, 5x	100 µl	1x
H ₂ O	ad 500 µl	

Die Bindung der RNA an die Beads erfolgte unter Rotation für 2 h bei 4°C. Anschließend wurden die Proben 5x mit je 500 µl 1x IP-Puffer gewaschen. Pro Probe wurden 225 µl Elutionspuffer aus 45 µl 5x IP-Puffer, 75 µl 20 mM N⁶-Methyladenosin (aus Magna MeRIP™ m⁶A Kit, Millipore), 3,5 µl RiboLock und 101,5 µl H₂O angesetzt. Die Beads wurden jeweils in 100 µl Elutionspuffer resuspendiert, dabei wurden die 5 Proben mit gleicher RNA gepoolt. Nach einer einstündigen Inkubation unter Rotation bei 4°C wurde der Überstand mithilfe des Magnettracks von den Beads getrennt und abgenommen. Die Elution wurde mit weiteren 100 µl Elutionspuffer auf gleiche Weise noch einmal wiederholt und beide Eluate gepoolt. Pro eingesetzter RNA-Probe lag nach der Immunpräzipitation insgesamt 1 ml Eluat vor. Dieses wurde mithilfe der Amicon 3K Filter Units (Millipore) nach Herstellerangaben auf ein Volumen von 100 µl konzentriert. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der Proben mithilfe des RNA Clean & Concentrator™-5 Kit (ZymoResearch), wobei jede Probe in 30 µl upH₂O eluiert wurde. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mithilfe des Qubit® Fluorometers.

3.2.2.5 Library-Erstellung und NGS

Variante 1: Die cDNA-Synthese, *library*-Erstellung und das NGS mit bioinformatischer Auswertung wurden von der Firma CeGaT (Tübingen) durchgeführt. Das NGS erfolgte auf einem Illumina HiSeq2500 mit insgesamt 100 Millionen Reads. Bei der Datenauswertung wurden nur die Transkripte der Influenza mRNAs berücksichtigt und ihre Reads in der IP-angereicherten Probe auf die der Input-Kontrolle normiert, sodass für jede Base ein normierter Read-count angegeben werden konnte.

Variante 2: Die cDNA-Synthese, *library*-Erstellung und das NGS wurden von der Firma vertis Biotechnologie AG (Weihenstephan) durchgeführt. Das NGS erfolgte auf einem Illumina NextSeq500 mit 5 Millionen Reads pro Probe und einer Leselänge von 150 bp.

3.2.3 Detektion von m⁶A mittels ELISA

Der *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) kann nicht nur für den Nachweis von Proteinantigenen verwendet werden, sondern auch für die Detektion von Nukleinsäuren. In dieser Arbeit wurde damit m⁶A-haltige RNA nachgewiesen. Von der RNA wurde dabei eine Konzentrationsreihe in PBS erstellt und 50 µl der Verdünnungen in eine MaxiSorpTM-Platte (NuncTM) pipettiert. Die Platte wurde über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend mit 250 µl Blockpuffer pro well (1% BSA, 0,05% Tween20 in PBS^{def}) für 1 h bei RT geblockt. Es folgte dreimaliges manuelles Waschen mit PBS^{def} (200 µl/well). Der 1. Antikörper (anti-m⁶A von Synaptic Systems, 0,5 µg/µl) wurde 1:1000 in Blockpuffer verdünnt und in einem Volumen von 50 µl pro well in die Platte pipettiert. Die Inkubationszeit betrug 1 h bei RT. Die Platte wurde erneut dreimal gewaschen (s.o.). Der zweite Antikörper (anti-*rabbit*-POX) wurde 1:2000 in Blockpuffer verdünnt, in einem Volumen von 50 µl pro well auf die Platte gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen erfolgte die Substratzugabe und Absorptionsmessung wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) ist ein Antikörper-basiertes Verfahren zum Nachweis von Antigenen, das auf einer enzymatischen Farbreaktion beruht. In dieser Arbeit wurde der sogenannte *Sandwich*-ELISA angewendet. Dabei wird zunächst ein *Coating*-Antikörper gegen das nachzuweisende Antigen an eine feste Phase gebunden und anschließend mit dem Antigen inkubiert. Eine mitgeführte Standardreihe mit bekannten Konzentrationen der nachzuweisenden Substanz ermöglicht die spätere Erstellung einer Kalibrierungskurve zur Quantifizierung des Antigens in der Probe. Im nächsten Schritt wird das Antigen von einem zweiten, spezifischen Antikörper gebunden, der gegen ein anderes Epitop gerichtet ist. Dieser Antikörper kann direkt mit einer Peroxidase gekoppelt sein, die in einer anschließenden enzymatischen Reaktion die Entstehung eines kolorimetrisch detektierbaren Endprodukts bewirkt. Die Farbintensität ist dabei proportional zur Menge des Antigens in der Probe.

In dieser Arbeit wurde auf diese Weise humanes IFN α und humanes IL-6 in Zellkulturüberständen nachgewiesen. Bei dem Nachweis von IFN α wurde ein

Sekundärantikörper verwendet, welcher direkt mit einer Peroxidase gekoppelt ist, während für den Nachweis von IL6 ein Biotin-markierter Sekundärantikörper eingesetzt wurde. Hierbei war ein anschließender Inkubationsschritt mit Streptavidin-gekoppelter Peroxidase notwendig.

IL-6	IFNα
<u>Beschichtung einer 96-well Nunc Maxisorp-Platte, 50 μl Antikörperverdünnung pro well:</u>	
Rat Anti-human-IL-6 0,5 μ g/ml in PBS ^{def}	Anti-human-IFN α 100 ng/ml in PBS ^{def}
Inkubation über Nacht, 4°C, anschließend Ausschlagen der Platte	
Blocken unspezifischer Bindungsstellen mit 250 μ l Blockpuffer pro well, 1 h	
Waschen der Platten mit 250 μ l Waschpuffer pro well, 3 x	
<u>Zugabe der Proben und Standards:</u>	
Proben unverdünnt oder 1:5 in Blockpuffer	Proben unverdünnt oder 1:5 in Blockpuffer
Standards: 1. Standard 10 ng/ml	Standards: 1. Standard 4 ng/ml
1:2-Verdünnungsreihe über 7 Stufen	1:2-Verdünnungsreihe über 7 Stufen
Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur	
Waschen der Platten mit 250 μ l Waschpuffer pro well, 3 x	
<u>Zugabe des Detektionsantikörpers, 50 μl Antikörperverdünnung pro well</u>	
Biotin Rat Anti-Human-IL-6 0,5 μ g/ml in Blockpuffer	Anti-Human-IFN α , HRP-Konjugat 1:1000 in Blockpuffer
Inkubation Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur	
Waschen der Platten mit 250 μ l Waschpuffer pro well, 3 x	
<u>Zugabe von Streptavidin-POD</u>	
50 μ l pro well, 0,25 U/ml	
Inkubation 30 min bei RT	
Waschen der Platten mit 250 μ l Waschpuffer pro well, 3 x	
Zugabe der Substratlösung: 1 Tablette OPD (10 mg) wurden in 20 ml Substratpuffer gelöst und 20 μ l einer 30%igen H ₂ O ₂ -Lösung hinzugegeben, 50 μ l pro well	
Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 25 μ l 4 N H ₂ SO ₄ pro well	

Die Extinktion wurde in einem Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 490 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 650 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte mithilfe des Programms SoftMax Pro®.

3.3.2 Herstellung von Ganzzelllysaten

Für die Herstellung von Ganzzelllysaten zur Auftrennung von Proteinen in einem SDS-Gel wurden die Zellen in RIPA-Puffer (Thermo Scientific) lysiert. Dafür wurde der RIPA-Puffer zunächst mit Proteinase- und Phosphataseinhibitoren sowie EDTA versetzt:

Substanz	Stockkonzentration	Endkonzentration
Protease-Inhibitorcocktail	100x	1x
Na ₃ VO ₄	20 mM	200 µM
NaF	0,5 M	20 mM
EDTA	0,5 M	5 mM

1-3 x 10⁶ Zellen wurden in 80-100 µl des komplettierten RIPA-Puffers durch Rotieren für 30 min bei 4°C lysiert. Unlösliche Bestandteile wurden für 10 min bei 10000 x g (4°C) abzentrifugiert. Die Lysate wurden bei -20°C gelagert und für Proteinbestimmung mithilfe des BCA-Assays und für SDS-PAGE eingesetzt.

3.3.3 BCA Protein Assay

Die BCA-Methode kann zur kolorimetrischen Quantifizierung von Proteinen in einer Lösung verwendet werden und basiert auf der sogenannten Biuret-Reaktion: Proteine reduzieren zweiwertige Kupferionen in wässrig-alkalischer Lösung zu einwertigen Kupferionen, welche mit Bicinchoninsäure zu einem violetten Farbkomplex reagieren. Die Absorption des Farbstoffes ist dabei proportional zur Menge an Protein in der zu untersuchenden Probe. Mithilfe einer Kalibrierungsreihe mit bekannten Proteinkonzentrationen lässt sich so die Proteinmenge in der Probe bestimmen.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Zelllysaten wurde mithilfe des Pierce™ BCA Protein Assay Kits (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Kalibrierungsreihe wurde eine 1:2-Verdünnungsreihe einer 1 mg/ml BSA-Lösung über 7 Stufen hergestellt. Die Absorptionsmessung erfolgte mit einem Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 490 nm.

3.3.4 SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein gelelektrophoretisches Verfahren, das die Auftrennung von Proteinen unabhängig von ihrer Ladung und Faltung erlaubt. Zur Vorbereitung der Zelllysate wurden diese mit 6x Lämmli-Probenpuffer versetzt und bei 96°C für 5 min aufgekocht. Das SDS in dem Puffer bewirkt eine Überdeckung der Proteineigenladung, durch das Erhitzen werden zusätzlich Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine aufgelöst. Während der

Gelelektrophorese erfolgt die Auftrennung der Proteine daher nur in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes.

In dieser Arbeit wurden *RunBlue SDS Protein Gele 4-12%* von Expedeon gemäß den Herstellerangaben verwendet.

3.3.5 Western Blot

Die zuvor durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden im nächsten Schritt durch ein *Semi-dry*-Elektroblotting-Verfahren auf eine PVDF-Trägermembran übertragen und anschließend durch die Inkubation mit Primärantikörpern und Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern in einer Chemilumineszenzreaktion sichtbar gemacht.

Dafür wurde die PVDF-Membran zunächst für 15 min in Methanol inkubiert und anschließend zusammen mit dem SDS-Gel für 5 min in Transferpuffer geschwenkt. Der Blot wurde auf der Anodenplatte wie folgt aufgebaut (von der Kathode zur Anode):

- 500 µl Transferpuffer
- 3 Whatman-Filterpapiere, in Blotpuffer getränkt
- 500 µl Transferpuffer
- PVDF-Membran
- 500 µl Transferpuffer
- SDS-Gel
- 500 µl Transferpuffer
- 3 Whatman-Filterpapiere, in Transferpuffer getränkt

Der Blot erfolgte bei 0,8 mA pro cm² für 1 h. Für die anschließende Immundetektion eines nachzuweisenden Proteins wurde die Membran in Blockpuffer überführt und 1 h darin inkubiert. Der entsprechende Primärantikörper wurde in 10 ml Blockpuffer verdünnt und der Blot darin über Nacht bei 4°C geschwenkt (s. Tabelle). Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 min mit Waschpuffer wurden 10 ml des in Blockpuffer verdünnten, Peroxidase-markierten Sekundärantikörpers zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer und einem Waschschrift mit PBS wurde der Blot auf eine Glasplatte mit 500 µl des Chemilumineszenzsubstrats SuperSignal™ West Dura oder Femto gelegt. Nach einigen Minuten wurde das Substrat vom Blot entfernt und der Peroxidase-vermittelte Umsatz des Luminols mit dem „ChemiDoc XRS“ (BioRad) dokumentiert.

Antikörper	Verdünnung in Blockpuffer
Rabbit anti-YTHDF2	1:5000
Rabbit anti-Influenza H1N1 HA	1:30.000

Hybridomaüberstand HB64 mouse anti-Influenza M	1:20
Hybridomaüberstand HB65 mouse anti-Influenza NP	unverdünnt
Mouse anti-Aktin	1:10.000
Goat anti-mouse HRP	1:10.000
Goat anti-rabbit HRP	1:10.000

3.4 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter einer Werkbank der Sicherheitsstufe 2. Die verwendeten Puffer, Reagenzien und Medien wurden ebenfalls unter sterilen Bedingungen hergestellt und aufbewahrt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Inkubator bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ für primäre Zellen und 7,5% CO₂ für Zelllinien.

3.4.1 Kultivierung von Zelllinien

In dieser Arbeit wurden verschiedene immortalisierte Zelllinien für Stimulationen, RNA-Extraktionen und Infektionsexperimente verwendet. Alle verwendeten Zelllinien wurden in DMEM mit 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 0,1 µg/ml Streptomycin und 50 µM β-Mercaptoethanol kultiviert. Zusätzlich wurde dem Medium 10% FCS zugesetzt; das Medium für CaCo2-Zellen enthielt 20% FCS. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von ~90% alle 3-4 Tage passagiert. Dafür wurde der Zellrasen zunächst dreimal mit PBS^{def} gewaschen und anschließend mit einer 0,05% Trypsin/0,02% EDTA-Lösung bis zum Ablösen der Zellen inkubiert. Für Calu3-Zellen wurde, statt Trypsin, PBS mit 2 mM EDTA und 3% FCS verwendet. Die Zellen wurden in Kulturmedium resuspendiert und für 3 min bei 350 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in frischem Kulturmedium aufgenommen. Je nach Teilungsrate der Zelllinie wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:20 passagiert, sodass nach 3-4 Tagen erneut eine 90%ige Konfluenz erreicht war. Alle Zelllinien wurden regelmäßig auf Mycoplasmenkontaminationen getestet.

3.4.2 Überprüfung der Zellkulturen auf Mycoplasmen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden regelmäßig auf das Vorhandensein von Mycoplasmen kontrolliert. Dafür wurden TLR2/CD14-exprimierende HEK-Zellen verwendet, die stabil mit einem NFκB-Luziferase-Reporterplasmid transfiziert sind. TLR2 wird durch verschiedene bakterielle Komponenten, unter anderem das

Lipoarabinomannan aus Mycoplasmen, aktiviert und setzt eine Signalkaskade in Gang an deren Ende die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B erfolgt. CD14 führt zu einer Verstärkung der TLR2-Erkennung. Da das Luziferasegen unter der Kontrolle eines NF κ B-Promotors steht, können die TLR2/CD14-exprimierenden HEK-Zellen nach Stimulation mit Kulturüberständen das Vorhandensein von Mycoplasmen im Kulturüberstand in einem Luziferaseassay anzeigen.

Der Reporterassay wurde in einer 96well-Platte in Vierfachbestimmungen durchgeführt. Die HEK-Zellen wurden an Tag 0 mit 3×10^4 Zellen/well ausgesät. Am Tag 1 folgte die Stimulation mit den zu testenden Zellkulturüberständen. Dafür wurden 100 μ l unverdünnter Kulturüberstand auf die HEK-Zellen gegeben. Als Negativkontrollen wurde Medium sowie zuvor als negativ getesteter Zellüberstand mitgeführt. Als Positivkontrollen dienten positiv getesteter Zellüberstand sowie der in Medium verdünnte TLR1/2-Ligand Pam3Cys in einer Endkonzentration von 1 μ g/ml. Die Inkubation erfolgte für 16-20 h bei 37°C und 7,5% CO₂. Danach wurden die Zellen in 1x *Reporter Lysis Buffer* (Promega) lysiert (50 μ l/well) und die Reporterogenaktivität im Luziferaseassay bestimmt. Dafür wurden 20 μ l des Zelllysats in eine lichtundurchlässige 96well-Platte pipettiert. Die Messung wurde an einem Orion II Microplate Luminometer von Berthold Detection Systems mit Firefly-Puffer durchgeführt, die Auswertung erfolgte mit dem Programm Simplicity 4.1.

3.4.3 Arbeit mit primären Zellen

3.4.3.1 Aufreinigung von humanen PBMCs

Blut besteht aus Plasma und zellulären Bestandteilen, zu denen die Erythrozyten und Thrombozyten, sowie die Leukozyten gehören. Mithilfe der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation können die peripheren, mononukleären Zellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) vom Plasma und den anderen zellulären Bestandteilen getrennt werden. Die PBMC-Fraktion beinhaltet Monozyten, Dendritische Zellen, T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen. Für ihre Aufreinigung dienten *buffy coats* als Ausgangsmaterial. *Buffy coat* bezeichnet die Schicht aus Leukozyten und Thrombozyten, die bei der Zentrifugation von antikoaguliertem Blut zwischen der Plasmaschicht und dem Erythrozytensediment entsteht. Sie wurden aus der Abteilung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Gießen und Marburg bezogen.

Für die Aufreinigung der PBMCs wurden 12 ml Ficoll in ein Falcon gegeben, mit 25 ml *Buffy coat* überschichtet und für 30 min bei 20°C und 670 g zentrifugiert. Das Ficoll hat eine Dichte von 1,077 g/ml und bewirkt eine Sedimentation der PBMCs auf der Ficoll-

Schicht, während sich Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihrer höheren Dichte unter dem Ficoll sammeln (s. Abbildung 3.2).

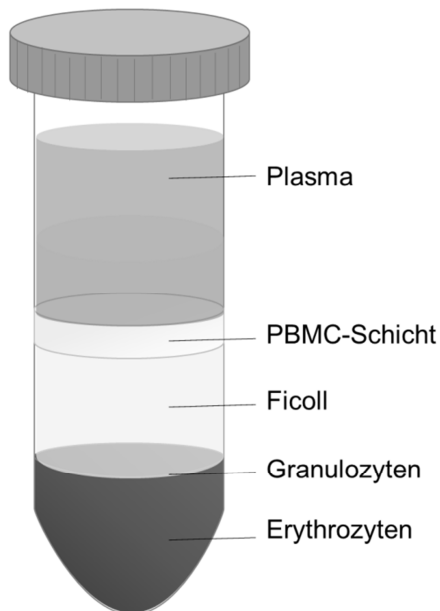


Abbildung 3.2: Graphische Darstellung zur Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation. PBMCs reichern sich nach der Zentrifugation zwischen Plasma- und Ficollschicht an.

Die Plasmaphase wurde abgenommen, die PBMC-Phase in ein neues Röhrchen überführt und zweimal mit je 50 ml PBS^{def} gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte bei 350 g und 4°C für 7 min. Zum Schluss wurden die Zellen in RPMI^{complete} mit 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 0,1 µg/ml Streptomycin, 1x nicht-essentiellen Aminosäuren und 1 mM Natriumpyruvat resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend mithilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt und für Stimulationsexperimente verwendet. Hierbei wurde dem Zellkulturmedium 2% humanes Serum von männlichen Spendern der Blutgruppe AB zugesetzt.

3.4.3.2 Isolation von humanen pDCs mittels MACS-Separation

Für die Isolation von humanen pDCs für Stimulationsexperimente wurden zunächst PBMCs aus Buffy coats aufgereinigt (s. 3.4.3.1). Spender mit hohem Anteil an pDCs wurden durch Oberflächenfärbung der PBMCs mit einem BDCA-2-FITC-Antikörper und anschließender FACS-Analyse ermittelt (s. 3.6). Der BDCA-2-Antikörper (Miltenyi Biotec) wurde dabei in einer Endverdünnung von 1:11 eingesetzt. Aus den PBMC-Fractionen mit hohem pDC-Anteil wurde zunächst eine Einzelzellsuspension hergestellt. Dafür wurden die Zellen mittels eines 30 µm-Separationsfilter vereinzelt. Anschließend folgte die Aufreinigung der pDCs mithilfe des „Plasmacytoid Dendritic Cell Isolation Kit II, human“ (Miltenyi Biotec) nach Herstellerangaben. Hierbei werden alle „Nicht-pDC“-Zellen durch spezifische Antikörper an Magnet-Beads gebunden und

anschließend durch magnetische Kraft in einer Säule immobilisiert. Die pDCs bleiben ungebunden und können die Säule passieren. Zum Schluss wurden auch die gebundenen Zellen aus der Säule gelöst. Beide Zellpopulationen wurden, wie oben beschrieben, mit dem BDCA-2-Antikörper gefärbt und im FACS analysiert, um die Reinheit und Effizienz der pDC-Aufreinigung zu bestimmen.

3.4.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl in einer Zellsuspension wurde die Neubauer-Zählkammer verwendet. Ein Aliquot der Zellen wurde im Verhältnis 1:2 mit einer 0,25% Trypanblaulösung versetzt. 10 µl dieser Zellsuspension wurden in die Zählkammer pipettiert und die Zellen in 4 großen Eckquadraten ausgezählt. Der Mittelwert der pro Eckquadrat gezählten Zellen ergibt mithilfe folgender Formel die Zellzahl pro ml in der Ausgangssuspension:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Zellzahl im Eckquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4}{\text{ml}}$$

3.4.5 Stimulation von Zellen

Die Stimulation von humane PBMCs (3.4.3.1) wurde in 96well-Flachbodenplatten durchgeführt, für die Stimulation der pDCs (3.4.3.2) wurden 96well-Rundbodenplatten verwendet. Soweit nicht anders vermerkt, wurden von den pDCs, je nach Ausbeute der Aufreinigung, 1-2 x 10⁴ Zellen pro well in einem Volumen von 100 µl in die Platte gegeben, von den PBMCs und den pDC-depletierten Zellen wurden 1-3 x 10⁵ Zellen verwendet. Die verschiedenen PRR-Stimuli, die als Kontrollen mitgeführt wurden, sowie die zu testenden Viren wurden in einem Volumen von 100 µl pro well in Doppelbestimmungen zu den Zellen gegeben. Dabei wurden folgende Konzentrationen eingesetzt:

Stimulus	Stockkonzentration	Endkonzentration im well
RNA40	100 µM	0,75 µM
R848	1 mg/ml	1 µg/ml
Oligo 2216	500 µM	1 µM
LPS	1 mg/ml	10 ng/ml

Die RNA40, die mit Dotap komplexiert werden musste, wurde zunächst in einem Volumen von 50µ/well angesetzt. Diesem Ansatz wurde dann die Dotap-Lösung im gleichen Volumen zugegeben. Dafür wurden pro well 1,5 µl Dotap und 48,5 µl Optimem angesetzt. Von dieser Mischung wurden ebenfalls 100 µl auf die Zellen gegeben. Die stimulierten Zellen wurden für 16-20 h bei 37°C, 5% CO₂ und 100%

Luftfeuchtigkeit inkubiert. Danach wurden die Überstände der Zellen abgenommen und die Menge der freigesetzten Zytokine mittels ELISA gemessen (s. 3.3.1).

3.4.6 CRISPR-Cas9

Das CRISPR-Cas-System wird für gezielte Genomveränderungen verwendet, um Insertionen, Deletionen oder Gen-*knockouts* zu bewirken. Ursprünglich stammt es aus dem adaptiven Immunsystem von Prokaryonten und bewirkt durch RNA-geführte Nukleasen eine Veränderung von fremden Nukleinsäuren. Bei der Genomeditierung wird die Nuklease Cas9 durch eine *single-guide* RNA (sgRNA) zu der komplementären DNA-Sequenz geführt und induziert einen Doppelstrangbruch in der Nähe des *protospacer adjacent motifs* (PAM). Endogene Reparaturmechanismen induzieren ein *nonhomologous end joining* (NHEJ), was zu zufälligen Insertionen oder Deletionen an der Bruchstelle führen kann. (Cong *et al.* 2013; Jinek *et al.* 2012) Findet dies innerhalb einer codierenden Gensequenz statt, kann es durch die Insertionen oder Deletionen zu einer Verschiebung des Leserahmens oder einer Generierung von außerplanmäßigen Stopcodons kommen, was die Expression eines funktionalen Proteins verhindert.

In dieser Arbeit wurde das System für den *knockout* des Proteins YTHDF2 in CaCo2-Zellen verwendet. Dafür wurden zunächst zwei verschiedene sgRNAs konzipiert, welche komplementär zu der zu editierenden DNA-Sequenzen sind und so den Ort des Cas9-induzierten Doppelstrangbruchs vorgeben:

sgRNA 1: 5'-GGAACCTTACTTGAGTCCAC-3' AGG (Kennedy *et al.* 2016)

sgRNA 2: 5'-GGGTAAGTAGGAATCTGACA-3' TGG

Für das hier verwendete, von *Streptococcus pyogenes* abgeleitete CRISPR-Cas-System muss auf das 3'-Ende der sgRNA-Sequenz ein NGG-Motiv (*protospacer adjacent motif*, PAM) in der DNA-Zielsequenz folgen (unterstrichen), welches jedoch nicht Teil der 20 nt sgRNA ist. Auf den Sequenzen der sgRNAs basierend wurden je zwei komplementäre Oligos synthetisiert. Diese wurden in den Expressionsvektor pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) kloniert, welcher nach Transfektion die Expression der sgRNA sowie der Nuklease Cas9 in der Zelle vermittelt. Die Oligos wurden so konzipiert, dass sie Überhänge (grau markiert) für die Ligation mit BbsI-Schnittstellen enthielten. Die Synthese erfolgte durch die Firma Metabion.

Oligo sgRNA 1: sense: CACCGGGAACCTTACTTGAGTCCAC

antisense: AAACGTGGACTCAAGTAAGGTTCCC

Oligo sgRNA 2: antisense: CACCGGGGTAAGTAGGAATCTGACA

sense: AAAGTGTGAGATTCTACTTACCCC

1. Die komplementären Stränge wurden in folgender Reaktion *annealt*:

sgRNA 1	sgRNA 2
1 µl 100 µM Oligo sense	1 µl 100 µM Oligo sense
1 µl 100 µM Oligo antisense	1 µl 100 µM Oligo antisense
5 µl 2x Liposomenpuffer	5 µl 2x Liposomenpuffer
3 µl H ₂ O	3 µl H ₂ O

PCR-Programm: 37°C 30 min, 95°C 5 min, dann Temperaturgradient auf 25 °C mit -5°C/min.

2. Ligation

pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459), geschnitten mit BbsI	0,5 µl
Oligo aus Schritt 1, 1:200 verdünnt	2 µl
T4 Ligase Puffer, 10x	2 µl
T4 Ligase	0,5 µl
H ₂ O	Auf 20 µl auffüllen

Inkubation bei RT für 4 h

3. Transformation, Minipräparation und Maxipräparation

s. Abschnitt 3.1.5 und 3.1.6

Nach der Minipräparation wurden die Sequenzen verschiedener Klone durch Sequenzierung mit dem U6-fw-Primer überprüft. Pro Ligationsansatz (sgRNA1 und sgRNA2) wurde je ein Klon für die Maxipräparation ausgewählt und die daraus resultierende Plasmid-DNA erneut sequenziert.

4. Transfektion von CaCo2-Zellen

CaCo2-Zellen wurden in einer Zellzahl von $1,5 \times 10^5$ Zellen pro 24well ausgesät. Zwei Tage später erfolgte die Transfektion mit 500 ng der jeweiligen Plasmid-DNA und Lipofektamin® 2000 nach Herstellerprotokoll. Nach 24 h wurden 20% FCS und 5 µg/ml Puromycin zugegeben. Nach weiteren 4 Tagen wurden die Zellen trypsiniert und mit 1 bzw. 3 Zellen pro well in einer 96well-Zellkulturplatte ausplattiert und ohne Puromycin weiter im Brutschrank kultiviert.

5. Kultivierung der Zellklone

Nach ca. 4 Wochen wurden die Zellklone aus der 96well-Platte gelöst und in 24well-Platten überführt. Es folgte die weitere Kultivierung der Zellen wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben.

6. DNA-Isolation und Sequenzanalyse

Für die Genotypisierung wurde ein Teil der Zellen trypsinisiert, mit PBS gewaschen und in 300 µl Lysepuffer (mit 100 µg/ml Proteinase K) pro 3×10^7 Zellen für 1 h bei 56°C lysiert. Es folgte die Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol und das Entnehmen des resultierenden DNA-Fadens mithilfe eines Zahnstochers. Dieser wurde in H₂O gelöst. Zur Amplifikation der entsprechenden DNA-Sequenz wurden 50 ng DNA für eine Phusion-PCR eingesetzt:

5 x Phusion HF Buffer (Thermo)	5 µl
10 mM dNTP-Mix	0,5 µl
Primer YTHDF2 DNA fw (1:10)	1,25 µl
Primer YTHDF2 DNA fw (1:10)	1,25 µl
Template DNA (ca. 50 ng)	1 µl
Phusion Polymerase (Thermo)	0,25 µl
H ₂ O	Auf 25 µl auffüllen

PCR-Programm:

1	98°C	30 s
2	98°C	10 s
3	63°C	30 s
4	72°C	30 s
5	Go to 2) 29 x	
6	72°C	5 min
7	4°C	forever

Das PCR-Produkt wurde mithilfe des PCR-Purification Kits (Thermo Fisher) nach Herstellerangaben gereinigt und, wie in Abschnitt 3.1.7 beschrieben, mithilfe des jeweiligen fw-Primers sequenziert. Die Analyse der Sequenzen erfolgte mit BioEdit.

3.5 Virologische Methoden

3.5.1 Virusanzucht

3.5.1.1 Virusanzucht im embryonierten Hühnerei

Für die Anzucht von Influenzaviren eignet sich eine Reihe verschiedener Zellsysteme. Die klassische Methode der Anzucht in embryonierten Hühnereiern ermöglicht jedoch die Herstellung großer Mengen einer Virusstocklösung mit hohen Titern. In dieser Arbeit wurde die Methode verwendet, um Stocklösungen des Influenzavirus A/Puerto

Rico/8/1943 (H1N1) herzustellen. Dafür wurden 11 Tage alte, befruchtete Hühnereier verwendet, welche zunächst mithilfe einer Schierlampe auf das Vorhandensein eines lebendigen Embryos mit intakter Gefäßversorgung überprüft wurden. Anschließend wurde die Allantoishöhle mit 0,2 ml Virusinokulum mithilfe einer feinen Kanüle infiziert. Bei dem Virusinokulum handelte es sich um native, virushaltige Allantoisflüssigkeit, die zuvor 1:1000 mit PBS^{def} verdünnt wurde. Die Injektionsstellen wurden mit Holzleim verschlossen und die infizierten Eier für 48 h bei 37°C und 80% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Mit der Schierlampe wurde dabei erneut die Vitalität der Embryonen überprüft, wobei abgestorbene Embryonen aussortiert wurden. Nach der Inkubationszeit wurden die Eier über Nacht bei 4°C abgekühlt, um eine Kontraktion der Blutgefäße zu bewirken. Die Schale oberhalb der Allantoishöhle wurde vorsichtig abgetragen und die virushaltige Allantoisflüssigkeit mit einer Kanüle und Spritze aufgesaugt. In einer niedertourigen Zentrifugation bei 3000 rpm für 30 min und 4°C (Rotor JA-10) wurde die Allantoisflüssigkeit zunächst von Zellresten befreit. Die Pelletierung des Virus erfolgte anschließend bei einer Zentrifugation des Überstandes bei 18000 rpm für 1 h bei 4°C in einem JA-10-Rotor. Die Pellets wurden mit PBS^{def} überschichtet, für 1 h auf Eis quellen gelassen und schließlich resuspendiert. Für die weitere Aufreinigung wurde ein 55%-30% Sucrosegradient in sterilisierten Ultrazentrifugenröhrchen angelegt und über Nacht bei 4°C stehen gelassen. Der Gradient wurde mit je 1,5 ml der ankonzentrierten Virussuspension überschichtet und für 16 h bei 24000 rpm und 4°C zentrifugiert (SW28-Rotor). Die Virusbande wurde abgenommen, mit PBS^{def} vermischt und erneut für 1 h bei 24000 rpm und 4°C im SW28-Rotor zentrifugiert. Die Pellets wurden anschließend, wie oben beschrieben, in PBS^{def} aufgenommen. Durch eine Zentrifugation für 5 min bei 3000 rpm wurden eventuelle Virusaggregate entfernt. Mit der Virussuspension wurde ein HA-Test durchgeführt (s. 3.5.6.1). Anschließend wurde die Virussuspension auf 10⁵ HAU/ml eingestellt und in 250-500 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff gelagert. Der Virustiter wurde durch Einzelzellinfektionsassay (3.5.6.2) bestimmt.

3.5.1.2 Virusvermehrung in Zelllinien

Da die Passage von humanen Influenzaviren in Hühnereiern zu ungewollten Mutationen führen kann, die die Rezeptorspezifität und Antigenität der Viren beeinflussen können, wurden die in dieser Arbeit hergestellten, rekombinanten Viren auf Säugetierzellen vermehrt. Dafür wurden vor allem MDCK-Zellen und CaCo2-Zellen verwendet.

Die Zellen wurden hierfür in einer 75cm²-Zellkulturflasche kultiviert, bis sie eine Konfluenz von etwa 90% erreicht hatten. Dann wurden sie dreimal mit PBS⁺⁺

gewaschen und mit der Virusstocklösung infiziert. Hierfür wurde eine *multiplicity of infection* (MOI) von 0,0001 eingesetzt. Diese bezeichnet das Verhältnis der Anzahl an Viruspartikeln zu der Zellzahl und lässt sich durch folgende Formel bestimmen:

$$MOI = \frac{\text{Zahl der Viruspartikel (PFU)}}{\text{Zellzahl pro Kulturflasche}}$$

Die entsprechende Menge Virus wurde in 12 ml Infektionsmedium (mit 0,1% BSA) auf die Zellen gegeben. Um eine Spaltung des Hämagglutinins zu gewährleisten, wurde im Falle der MDCK-Zellen zusätzlich Trypsin-TPCK in einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugesetzt. Die infizierten Zellen wurden für bis zu 72 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Trat eine starke Gelbfärbung des Mediums durch einen zu sauren pH-Wert auf, wurde mit 7,5% Natriumbicarbonat-Lösung gepuffert. Nach der Inkubationszeit wurde der virushaltige Überstand in ein Falcon überführt und bei 3000 rpm für 10 min zentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. Wurde Überstand von MDCK-Zellen verwendet, wurde dieser anschließend erneut mit Trypsin-TPCK in einer Endkonzentration von 1 µg/ml für eine 1 h bei 37°C inkubiert. Die Überstände wurden in 250-500 µl Aliquots bei -80°C gelagert. Der Virustiter wurde mittels Hämagglutinationsassay (3.5.6.1) und Einzelzellinfektionsassay (3.5.6.2) bestimmt.

3.5.2 Generierung rekombinanter Viren

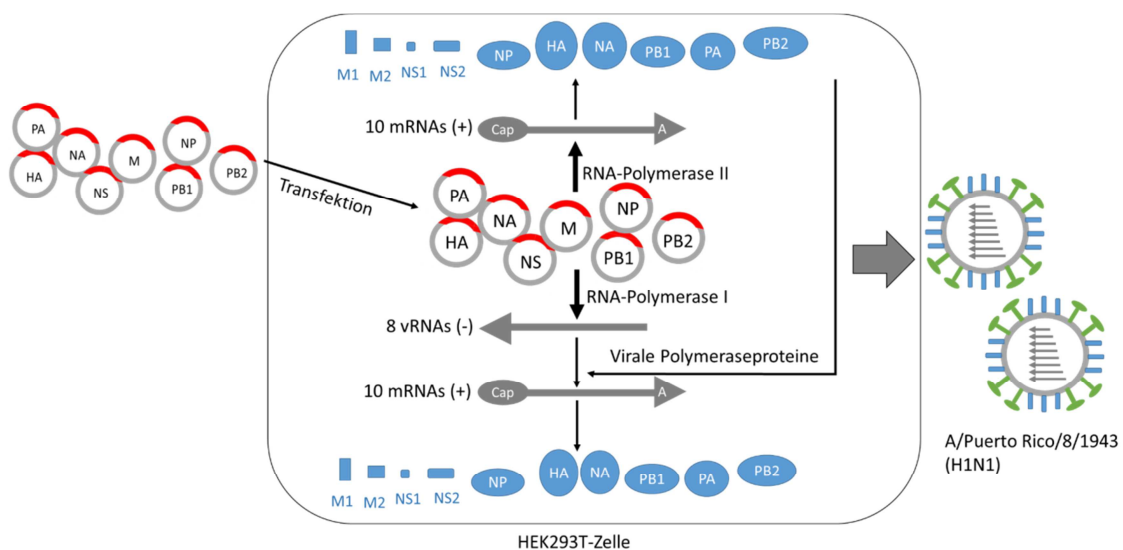


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des 8-Plasmid-Systems nach E. Hoffmann. Acht Expressionplasmide, welche die viralen cDNAs enthalten, werden in HEK-Zellen transfiziert. Die viralen cDNAs werden von zwei verschiedenen Promotoren flankiert. So werden in der Zelle sowohl die viralen mRNAs als auch die viralen genomischen RNAs synthetisiert. Nach der Translation der viralen Proteine findet das *assembly* statt und infektiöse Viren werden freigesetzt. Modifiziert nach Hoffmann *et al.* (2000).

Zur Herstellung rekombinanter Influenzaviren wurde in dieser Arbeit das von Hoffmann *et al.* (2000) entwickelte 8-Plasmid-System verwendet. Dafür werden die viralen Gensegmente in cDNA umgeschrieben und in Expressionsvektoren kloniert. Die cDNA

wird dabei zwischen den Promotor und die Terminatorsequenz für die zelluläre RNA-Polymerase I positioniert. Die Transkriptionseinheit für die Polymerase I wird wiederum von dem Promotor für die Polymerase II sowie einem Polyadenylierungssignal umrahmt, was nach Transfektion in HEK-Zellen die Transkription zweier verschiedener RNA-Moleküle ermöglicht: durch die Polymerase I werden acht virale, negativ-strängige RNA-Moleküle synthetisiert, während die Polymerase II mRNAs mit einer 5'-Cap-Struktur und einer 3'-Poly(A)-Sequenz herstellt (s. Abbildung 3.3). Diese mRNAs werden anschließend in virale Proteine translatiert. Sobald die Proteine des viralen Polymerasekomplexes generiert wurden, wird der virale Replikationszyklus gestartet. Die verschiedenen viralen Komponenten assemblieren zu infektiösen Partikeln und werden von den Zellen in den Kulturüberstand freigesetzt. Da sich HEK-Zellen zwar gut für Transfektionen eignen, aber nur wenige Viruspartikel freisetzen, wird der Kulturüberstand anschließend auf MDCK-Zellkulturen übertragen und weiter vermehrt. Für die Generierung infektiöser Influenzaviren muss das Vorläufermolekül des Hämagglutinins, HA₀, in seine zwei Untereinheiten gespalten und so aktiviert werden. Dies geschieht durch endogene Trypsin-ähnliche Proteasen, die jedoch nicht von allen Zelllinien exprimiert werden. HEK293-Zellen und MDCK-Zellen fehlt ein solches Enzym, daher muss den infizierten Kulturen Trypsin zugesetzt werden, um infektiöse Viren zu erhalten.

In dieser Arbeit wurden Influenzaviren mit verschiedenen Mutationen im HA-, NA- und NS-Segment erzeugt. Die mutierten Segmente wurden als DNA, umrahmt von Erkennungssequenzen für das Restriktionsenzym BsmBI, von der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert und in einem pEX-Vektor geliefert. Anschließend wurden die DNA-Segmente in den Expressionsvektor pHW2000 umklontiert (s. Abschnitt 3.1.4.2)

Die HEK293-Zellen wurden am Vortag passagiert, sodass über Nacht eine etwa 80%ige Konfluenz erreicht wurde. Für jeden Transfektionsansatz wurden 1 µg jedes Plasmids in 500 µl Optimem gegeben und separat 25 µl Lipofektamin und 475 µl Optimem gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Lipofektaminmischung im Verhältnis 1:1 zu dem DNA-Ansatz gegeben und für 20 min bei RT inkubiert.

Währenddessen wurden die Zellen zweimal mit PBS⁺⁺ gewaschen und mit 4 ml Optimem überschichtet. Nach der Inkubationszeit wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben. Die Kultur wurde für 6 h im Brutschrank inkubiert, danach wurde das Medium entfernt und 4 ml Infektionsmedium mit 0,1% BSA zugegeben. Um einen optimalen pH-Wert zu gewährleisten, wurde bei gelblicher Verfärbung des Mediums mit 7,5% Natriumbicarbonat-Lösung gepuffert. Nach bis zu 72 h erfolgte die Ernte des

Überstandes und eine Zentrifugation bei 3000 rpm für 10 min, 4°C. Der Überstand wurde mit Trypsin-TPCK in einer Endkonzentration von 1 µg/ml versetzt, für 1 h bei 37°C inkubiert, anschließend aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Die hergestellten Viren wurden nun in mehreren Passagen auf MDCK-Zellen vermehrt. Für die erste Passage wurden 90% konfluente MDCK-Zellen in 25cm²-Kulturflaschen verwendet. Diese wurden zweimal mit PBS⁺⁺ gewaschen, anschließend wurden pro Flasche 4 ml Infektionsmedium mit 0,1% BSA und 1 µg/ml Trypsin-TPCK, 50 µl 7,5% Natriumbicarbonat-Lösung und 1 ml des virushaltigen HEK-Zellüberstandes zugegeben. Die Zellen wurden anschließend für 2-3 Tage im Brutschrank inkubiert, bis ein CPE sichtbar wurde. Die Ernte des Überstandes und die Trypsinbehandlung wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Der Virustiter wurde anschließend mittels Hämagglutinationsassay (3.5.6.1) und Einzelzellinfektionsassay (3.5.6.2) bestimmt.

Die zweite Passage wurde in MDCK-Zellen oder CaCo2-Zellen im 75cm²-Kulturformat, wie in Abschnitt 3.5.1.2 beschrieben, durchgeführt. Aus der zweiten Passage wurden Virusstocks hergestellt und für alle weiteren Experimente verwendet. Die Genotypisierung der Viren erfolgte durch Sequenzierung der Gensegmente HA, NA und NS, wie in Abschnitt 3.5.3 beschrieben.

3.5.3 Genotypisierung von Viren

Um die eingefügten Mutationen sowie das Auftreten ungewollter Mutationen im Virusgenom zu kontrollieren, mussten Teile des viralen Genoms durch Genotypisierung überprüft werden. Dafür wurde zunächst aus dem Überstand einer infizierten Zellkultur die RNA isoliert und die virale RNA mittels eines spezifischen Primers in cDNA umgeschrieben. Das zu sequenzierende Gensegment wurde anschließend in einer PCR vermehrt und durch Gelelektrophorese und Gelextraktion isoliert bevor es schließlich durch Sanger-Sequenzierung analysiert werden konnte.

3.5.3.1 Isolation viraler RNA aus Zellkulturüberständen

Für die Isolation viraler RNA wurden 300 µl des virushaltigen Zellkulturüberstandes mit 350 µl des RLT-Puffers aus dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) vermischt. Dem Ansatz wurden 650 µl 70% EtOH zugegeben und die Mischung schrittweise auf eine RNeasy Mini Säule gegeben und für 30 s bei 14000 rpm zentrifugiert. Anschließend erfolgte ein DNase-Verdau mit dem RNase-free DNase Set (Qiagen) nach Herstellerangaben und die weitere Aufreinigung der RNA, ebenfalls nach Herstellerprotokoll („*Purification of Total RNA from Animal Cells using Spin Technology*“). Abschließend wurde die RNA in 30 µl upH₂O eluiert. Für den zweiten Elutionsschritt wurde das Eluat aus dem ersten Schritt verwendet um die RNA-Konzentration zu erhöhen.

3.5.3.2 cDNA-Synthese und Amplifikation durch PCR

Von dem Eluat aus 3.5.3.1 wurden 4 µl eingesetzt und mit 2 µl Uni12-Primer versetzt. Dieser Primer ist komplementär zur den 12 konservierten Nukleotiden am 3'-Ende der viralen Gensegmente und erlaubt so eine Reverse Transkription aller 8 Influenza-Gensegmente in einem Ansatz (Hoffmann *et al.* 2001). Die Probe wurde für 5 min bei 65°C inkubiert. Die weitere Reverse Transkription erfolgte wie in Abschnitt 3.1.13 beschrieben. Je nach zu erwartender RNA-Menge wurde der Ansatz vor der PCR 1:3 mit H₂O verdünnt.

Für die Segment-spezifische PCR wurde ein Mastermix aus 12,5 µl „DreamTaq Green PCR Master Mix“ (Thermo Scientific), 0,5 µl Primer (je *forward* und *reverse*, 200 nM Endkonzentration) und 6,5 µl H₂O pro Probe angesetzt. Zu 20 µl dieses Mastermixes wurden 5 µl der cDNA gegeben.

Die Segment-spezifischen Primer sind durch Hoffmann *et al.* (2000) beschrieben. Das PCR-Programm wurde wie in 3.1.2 beschrieben ausgeführt. Dabei wurde eine Anlagerungstemperatur von 55°C gewählt und die Extensionszeit auf 7 min erhöht. Die Segment-übergreifenden Ähnlichkeiten in der konservierten Region am 3'- und 5'-Ende des viralen Genoms, in der die Primer binden, bewirken eine zum Teil geringe Spezifität der Primer für ihr jeweiliges Gensegment. Dadurch konkurriert in einem Reaktionsansatz die Entstehung eines kurzen PCR-Produkts, wie der des NS-Segments, mit der Entstehung eines langen Produkts, wie des HA-Segments. Die lange Extensionszeit ist daher notwendig um, neben der Amplifikation der kurzen PCR-Produkte, auch eine effiziente Amplifikation der langen Gensegmente zu gewährleisten (Hoffmann *et al.* 2000).

3.5.3.3 Gelextraktion der viralen PCR-Produkte und Sequenzierung

Die PCR-Produkte wurden wie in 3.1.1 beschrieben, in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Gelextraktion mithilfe des GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, s. Abschnitt 3.1.9). Die DNA wurde mit 50 µl H₂O eluiert.

12 µl des Gelextraktionsprodukts wurden mit 30 pmol des jeweiligen Sequenzierprimers versetzt und in einem Gesamtvolumen von 15 µl zur Firma SeqLab nach Göttingen geschickt (s. 3.1.7). Die Auswertung erfolgte mit dem Programm BioEdit sowie BLAST® (NCBI).

3.5.4 Infektion von Zellen zur Gewinnung von Gesamt-RNA

Da virale mRNA nur innerhalb von infizierten Zellen vorliegt, wurde in dieser Arbeit Gesamt-RNA aus infizierten Zellen gewonnen, um die virale mRNA zu analysieren. Die dafür verwendeten Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80-90% kultiviert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS⁺⁺ gewaschen und, je nach Versuch, mit 1-3 MOI des Virus A/PR/8 infiziert. Dafür wurde die entsprechende Menge des Virus mit Kulturmedium ohne FCS gemischt und auf die Zellen gegeben. Nach einstündiger Inkubationszeit im Brutschrank wurde das Inokulum entfernt und frisches Kulturmedium mit 2% FCS zugegeben. Die weitere Inkubation erfolgte, soweit nicht anders angegeben, für 6 h bei 37°C im Brutschrank. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS⁺⁺ gewaschen und entweder in TriReagent®/ExtraZol oder in Lösung D lysiert. Die RNA-Isolation erfolgte wie in Abschnitt 3.1.11.1 bzw. 3.1.11.2 beschrieben.

3.5.5 Infektion von Zellen zur Herstellung von Ganzzelllysaten

Um Ganzzelllysate infizierter Zellen herzustellen, wurden die Zellen in 6well-Platten bis zu einer Konfluenz von 80-90% kultiviert, anschließend zweimal mit PBS⁺⁺ gewaschen und mit 2 MOI des jeweiligen Virus infiziert. Das Inokulum ohne FCS wurde für eine Stunde bei 37°C auf den Zellen gelassen. Danach wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS⁺⁺ gewaschen und erhielten 3 ml frisches Kulturmedium mit 2% FCS. Die Inkubation erfolgte für 12 bis 72 h im Brutschrank, dann wurde der Überstand entfernt und die Zellen einmal mit PBS⁺⁺ gewaschen. Die Lyse der Zellen erfolgte wie in 3.3.2 beschrieben.

3.5.6 Methoden zur Virustiterbestimmung

3.5.6.1 Hämagglutinationsassay

Der HA-Test kann zur quantitativen Bestimmung von Influenzaviruspartikeln verwendet werden. Er beruht auf der Fähigkeit von Influenzaviren, durch das HA-Molekül Erythrozyten zu agglutinieren. Ab einer bestimmten Virusverdünnung unterbleibt die Quervernetzung und die Erythrozyten werden als roter „Knopf“ auf dem Boden der Mikrotiterplatte sichtbar. Der Test unterscheidet jedoch nicht zwischen infektiösen und nicht-infektiösen Viruspartikeln und kann daher nur für einen groben Vergleich der Titer von verschiedenen Viruslösungen dienen.

Für den Hämagglutinationstest muss daher zunächst eine 1%ige Erythrozytensuspension aus Hühnerblut hergestellt werden. Das Blut wurde in S-Monovetten® (Sarstedt) abgenommen und bei 4°C bis zu einer Sedimentation der Blutzellen gelagert.

Um lysierte Erythrozytenbestandteile zu entfernen wurden 500 µl der sedimentierten Erythrozyten mit PBS^{def} gewaschen bis der Überstand nach 10-minütiger Zentrifugation bei 2000 rpm klar war. Anschließend wurde das Zellpellet in 50 ml PBS^{def} aufgenommen und im Kühlschrank gelagert.

Für den Hämagglutinationstest wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe der Virussuspension in einer 96 Well-Mikrotiterplatte mit U-förmigen Vertiefungen mit 25 µl pro well hergestellt. In jedes well wurden 25 µl der 1%igen Hühnererythrozytensuspension gegeben und die Platte anschließend bis zur Auswertung stehen gelassen. Der Hämagglutinationstiter ist definiert als der Kehrwert der Verdünnungsstufe, bei der noch eine Hämagglutination auftritt.

3.5.6.2 Einzelzellinfektionsassay

Bei einem Einzelzellinfektionsassay wird ein konfluenter Zellrasen mit einer Verdünnungsreihe einer zu titrierenden Virussuspension infiziert und über Nacht inkubiert. Während dieser Zeit infizieren die Viren einzelne Zellen, durchlaufen aber nur einen Replikationszyklus, sodass die Freisetzung neuer Viren und die Infektion weiterer Zellen verhindert werden. Der Zellrasen wird anschließend fixiert und die infizierten Zellen mithilfe einer intrazellulären Immunfärbung gegen Influenzaproteine angefärbt. Da eine gefärbte Zelle einem Viruspartikel entspricht, kann aus der Zahl der gefärbten Zellen der Virustiter in der Einheit PFU/ml berechnet werden.

Für die Infektion wurden am Vortag $3,5 \times 10^4$ MDCK-H-Zellen pro well in eine 96-well-Mikrotiterplatte ausgesät, sodass über Nacht eine 100%ige Konfluenz erreicht wurde. Die Virussuspension wurde in einer 1:10 Verdünnungsreihe in Infektionsmedium mit 0,1% BSA verdünnt. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS⁺⁺ wurden 100 µl der Virusverdünnungen pro well in Zwei- bis Vierfachbestimmungen in die Platte gegeben und 1 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Inokulum entfernt und durch 200 µl frisches Infektionsmedium ersetzt. Die Platte wurde für weitere 14-16 h im Brutschrank inkubiert.

Im Anschluss erfolgte die Fixierung mit 100 µl 2% PFA pro well für 30 min bei 4°C. Nach einem Waschschrift mit PBS⁺⁺ wurden 100 µl einer 0,3% Triton X-100-Lösung in PBS⁺⁺ pro well zugegeben und die Platte für 30 min bei RT stehen gelassen. Danach wurde die Platte erneut dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit dem 1. Antikörper für 2 h bei RT inkubiert. Bei dem Antikörper handelte es sich um den Überstand von Hybridomazellen, die Antikörper gegen das Nucleoprotein von Influenza produzieren (ATCC[®] HB-65TM). Dieser Überstand wurde 1:25 in Kulturmedium verdünnt und im Volumen von 100 µl auf die Zellen gegeben.

Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen erneut viermal mit PBS gewaschen. Es folgte die Zugabe des zweiten Antikörpers mit 75 µl pro well (goat anti-mouse HRP, 1:2000 in Kulturmedium) und eine Inkubation von 1 h. Anschließend wurden die Zellen viermal mit PBS gewaschen und mit 50 µl/well des Peroxidase-Substrats TrueBlue™ gefärbt. Nach einer kurzen Inkubationszeit wurde das Substrat abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit Leitungswasser (200 µl/well) gewaschen. Zum Schluss wurde die Platte an der Luft gründlich getrocknet, um eine Entfärbung der Zellen zu verhindern. Die gefärbten Zellen pro well wurden am Mikroskop ausgezählt und der Mittelwert der Mehrfachbestimmungen berechnet. Durch Multiplikation des Mittelwerts mit dem Kehrwert der Verdünnungsstufe und dem Faktor 10 ergibt sich der Virustiter in PFU/ml.

3.5.7 Wachstumsanalysen

Um das Replikationsverhalten verschiedener Viren zu vergleichen, wurden Wachstumsanalysen auf MDCK-, CaCo2- und Calu3-Zellen durchgeführt. Dafür wurden die Zellen im 75 cm²-Kulturflaschenformat bis zu einer Konfluenz von etwa 80% kultiviert und anschließend 3x mit PBS⁺⁺ gewaschen. Die verschiedenen Viren wurden in Kulturmedium ohne FCS verdünnt und mit einer MOI von 0,001 in einem Volumen von 10 ml auf die Zellen gegeben. Um zu kontrollieren, dass gleiche Anfangstitere verwendet wurden, wurde ein Teil des Inokulums in weniger verdünnter Form für die spätere Virustitration aufbewahrt. Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei 37°C im Brutschrank wurde das Inokulum entfernt, die Zellen noch zweimal mit PBS⁺⁺ gewaschen und 20 ml Kulturmedium mit 2% FCS zugegeben. Bei den MDCK-Zellen wurde zusätzlich Trypsin-TPCK in einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugegeben, außerdem wurde kein FCS hinzugesetzt, sondern Infektionsmedium mit 0,1% BSA verwendet. Die Zellen wurden für bis zu 8 Tage im Brutschrank bei 37°C und 7,5% CO₂ inkubiert. An verschiedenen Tagen wurden pro Flasche 1 ml Kulturüberstand abgenommen. Die Kulturüberstände wurden zum Schluss mittels Einzelzellinfektionsassay austitriert (3.5.6.2).

3.5.8 Kompetitiver Infektionsassay

Mithilfe des kompetitiven Infektionsassays lässt sich die virale Fitness von verschiedenen Viren vergleichen. Wird eine Zellkultur mit zwei Viren gleichzeitig infiziert, wird das Virus mit der geringeren Replikationseffizienz von dem anderen mit der Zeit „überwachsen“ und bei Sequenzierungsanalysen nur noch in geringerem Maße nachweisbar sein. Das Verhältnis von Viren mit gleicher Replikationseffizienz sollte dagegen über die Zeit gleichbleiben.

Kompetitive Infektionsassays wurden in dieser Arbeit auf Calu3- sowie CaCo2-Zellen im 75cm²-Kulturflaschenformat durchgeführt. Die etwa 80% konfluenten Zellen wurden zunächst gezählt und die Zellen in den restlichen Kulturflaschen nach dreimaligem Waschen mit PBS⁺⁺ mit 0,001 MOI infiziert. Dabei wurden die zu analysierenden Viren sowohl einzeln auf die Zellen gegeben, als auch in Doppelinfektion mit dem Wildtyp-Virus und je einer Virusmutante. Dafür wurde von beiden Viren zunächst die gleiche Anzahl an PFU in 600 µl Medium gemischt, sodass die Gesamt-PFU-Menge, ausgehend von der Zellzahl der zu infizierenden Zellen, einer MOI=10 entsprach. Ein Teil dieser Lösung wurde für die spätere Analyse des Zeitpunkts 0 verwendet. Anschließend wurde das Gemisch 1:10.000 verdünnt und 600 µl davon auf die Zellen mit 10 ml Kulturmedium ohne FCS gegeben (MOI=0,001). Inkubation und Mediumwechsel erfolgten wie in Abschnitt 3.5.7 beschrieben. An verschiedenen Zeitpunkten wurde je 1 ml Kulturüberstand geerntet und bei -80°C gelagert. Zum Schluss wurde die genotypische Zusammensetzung aller Proben durch Sequenzierung untersucht (s. Abschnitt 3.5.3). Dabei wurden nur die relevanten mutierten Stellen in den Gensegmenten HA, NA und NS analysiert. Für die Quantifizierung der Basenkomposition an einer bestimmten Stelle im Sequenzierungschromatogramm wurde das Web Tool ChromatQuantitor verwendet.

3.6 Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie, auch FACS-(fluorescence activated cell sorting)-Analyse genannt, können Zellen anhand ihrer Größe und Granularität unterschieden werden. Die Zellen werden dabei einzeln an einem Laserstrahl vorbei geleitet, wobei die gestreute und reflektierte Strahlung erfasst wird. Diese lässt Aussagen über die Zellmorphologie zu: das Vorwärtsstreulicht (Forwardscatter, FSC) ist ein Maß für die Zellgröße, während sich aus dem Seitwärtsstreulicht (Sidescatter, SSC) die Granularität ableiten lässt. Zudem können Zellen mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt werden, deren emittiertes Licht ebenfalls erfasst wird und die Berechnung des Anteils der gefärbten Zellen an der Gesamtpopulation erlaubt.

Eine solche Oberflächenfärbung wurde wie folgt durchgeführt:

- 1-5 x 10⁵ Zellen wurden in ein FACS-Röhrchen überführt und mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen
- Zentrifugation bei 300x g, 7 min, 4°C
- Aufnahme des Pellets in 30 µl Fc-Block (112 µg/ml Fc-Block in FACS-Puffer)
- Inkubation für 7 min bei 4°C
- Zugabe von 30 µl Antikörper-Mix (in FACS-Puffer verdünnt)
- Inkubation für 45 min bei 4°C im Dunkeln

- Die Zellen wurden 2x mit FACS-Puffer gewaschen und in 150-200µl FACS-Puffer aufgenommen

Die Messung erfolgte mit dem „FACS Calibur“ Durchflusszytometer und der Software „CellQuest“ (BD). Die Daten wurden anschließend mit dem Programm „FlowJo 8.1.1“ analysiert.

4 Ergebnisse

4.1 Identifikation von m⁶A in Influenza mRNA durch MeRIP-Sequenzierung (1)

Der Einfluss von m⁶A auf die virale Pathogenität von Influenzaviren sollte in dieser Arbeit anhand des Influenzastamm A/Puerto Rico/8/1934 H1N1 (PR8) untersucht werden. Da frühere Studien darauf hindeuten, dass insbesondere die mRNA von Influenzaviren m⁶A aufweist (Narayan *et al.* 1987), wurde in dieser Arbeit die Rolle von m⁶A ausschließlich im Kontext der viralen mRNA untersucht. Um die Funktion spezifischer m⁶A-Modifikationen in der viralen mRNA genauer zu bestimmen, sollte die mRNA dieses Virusstamms zunächst auf das Vorhandensein von m⁶A überprüft und die genauen Positionen der Methylierungen bestimmt werden. Dafür wurde eine im Jahr 2012 publizierte Methode angewendet, durch welche methylierte Fragmente zellulärer RNA mithilfe eines m⁶A-spezifischen Antikörpers in einer Immunpräzipitation angereichert werden und anschließend durch *next generation sequencing* (NGS) sequenziert werden (abgekürzt: MeRIP-Seq) (Dominissini *et al.* 2012; Meyer *et al.* 2012). Der Vergleich mit nicht-immunpräzipitierten Fragmenten (Input-Kontrolle) sollte dabei eine Anreicherung des m⁶A-Sequenzmotivs in der immunpräzipitierten Probe ergeben und so die Bestimmung der m⁶A-Positionen im Transkriptom ermöglichen. Diese Methode sollte für die Lokalisation von m⁶A in der Influenza mRNA angepasst werden. Dafür wurden CaCo2-Zellen mit 3 MOI des in embryonierten Hühnereiern gezüchteten Virus (s. Abschnitt 3.5.1.1) infiziert und für 6 h inkubiert. Es folgte die Extraktion der gesamt-RNA aus den Zelllysaten. Anschließend wurde die mRNA durch Oligo-(dT)-Beads angereichert und durch Zugabe einer ZnCl₂-Lösung fragmentiert. Dabei sollten Stücke von etwa 100 bp entstehen. Die Anreicherung der mRNA und die Fragmentierung wurden mithilfe eines Agarosegels kontrolliert. Abbildung 4.1 zeigt exemplarisch die Auftrennung zweier verschiedener mRNA-Präparationen, einmal vor und nach der Fragmentierung mit ZnCl₂. Bei der ersten, nicht-fragmentierten mRNA ist eine leichte Reduktion der ribosomalen Banden im Vergleich zur gesamt-RNA und eine leichte Zunahme der diffusen Färbung im Bereich der 18S rRNA zu erkennen, was auf mRNA hindeutet. Noch deutlicher ist die Zunahme des mRNA-Anteils bei der zweiten, nicht-fragmentierten mRNA zu erkennen, wobei auch hier noch rRNA-Banden zu sehen sind. Die Banden der beiden mit ZnCl₂ fragmentierten mRNA-Präparationen liegen, wie erwartet, zwischen 50 und 200 nt.

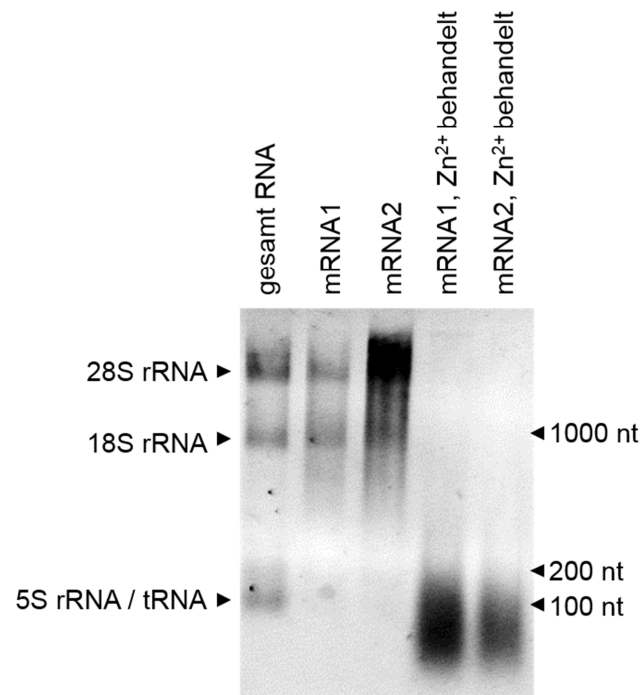


Abbildung 4.1: Kontrolle der mRNA-Anreicherung und Fragmentierung der mRNA für MeRIP-Seq. Gesamt-RNA aus CaCo2-infizierten Zellen, zwei verschiedene Präparationen angereicherter mRNA und zwei verschiedene fragmentierte mRNA-Präparationen wurde in einem 1,5%igen MOPS-Agarosegel aufgetrennt. Die mRNA-Anreicherungen erfolgten mit Oligo-(dT)-Beads, die Fragmentierungen mit 20 mM ZnCl₂.

In der nachfolgenden Immunpräzipitation (IP) mithilfe des m⁶A-spezifischen Antikörpers wurden die m⁶A-haltigen Fragmente angereichert (s. 3.2.2.4). Ein Teil der Probe wurde nicht immunpräzipitiert, sondern diente als Input-Kontrolle für die nachfolgende Sequenzierung. Um die Spezifität des Antikörpers für m⁶A zu kontrollieren, wurde ein RNA-basiertes ELISA-System verwendet. Dafür wurden unterschiedliche Mengen *in vitro*-transkribierter RNA (IVT-RNA) an eine ELISA-Platte gebunden und, wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben, durch den m⁶A-Antikörper detektiert. Die IVT-RNA wurde einmal in nicht-modifizierter Form und einmal in modifizierter Form durch den Ersatz von Adenosintriphosphat durch N6-Methyladenosintriphosphat hergestellt. Als Vorlage wurde dabei ein 250 bp-großer Teil der humanen ITS2-Sequenz der ribosomalen RNA verwendet, welcher im pGEM®-T-Easy-Vektor vorlag und von Dr. Stephanie Jung zur Verfügung gestellt wurde. Die Nukleotidzusammensetzung der IVT-RNAs wurde durch HPLC-Analyse kontrolliert. Diese bestätigte, dass die nicht-modifizierte IVT-RNA kein m⁶A enthielt, während bei der IVT mit m⁶A nur die methylierte Form nachgewiesen werden konnte (s. Abbildung 4.2 C). In dem ELISA-Nachweissystem wurde aufgrund von unspezifischer Bindung in geringem Maße auch die IVT-RNA ohne m⁶A detektiert, jedoch induzierte die RNA mit m⁶A ein stärkeres Signal (s. Abbildung 4.2 A). Damit ist nachgewiesen, dass der Antikörper m⁶A-haltige RNA deutlich besser bindet als nicht-modifizierte RNA. Um die Anreicherung durch den Antikörper während der IP zu kontrollieren, wurde dieser Versuch ebenso mit der zellulären RNA aus den infizierten CaCo2-Zellen vor und nach der IP durchgeführt (s. Abbildung 4.2 B). Bei gleichen Mengen eingesetzter RNA induzierte die Probe nach der Immunpräzipitation in diesem

Versuch ein deutlich höheres Signal als die RNA vor der Immunpräzipitation. Dies zeigt, dass während der Immunpräzipitation die vom Antikörper erkannten Strukturen angereichert wurden.

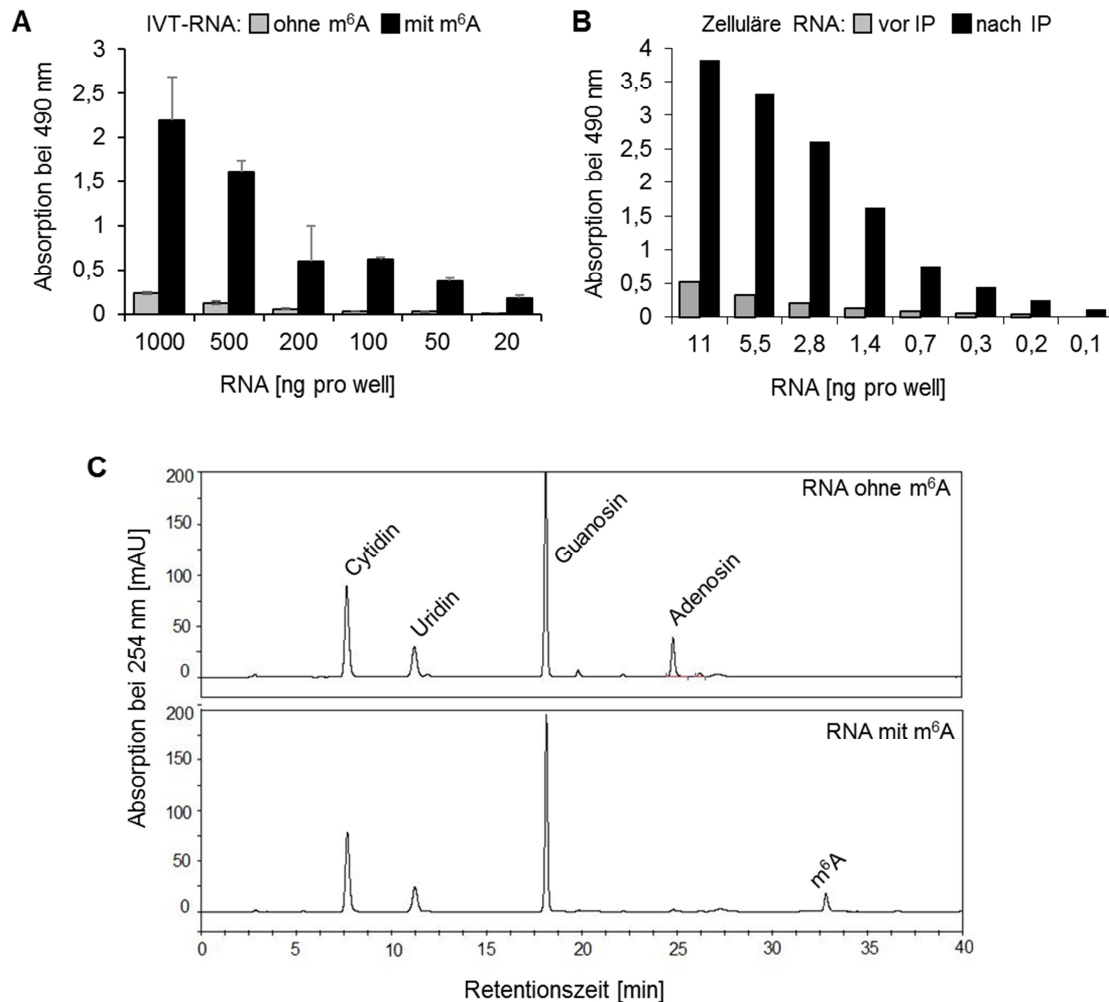


Abbildung 4.2: Kontrolle der Spezifität des anti-m⁶A-Antikörpers. (A) ITS2-IVT-RNA in unmodifizierter Form oder modifiziert mit m⁶A oder (B) fragmentierte Gesamt-RNA aus Influenza-infizierten Zellen vor und nach IP wurde an eine ELISA-Platte gebunden und die Bindung durch den anti-m⁶A-Antikörpers in einem ELISA-System durch photometrische Messung bestimmt. Repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. (C) HPLC-Analyse der ITS2-IVT-RNA nach Nuklease-P1-Verdau und Dephosphorylierung. Gezeigt ist die gemessene Absorption bei 254 nm in Abhängigkeit von der Retentionszeit.

Die cDNA-Synthese aus der IP-RNA und der Input-Kontrolle sowie die *library*-Erstellung und das NGS mit bioinformatischer Auswertung wurden von der Firma CeGaT (Tübingen) durchgeführt. Bei der Datenauswertung sollte die Anzahl der Sequenzierungen der Influenza-mRNAs in der IP-Probe auf die der Input-Kontrolle normiert werden um die Anreicherung bestimmter Sequenzbereiche im Vergleich zur Input-Kontrolle darzustellen. Bei der Auswertung zeigte sich jedoch, dass die Sequenzen der Influenza-mRNAs durch die erhaltenen *reads*, insbesondere bei der IP-Probe, nur sehr ungleichmäßig abgedeckt wurden (Daten nicht gezeigt). Dadurch

konnte kein verlässlicher Abgleich der Sequenzanreicherungen zwischen IP-Probe und Input-Kontrolle erfolgen. Als Kontrolle wurden außerdem die *reads* verschiedener zellulärer mRNAs auf Sequenzanreicherungen überprüft, um bereits publizierte Methylierungsstellen zu verifizieren. Es zeigten sich jedoch keine Übereinstimmungen mit bereits publizierten Methylierungsstellen, was auf ein methodisches oder technisches Problem bei der Erstellung der Proben oder bei der Sequenzierung hindeutet. Informationen zu der Lokalisation von m⁶A in der mRNA von Influenzaviren konnten daher aus diesen Ergebnissen nicht abgeleitet werden.

4.2 Sequenzanalyse zur Häufigkeit des GGACT-Motivs in der A/PR/8-mRNA und zur Konservierung des Motivs in verschiedenen Influenzastämmen

Um trotz der fehlenden m⁶A-Positionsbestimmung erste Aussagen über den Einfluss von m⁶A auf virale Prozesse treffen zu können, sollten rekombinante Influenzaviren hergestellt werden, deren mRNAs in der Wirtszelle nicht mehr durch m⁶A modifiziert werden können. Dafür sollten Mutationen in die viralen genomischen RNAs der Influenzasegmente HA, NA und NS eingefügt werden, um die potentielle Methylierung zu verhindern. Dabei musste berücksichtigt werden, dass die virale genomische RNA eine Negativorientierung aufweist, die mRNA hingegen erst in der Zelle bei der Transkription durch die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase entsteht und somit revers-komplementär zur Sequenz der viralen genomischen RNA ist. Die im Folgenden beschriebenen Mutationen beziehen sich auf die positivsträngige virale RNA, also die mRNA bzw. komplementäre RNA (cRNA). Verschiedene Publikationen konnten zeigen, dass die Methylierung innerhalb eines Konsensusmotivs auftritt, welches als [G/A/U][G>A]m⁶AC[U>A>C] identifiziert wurde. Da die Sequenzabfolge GGACU das am häufigsten durch m⁶A modifizierte Motiv darstellt, sollte dieses in der Influenza-mRNA so verändert werden, dass die Kriterien für die Konsensussequenz nicht mehr erfüllt sind, gleichzeitig jedoch kein Aminosäureaustausch erfolgte. Da in RNA-Datenbanken nur die entsprechenden DNA-Sequenzen angegeben sind, wird das Motiv im Folgenden als „GGACT“ bezeichnet.

Für die Herstellung der rekombinanten PR8-Viren wurde das 8-Plasmid-System nach Hoffmann *et al.* verwendet (s. auch Abbildung 3.3). Die Gensegmente des Wildtyp-PR8-Virus lagen bereits in dem Expressionsplasmid pHW2000 vor und wurden freundlicherweise von Dr. Mikhail Matrosovich zur Verfügung gestellt. Um die genauen Sequenzen aller Gensegmente zu ermitteln, wurden diese zunächst mit den pHW50-Primern sequenziert und alle GGACT-Motive in der PR8-mRNA identifiziert. Abbildung 4.3 zeigt alle GGACT-Motive sowie deren Position in den cRNAs der 8 Gensegmente.

Die HA-mRNA weist mit vier GGACT-Motiven die höchste Anzahl an potentiellen Methylierungsstellen auf, während die NA-mRNA drei und die NS-mRNA zwei dieser Motive enthält.

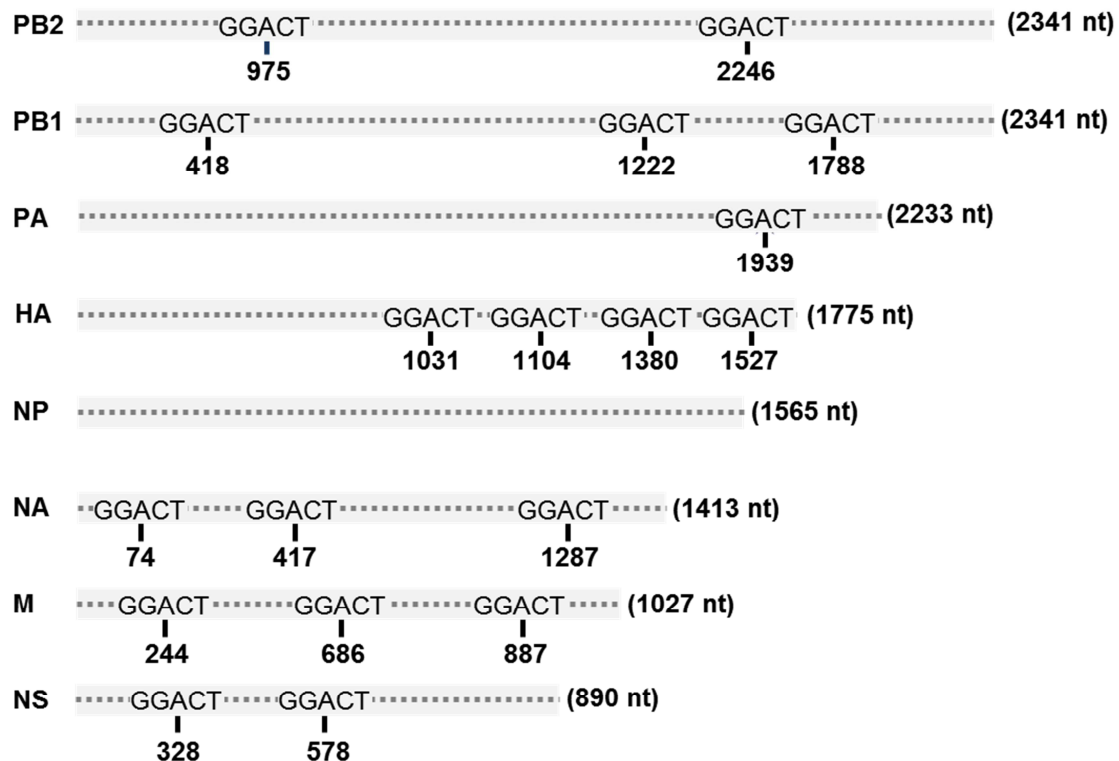


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der GGACT-Motive in der cRNA des Influenzastamms PR8. Die Nummern unter den GGACT-Motiven bezeichnen die Position des potentiell methylierten Adenosins, ausgehend vom Beginn der cRNA. Die Länge der Segmente ist in Klammern angegeben. Für die Analysen wurden die PR8-Sequenzen aus den pHW2000-Plasmiden verwendet.

Um zu untersuchen, ob die m^6A -Konsensusmotive an diesen Stellen der viralen mRNA in verschiedenen Influenzastämmen konserviert vorliegen, wurden die volle-Länge-Sequenzen der Protein-codierenden Regionen von NS, HA und NA der humanpathogenen H1N1-Viren aus der Influenzavirus-Datenbank des NCBI extrahiert und ein Alignment mithilfe des Programms BioEdit erstellt. Identische Sequenzen wurden dabei auf eine einzige reduziert. Einzelne Sequenzen, mit denen kein Alignment möglich war, wurden entfernt. In der anschließenden Analyse konnten 10800 HA-Segmente, 7518 NA-Segmente und 2896 NS-Segmente verglichen werden. Die Sequenzen von HA, NA und NS wurden an den potentiellen Methylierungsstellen (s. Abbildung 4.3) analysiert, wobei nur die an der jeweiligen Position eindeutigen Sequenzen berücksichtigt wurden. Zunächst wurde ermittelt, welches Sequenzmotiv an dieser Stelle bei wie vielen Influenzastämmen auftrat. Anschließend wurde geprüft, inwieweit das Sequenzmotiv dem Konsensusmotiv für m^6A entsprach. So wurde berechnet, wie viele Influenzastämme an der jeweiligen Stelle ein Konsensusmotiv für m^6A aufwiesen (s. Tabelle 2). Für ein Sequenzmotiv von 5 Basen ergeben sich 1024

(4⁵) Kombinationsmöglichkeiten. Das Konsensmotiv [G/A/T][G>A]m⁶AC[T>A>C] beinhaltet 18 mögliche Kombinationen, in den untersuchten Influenza-RNAs wurden jedoch nur acht dieser Kombinationen gefunden. An der Position 4 der HA-RNA wurden beispielsweise in den verschiedenen H1N1-Viren 14 unterschiedliche Sequenzmotive beobachtet. Nur sechs von diesen Motiven wurden als m⁶A-Konsensusmotiv identifiziert, die verbliebenen acht erfüllten die Kriterien des m⁶A-Motivs nicht. 99,8 % der Sequenzen wiesen jedoch an dieser Stelle eines der sechs m⁶A-Konsensusmotive auf. Insgesamt konnten in mehr als 98 % der Influenzastämme an den untersuchten Stellen im HA- und im NS-Segment ein m⁶A-Motiv beobachtet werden, ebenso an den Positionen 2 und 3 der NA-RNA. Lediglich an der Position 1 der NA-RNA konnte eine deutliche Unterrepräsentation des m⁶A-Motivs beobachtet werden: nur 0,1 % der Influenzastämme wiesen an dieser Stelle, wie das PR8-Virus, das m⁶A-Konsensusmotiv auf.

		HA-Gensegment				NA-Gensegment			NS-Gensegment	
		Position 1 1029-1033	Position 2 1102-1106	Position 3 1378-1382	Position 4 1525-1529	Position 1 72-76	Position 2 415-419	Position 3 1285-1289	Position 1 326-330	Position 2 576-580
m ⁶ A- Konsensusmotive	GGACT	1587	1614	1594	9105	8	7	7470	665	2830
	GGACC	32	-	-	34	-	1206	-	-	-
	GGACA	9163	9179	-	-	-	-	-	-	-
	GAACT	-	-	9103	1565	-	5	-	2	3
	GAACC	-	-	34	35	-	6280	20	2140	-
	AGACT	-	-	-	37	-	-	-	-	-
	AAACT	-	-	-	4	-	-	-	19	-
	AAACC	-	-	-	-	-	7	-	-	-
Nicht- Konsensusmotive	AGAAT	-	-	-	-	-	-	-	5	-
	AGACA	-	-	-	-	-	-	-	1	-
	AGATT	-	-	-	-	-	-	-	6	-
	AGGCT	-	-	-	-	-	-	-	1	-
	ATACT	-	-	-	-	-	-	-	1	-
	GAAAT	-	-	15	-	1	-	-	-	-
	GAACA	-	-	2	-	-	8	-	-	-
	GAACG	-	-	11	-	-	-	-	-	-
	GAATC	-	-	-	-	-	2	-	-	-
	GCACT	-	-	-	2	-	-	-	8	-
	GGAAA	2	-	-	-	-	-	1	-	-
	GGAAC	-	-	-	-	20	-	-	-	-
	GGAAT	-	1	-	2	7288	-	-	4	4
	GGACG	3	-	9	2	-	-	-	-	-
	GGAGT	-	-	-	1	15	-	-	-	-
	GGATA	6	-	-	-	-	-	-	-	-
	GGATT	-	2	-	5	8	-	1	9	13
	GGGAC	-	-	-	-	3	-	-	-	-
	GGGAT	-	1	-	-	149	-	-	-	-
	GGGCA	4	-	-	-	-	-	-	-	-
	GGGCC	-	-	-	-	-	2	-	7	-
	GGGCT	2	1	-	2	-	-	21	-	15
	GGTAT	-	-	-	-	25	-	-	-	-
	GGTCT	1	-	-	-	-	-	2	-	-
GTA CT	-	-	-	2	-	-	-	-	-	
TGACT	-	-	-	-	-	-	-	1	-	
GCACA	-	-	-	4	-	-	-	-	-	
Gesamtzahl	10800	10798	10768	10800	7517	7517	7515	2869	2865	
Summe m ⁶ A-Motive	10782	10793	10731	10780	8	7505	7490	2826	2833	
Summe Nicht-m ⁶ A-Motive	18	5	37	20	7509	12	25	43	32	
Prozent m ⁶ A-Motive	99,8%	100,0%	99,7%	99,8%	0,1%	99,8%	99,7%	98,5%	98,9%	

Tabelle 2: Sequenzanalyse zur Konservierung der m⁶A-Motive in den Segmenten HA, NA und NS. Alle codierenden volle-Länge-Sequenzen von humanen H1N1-Viren wurden aus der Influenzadatenbank des NCBI extrahiert, wobei alle identischen Sequenzen auf eine einzige reduziert wurden. Mithilfe des Programms BioEdit wurde ein Alignment der Sequenzen erstellt. Alle beobachteten Motive an den Positionen, an denen die mRNA des PR8-Virus ein GGACT-Motiv aufweist, wurden erfasst und die Anzahl der Stämme, welche das jeweilige Motiv aufweisen, ermittelt. Alle Motive [G/A/T][G/A]AC[T/A/C] wurden als m⁶A-Motiv gewertet (grün), alle Motive auf die diese Kriterien nicht zutrafen, wurden als nicht-methylierte Sequenzmotive eingeordnet (rot). Die Summe der m⁶A-Motive an einer bestimmten Position wurde berechnet und so der Prozentsatz der Influenzasequenzen gebildet, an denen an dieser Position ein m⁶A-Motiv vorliegt.

Bei der Konservierungsanalyse muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Konservierung eines bestimmten Sequenzmotivs auch durch die an dieser Stelle codierte Aminosäure beeinflusst wird. Die in Tabelle 2 aufgelisteten Sequenzmotive codierten zum Teil für unterschiedliche Aminosäuren, was zu einer Fehlinterpretation der Daten hinsichtlich der Konservierung der m⁶A-Motive führen kann. Bestimmte Sequenzmotive könnten nur deshalb häufiger vorkommen als andere, weil sie für eine hochkonservierte Aminosäure codieren und eine veränderte RNA-Sequenz eine Veränderung der Aminosäure und damit eine Funktionsveränderung des Proteins zur

Folge hätte. In der nachfolgenden Analyse wurden deshalb nur diejenigen Sequenzen aus Tabelle 2 berücksichtigt, welche an der jeweiligen Position im Protein die gleichen Aminosäuren wie das PR8-Virus aufwiesen (s. Tabelle 3). Die Aminosäuren an diesen Positionen wurden in Tabelle 3 aufgelistet, ebenso alle Codons, welche für diese Aminosäure codieren. An der ersten Position des HA-Segments waren beispielsweise 24 verschiedene Sequenzmotive möglich, welche für die gleichen Aminosäuren codieren. Von diesen 24 ergaben vier ein m⁶A-Motiv, darunter das GGACT-Motiv, welches in der PR8-RNA vorkommt. Von den 10800 analysierten Influenzasequenzen codierten nur 1590 (14,7%) an dieser Stelle für die gleichen Aminosäuren wie das PR8-Virus. In 99,8% dieser Sequenzen befand sich an dieser Stelle ein m⁶A-Motiv. Diese Analyse zeigte, dass zwar nur ein geringer Teil der analysierten Influenzaviren an dieser Stelle die gleiche Aminosäuresequenz wie das PR8-Virus aufwies, dass jedoch bei 99,8% dieser Viren an dieser Stelle ein m⁶A-Motiv vorkam. An der Position 1 der NA-mRNA codierten sogar nur 16 Influenzaviren für die gleiche Aminosäuresequenz wie das PR8-Virus. Von diesen 16 wiesen 8 an dieser Position ein m⁶A-Motiv auf. Der prozentuale Anteil dieser 8 Sequenzen von allen 7518 analysierten Sequenzen legte eine Unterrepräsentation des m⁶A-Motivs an dieser Stelle nahe (s. Tabelle 2). Allerdings zeigte diese Analyse, dass das m⁶A-Motiv unter allen Sequenzen, die an dieser Stelle für die gleichen Aminosäuren codieren, mit 50% noch deutlich häufiger auftrat, als es dem Zufall nach zu erwarten gewesen wäre (4 m⁶A Motive von 24 Möglichkeiten insgesamt). An allen anderen untersuchten Positionen der NS-, NA- und HA-Segmente befand sich in 99,4% bis 100% der analysierten Sequenzen (mit gleicher Aminosäuresequenz an der entsprechenden Position im Protein) ein m⁶A-Motiv. Da sich die Proteinsequenz in den meisten Viren an diesen Positionen nicht von der des PR8-Virus unterschied, ähnelten die Ergebnisse denen aus der in Tabelle 2 gezeigten Analyse.

Die Sequenzvergleiche der verschiedenen Viren machen deutlich, dass an allen untersuchten Positionen der NS-, NA- und HA-mRNA überdurchschnittlich oft m⁶A-Motive auftreten. Dies legt nahe, dass diese Sequenzmotive einen evolutionären Vorteil für die Viren darstellen und es sich hierbei um potentielle Methylierungsstellen für m⁶A handelt.

	HA-Gensegment							
	Position 1 1029-1033		Position 2 1102-1106		Position 3 1377-1381		Position 4 1525-1529	
mRNA-Sequenz von A/PR/8	GGA	CTA	TGG	ACT	AGG	ACT	GGG	ACT
weitere mögliche Codons, welche für die gleiche Aminosäure codieren	GGC	CTG		ACC	AGA	ACC	GGC	ACC
	GGT	CTC		ACA	CGG	ACA	GGT	ACA
	GGG	CTT		ACG	CGA	ACG	GGA	ACG
		TTA			CGT			
		TTG			CGC			
codierte Aminosäure	Gly	Leu	Trp	Thr	Arg	Thr	Gly	Thr
mögliche Codonkombinationen ohne Veränderung des Proteins	24		4		24		16	
davon m ⁶ A-Motive	4		3		12		6	
Zahl der analysierten Sequenzen	10800		10800		10800		10800	
Sequenzen ohne AS-Austausch im Vgl. zu A/PR/8	1590		10793		10753		10749	
in %	14,7%		99,9%		99,6%		99,5%	
davon Sequenzen mit m ⁶ A-Motiven	1587		10793		10731		10739	
in %	99,8%		100%		99,8%		99,9%	

	NA-Gensegment						NS-Gensegment				
	Position 1 72-76		Position 2 415-419		Position 3 1285-1289		Position 1 326-330			Position 2 576-580	
mRNA-Sequenz von A/PR/8	GGA	CTA	GGG	ACT	TGG	ACT	AGG	GAC	TGG	GGA	CTA
weitere mögliche Codons, welche für die gleiche Aminosäure codieren	GGC	CTG	GGC	ACC		ACC	AGA	GAT		GGC	CTG
	GGT	CTC	GGT	ACA		ACA	CGG			GGT	CTC
	GGG	CTT	GGA	ACG		ACG	CGA			GGG	CTT
		TTA					CGT				TTA
		TTG					CGC				TTG
codierte Aminosäure	Gly	Leu	Gly	Thr	Trp	Thr	Arg	Asp	Trp	Gly	Leu
mögliche Codonkombinationen ohne Veränderung des Proteins	24		16		4		12			24	
davon m ⁶ A-Motive	4		6		3		5			4	
Zahl der analysierten Sequenzen	7518		7518		7518		2869			2869	
Sequenzen ohne AS-Austausch im Vgl. zu A/PR/8	16		7506		7470		2821			2845	
in %	0,2%		99,8%		99,4%		98,3%			99,2%	
davon Sequenzen mit m ⁶ A-Motiven	8		7498		7470		2805			2830	
in %	50,0%		99,9%		100,0%		99,4%			99,5%	

Tabelle 3: Sequenzanalyse zur Konservierung der m⁶A-Motive in den Segmenten HA, NA und NS bei gleicher Aminosäuresequenz im Vergleich zum PR8-Virus. Dargestellt sind die Codons der PR8-mRNA an den Stellen der GGACT-Motive und die jeweils codierte Aminosäure an dieser Position. Alle weiteren Codons, welche für die gleiche Aminosäure codieren, wurden ebenfalls aufgelistet. Daraus ergibt sich die Anzahl an möglichen Codonkombinationen bzw. Sequenzmotiven, die nicht zu einer Veränderung des Proteins führen (im Vergleich zu PR8). Alle Codons, welche ein m⁶A-Konsensusmotiv bilden können, sind grün markiert, alle anderen rot. Aus den Kombinationen der grün markierten Codons ergibt sich die Anzahl der möglichen m⁶A-Motive. Von den in Tabelle 2 analysierten Sequenzen wurden diejenigen ermittelt, welche die gleiche Proteinsequenz wie das PR8-Virus aufwiesen. Unter diesen Viren wurde die Summe der m⁶A-Motive an der jeweiligen Position berechnet und so der Prozentsatz der Influenzasequenzen gebildet, an denen an dieser Position ein m⁶A-Motiv vorliegt.

4.3 Generierung rekombinanter Influenzaviren mit Mutationen im GGACT-Motiv

Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, durch Mutation eine oder mehrere m⁶A-Modifikationen der mRNA zu verhindern, sollten zunächst alle GGACT-Motive in einer mRNA gleichzeitig mutiert werden. Dafür sollten alle Adenosine in den Motiven durch eine andere Base ersetzt werden, ohne die Proteinsequenz zu verändern.

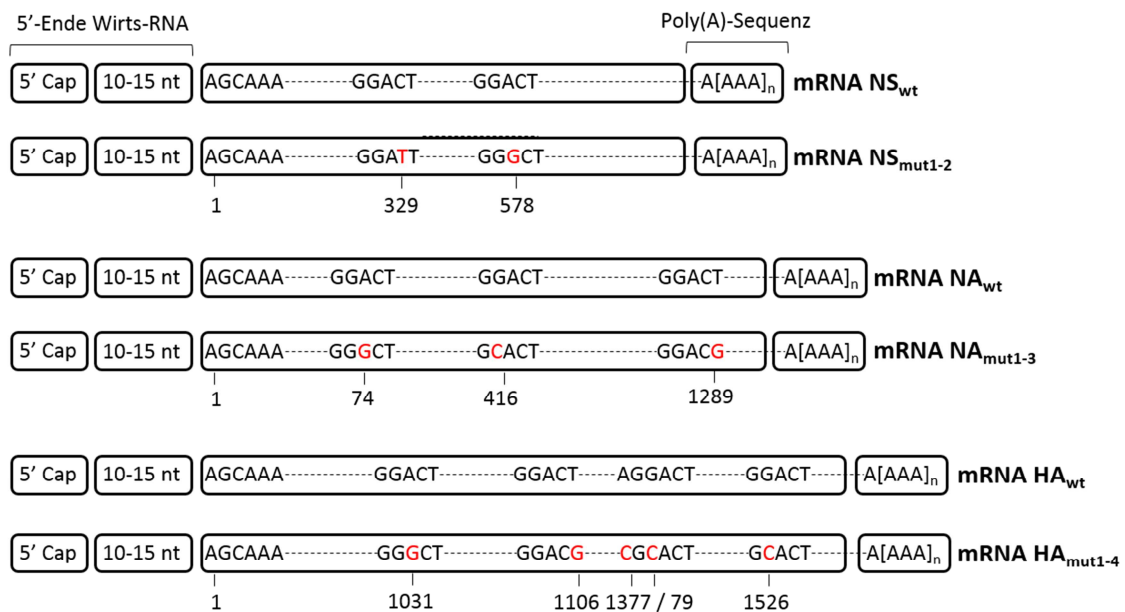


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung der viralen mRNAs von HA, NA und NS mit den eingefügten Mutationen im GGACT-Motiv. Die Mutationen wurden so gewählt, dass die Sequenz nach Möglichkeit nicht mehr mit dem m⁶A-Konsensusmotiv übereinstimmt und gleichzeitig keine Mutation im Protein auftritt, für das die mRNA codiert.

Dies war jedoch nur in drei von neun Fällen möglich. In diesen Fällen lag das Codon GGA vor, wobei das A durch jede beliebige Base ausgetauscht werden konnte, da alle vier Codons für Glycin codieren. Aufgrund einer ähnlichen *codon usage* wurde GGG ausgewählt. An den anderen Stellen musste eine andere Base in einem der beiden Codons ausgetauscht werden. Die Mutation wurde so gewählt, dass keine Übereinstimmung mit dem Konsensusmotiv mehr vorlag und so eine potentielle Methylierung verhindert wird. Auch die *codon usage* wurde bei der Wahl der Mutation berücksichtigt. Lediglich im 2. GGACT-Motiv des NS-Segments war, aufgrund der zwei Spleißvarianten der mRNA, keine stille Mutation möglich. Der Austausch von A zu G an Position 578 führt zwar zu keiner Aminosäureveränderung im NS1-Protein, verändert jedoch im NS2-Protein die Aminosäure Asparaginsäure an Position 27 zu Glycin. Im dritten GGACT-Motiv in der HA-mRNA mussten zwei Mutationen eingefügt werden, um die Aminosäuresequenz des Proteins nicht zu verändern und trotzdem das Konsensusmotiv zu zerstören. In Abbildung 4.4 sind die Mutationen in der NS-, HA und NA-mRNA zusammengefasst. Wie bereits erwähnt, wurde für die Herstellung der

rekombinanten PR8-Viren das 8-Plasmid-System nach Hoffmann *et al.* verwendet (s. auch Abbildung 3.3), wobei die Wildtyp-PR8-Gensegmente bereits im Expressionsplasmid pHW2000 vorlagen und freundlicherweise von Dr. Mikhail Matrosovich zur Verfügung gestellt wurden. Bei der Sequenzierung der acht Gensegmente ergab sich eine Abweichung von den publizierten Sequenzen des PR8-Virus an Position 1065 im NA-Segment, die zu einem Aminosäureaustausch führt. Das G an dieser Stelle der Sequenz wurde durch PCR-basierte Mutagenese, wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben, in ein A zurückmutiert. Das korrigierte Plasmid wurde für alle rekombinanten Viren in dieser Arbeit verwendet. Die Segmente mit den in Abbildung 4.4 gezeigten Mutationen wurden von der Firma Eurofins als DNA synthetisiert und mussten für die Herstellung der rekombinanten Viren in den Expressionsvektor pHW2000 umkloniert werden (s. Abschnitt 3.1.4.2). In diesem Vektor ist die virale cDNA Teil von zwei verschiedenen Transkriptionseinheiten: ein Polymerase-I-Promotor und -Terminator ermöglichen die Transkription der negativsträngigen viralen RNA, während ein Polymerase-II-Promotor und -Terminator die Herstellung der viralen mRNAs induziert. So werden nach Transfektion von HEK-Zellen mit den acht Plasmiden durch die Synthese der viralen RNA für die Viruspartikel und durch die Herstellung der viralen Proteine infektiöse Influenzaviren produziert. So konnten durch die Kombination von Plasmiden mit der Wildtyp(wt)-Gensequenz und Plasmiden mit den oben beschriebenen Mutationen verschiedene rekombinante Viren hergestellt werden (s. Abschnitt 3.5.2). Neben dem wt-Virus aus acht wt-Gensegmenten wurden drei Mutanten durch Kombination der sieben wt-Plasmide mit einem mutierten Plasmid hergestellt: eine HA-Mutante mit 4 mutierten GGACT-Motiven im HA-Gensegment, eine NA-Mutante mit 3 mutierten GGACT-Motiven im NA-Segment und eine NS-Mutante mit 2 mutierten GGACT-Motiven im NS-Segment (s. Abbildung 4.5).

Zusätzlich wurden zwei weitere Virusmutanten erstellt: eine, welche alle drei genannten Gensegmente in mutierter Form enthielt und eine mit mutiertem HA- und NA-Gensegment. Um die eingefügten Mutationen zu überprüfen, wurde die virale RNA der rekombinanten Viren aus dem Überstand isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Gensegmente NS, HA und NA wie in 3.5.3 beschrieben sequenziert.

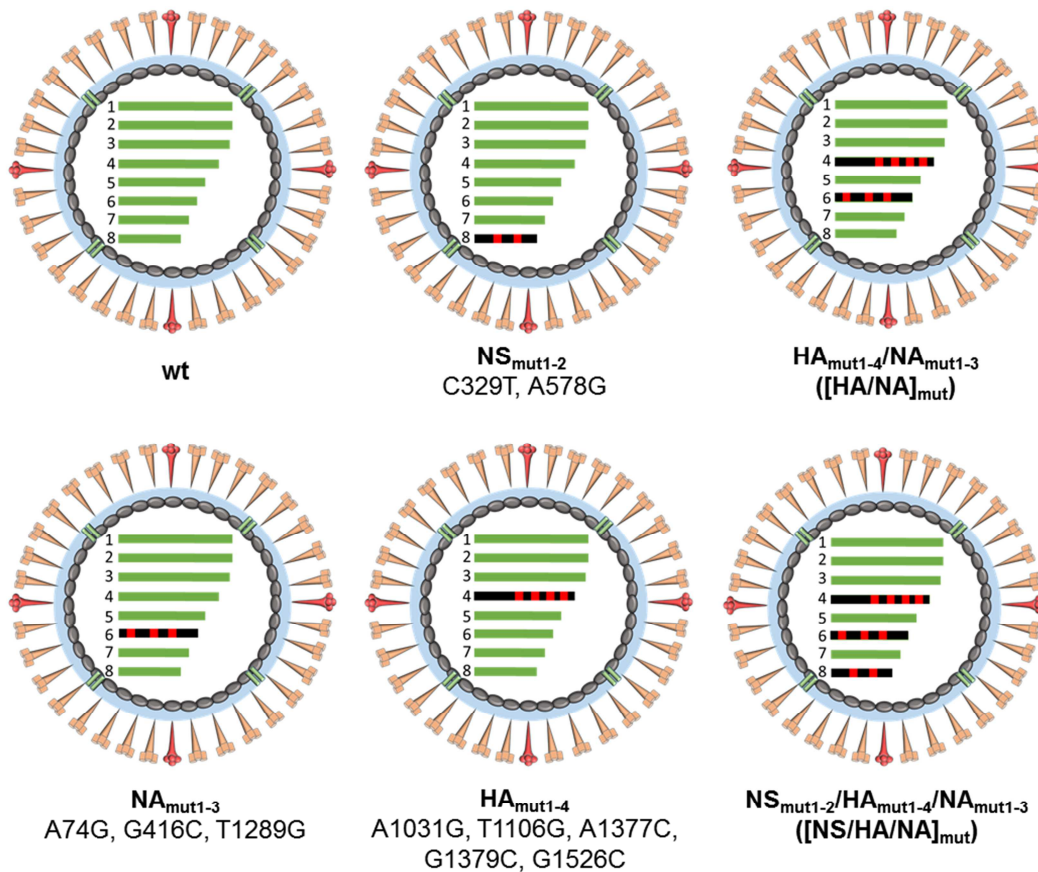


Abbildung 4.5: Schematische Darstellung der Genotypen der rekombinanten PR8-Viren und ihre Bezeichnungen. Alle wt-Gensegmente sind in grün dargestellt, alle veränderten Gensegmente in schwarz. Die roten Punkte stehen für die mutierten GGACT-Motive. Die Bezeichnung des jeweiligen Virus ist fett gedruckt, darunter sind die genauen Mutationen des jeweiligen Segments aufgeführt. Die rekombinanten Viren mit mehreren veränderten Gensegmenten (rechter Kasten) tragen die gleichen Mutationen im jeweiligen Segment.

4.4 Charakterisierung der rekombinanten Viren mit Mutationen im GGACT-Motiv der HA-, NA- und NS-mRNA

4.4.1 Wachstumsverhalten der Viren

Um zu untersuchen, wie sich die Mutationen im GGACT-Motiv auf das Wachstumsverhalten der Viren auswirken, wurden zunächst Wachstumsanalysen mit den rekombinanten Viren auf humanen Zelllinien durchgeführt. Hierfür wurden CaCo2- und Calu3-Zellen verwendet. Die Zellen wurden, wie in Abschnitt 3.5.7 beschrieben, mit einer MOI von 0,001 mit den verschiedenen Viren infiziert und bei 37°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde ein Teil des Überstands abgenommen und der Virustiter mittels Einzelzellinfektionsassay auf MDCK-H-Zellen bestimmt. Parallel wurde mit den Überständen ein Hämagglutinationstest durchgeführt. Um sicherzustellen, dass gleiche Virusmengen für die Infektion verwendet wurden, wurde das Virusinokulum ebenfalls im Einzelzellinfektionsassay mitgeführt.

Für eine übersichtlichere Darstellung der Ergebnisse wurden die Daten für die Wachstumskurven auf zwei Diagramme aufgeteilt. Die Wachstumskurve des wt-Virus und des Virus HA_{mut1-4} ist daher für einen besseren Vergleich in beiden Diagrammen dargestellt. Bei den CaCo2-Zellen konnte bei den Viren NS_{mut1-2} und NA_{mut1-3} kein verändertes Wachstum im Vergleich zum wt-Virus festgestellt werden, wohingegen die Viren mit einem veränderten HA-Segment ein leicht verringertes Wachstum im Vergleich zu den wt-Viren zeigten (s. Abbildung 4.6 A+B). Zwischen dem 1. und dem 4. Tag der Infektion war der Titer des Virus HA_{mut1-4} ca. dreimal niedriger als der des wt-Virus. Ähnlich verhielten sich die Viren [NS/NA/HA]_{mut} und [HA/NA]_{mut}, welche ebenfalls beide das mutierte HA-Segment aufweisen. Im HA-Test (s. Abbildung 4.6 D) zeigten sich dagegen lediglich an Tag 2 unterschiedliche Zahlen an hämagglutinierenden Partikeln: der HAU-Titer von [HA/NA]_{mut} lag eine log₂-Stufe, der von HA_{mut1-4} und [NS/NA/HA]_{mut} 2 log₂-Stufen unter dem des wt-Virus. Am 4. und 7. Tag zeigten alle Viren gleiche HA-Titer, am 1. Tag war kein HA-Titer nachweisbar. Bei den Calu3-Zellen konnten nahezu keine Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen den Viren beobachtet werden (s. Abbildung 4.6 E+F). Auch die HA-Titer von HA_{mut1-4} und [NS/NA/HA]_{mut} wiesen lediglich an Tag 2 einen Unterschied von einer log₂-Stufe im Vergleich zum wt auf (s. Abbildung 4.6 G). Die Titration des Inokulums, welches sowohl für die Infektion der CaCo2-Zellen als auch der Calu3-Zellen verwendet wurde, bestätigte, dass vergleichbare Virusmengen für die Infektion eingesetzt wurden (s. Abbildung 4.6 C).

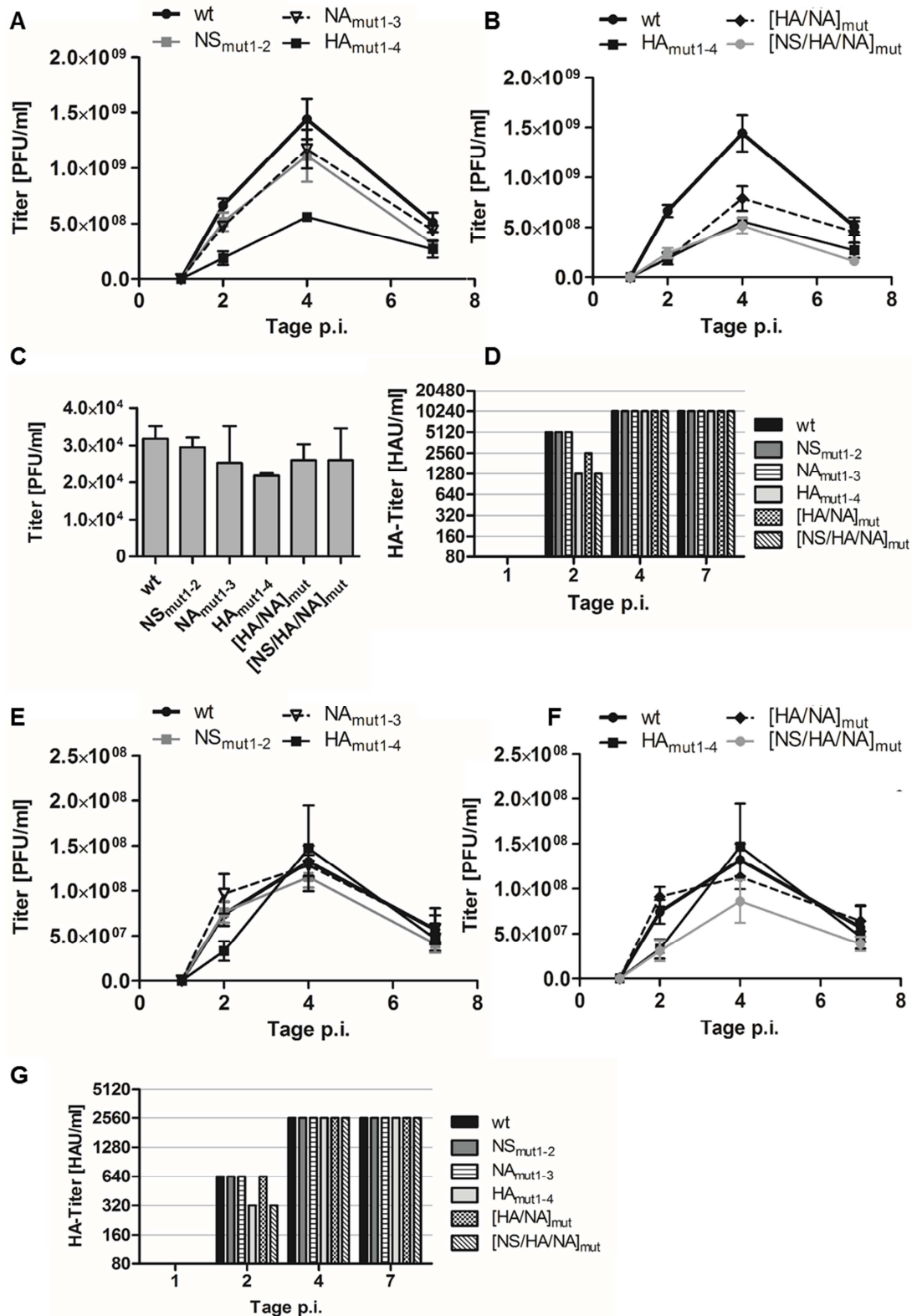


Abbildung 4.6: Wachstumsanalysen mit den rekombinanten Viren NS_{mut1-2}, NA_{mut1-3}, HA_{mut1-4}, [HA/NA]_{mut} und [NS/HA/NA]_{mut}. CaCo2-Zellen (A-D) und Calu3-Zellen (F-H) wurden mit 0,001 MOI der jeweiligen Viren infiziert und bei 37°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde ein Teil des Mediums geerntet und der Virustiter mittels Einzelzellinfektionsassay auf MDCK-H-Zellen bestimmt (A, B, E, F). Parallel wurde auch der HA-Titer des Überstands mittels Hämagglutinationstest bestimmt (D, G). Das Inokulum mit gleichen Virustitern, welches für die Infektion beider Zelllinien verwendet wurde (0h-Wert), wurde ebenfalls bei der Titration mitgeführt und die Ergebnisse separat gezeigt (C). Gezeigt ist je ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Versuchen. Die Bestimmung der Virustiter erfolgte in Vierfachbestimmungen.

4.4.2 Wachstumsverhalten in kompetitiven Infektionsversuchen

Da die rekombinanten Viren hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens nur geringe Unterschiede aufwiesen, sollte anschließend die Replikationsfähigkeit der mutierten Viren unter kompetitiven Bedingungen mit dem wt-Virus getestet werden. Dafür wurden Calu3- und CaCo2-Zellen mit dem wt-Virus und einer Virusmutante im gleichen Verhältnis koinfiziert. Dabei wurden insgesamt 0,001 MOI eingesetzt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde ein Teil des Überstandes abgenommen und die genotypische Zusammensetzung der Virusmischung im Überstand durch Sequenzierung des jeweiligen Gensegments bestimmt (s. 3.5.3). Im NS-Segment wurde dabei die Position 329, im HA-Segment die Position 1377 und im NA-Segment die Position 416 analysiert. Für die Viren mit mehreren mutierten Segmenten wurde ebenfalls das HA- oder NA-Segment sequenziert. Als 0h-Wert diente das Virusinokulum mit beiden Viren, welches für die Infektion der Zellen verwendet wurde. Abbildung 4.7 zeigt den Anteil des jeweiligen Genotyps zu den verschiedenen Zeitpunkten, der durch Quantifizierung der Chromatogrammpeaks an einer der mutierten Genomstellen berechnet wurde. In den CaCo2-Zellen (s. Abbildung 4.7 A) lag der Anteil des wt-Virus in dem Virusgemisch, welches für die Infektion verwendet wurde (Zeitpunkt 0), wie erwartet bei allen Viren zwischen 47,8% und 60%. Dieser Anteil blieb bei Konkurrenz mit den Viren NS_{mut1-2} und NA_{mut1-3} über 7 Tage unverändert. Das wt-Virus wies gegenüber diesen Viren unter diesen Bedingungen keinen Replikationsvorteil auf. Alle Viren, welche ein mutiertes HA-Segment aufwiesen, wurden dagegen vom wt-Virus aus dem Viruspool verdrängt. Bereits einen Tag nach der Infektion stieg der Anteil des wt-Virus auf 67% bei Konkurrenz mit HA_{mut1-4}, auf 70% bei [HA/NA]_{mut} und 78% bei [NS/HA/NA]_{mut}. Nach 7 Tagen lag der Anteil des wt-Virus bei allen drei Viren bei ca. 80% des Viruspools, während das jeweilige mutierte Virus nur noch einen Anteil von 20% ausmachte.

Ähnliche Ergebnisse konnten auch mit den Calu3-Zellen beobachtet werden (s. Abbildung 4.7 B): auch hier blieb der Anteil des wt-Virus bei Konkurrenz mit NS_{mut1-2} und NA_{mut1-3} über 7 Tage konstant. Das wt-Virus zeigte also keinen Replikationsvorteil gegenüber diesen beiden mutierten Viren. In Konkurrenz mit dem Virus HA_{mut1-4} stieg der Anteil des wt-Virus dagegen bereits an Tag 1 auf über 80%. Nach weiteren 6 Tagen machte das Virus HA_{mut1-4} nur noch einen Anteil von etwas mehr als 10% der Virusmischung aus. Bei den Viren [HA/NA]_{mut} und [NS/HA/NA]_{mut} lag der Anteil des wt-Virus zu Beginn der Infektion bei etwa 30% und stieg nach 7 Tagen auf 45% in Konkurrenz mit dem Virus [HA/NA]_{mut} und auf 73% in Konkurrenz mit [NS/HA/NA]_{mut}.

Damit ist die Verdrängung des Virus [HA/NA]_{mut} aus der Mischung mit dem wt-Virus in den Calu3-Zellen weniger stark als in den CaCo2-Zellen.

Alle rekombinanten Viren mit Mutationen des GGACT-Motivs in der HA-mRNA zeigten damit, sowohl in CaCo2- als auch in Calu3-Zellen, eine verringerte Replikationseffizienz im Vergleich zum wt-Virus und wurden aus der Viruspopulation verdrängt.

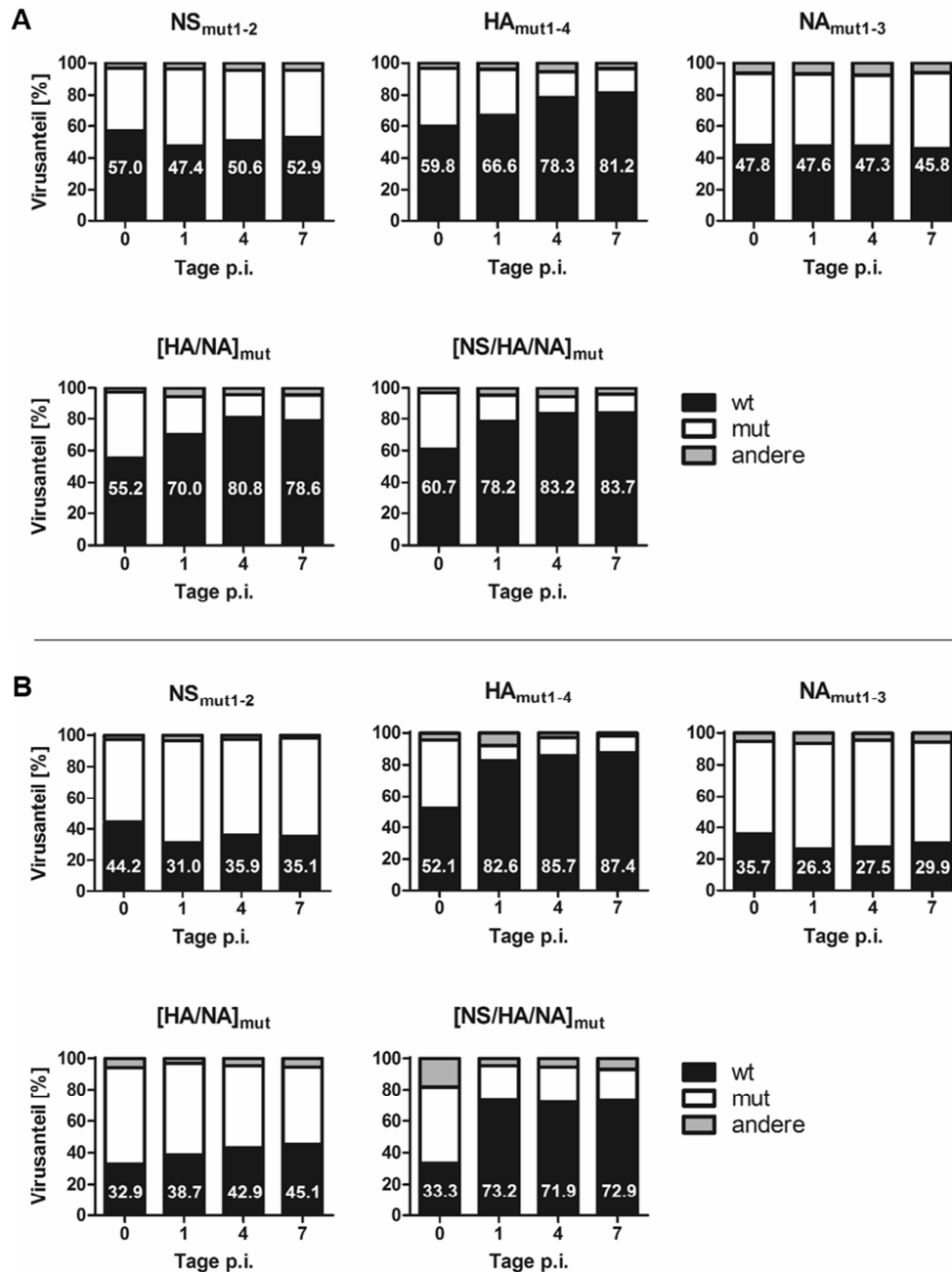


Abbildung 4.7: Wachstumsverhalten der Viren NS_{mut1-2}, NA_{mut1-3}, HA_{mut1-4}, [HA/NA]_{mut} und [NS/HA/NA]_{mut} in kompetitiven Infektionsversuchen mit dem wt-Virus. CaCo2- (A) und Calu3-Zellen (B) wurden mit insgesamt 0,001 MOI einer 1:1-Mischung des wt-Virus und der jeweiligen Virusmutante infiziert. Die genotypische Zusammensetzung zu verschiedenen Zeitpunkten wurde durch Sequenzierung der Virusgenome im Zellüberstand und anschließende Quantifizierung der Chromatogramm-Peaks an einer der mutierten Genomstellen ermittelt. Der Anteil des wt-Virus ist in weißer Schrift innerhalb des Diagramms dargestellt. Gezeigt ist je ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Versuchen.

4.4.3 Virale mRNA-Expression in CaCo2-Zellen

Die Präsenz von m⁶A wurde in mehreren Studien mit einer erhöhten Stabilität der modifizierten mRNA assoziiert (Dominissini *et al.* 2012; Wang *et al.* 2015). Es ist daher denkbar, dass die zuvor beobachtete reduzierte Replikationseffizienz der Viren mit den Mutationen in der HA-mRNA auf eine reduzierte Expression der HA-mRNA zurückzuführen ist. Um dies näher zu untersuchen, wurden CaCo2-Zellen mit den verschiedenen Viren infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten in ExtraZol lysiert. Nach Aufreinigung der RNA erfolgte die cDNA-Synthese mit Oligo-(dT)-Primern und die Analyse der viralen mRNA-Expression mittels qPCR. Dabei wurden spezifische Primer für die HA- und für die M-mRNA eingesetzt und die Expression mithilfe der $\Delta\Delta C(t)$ -Methode quantifiziert. Die HA-mRNA-Expression wurde dabei auf die Expression der viralen M-mRNA normiert und in Relation zur Expression nach Infektion mit dem wt-Virus berechnet (s. Abbildung 4.8).

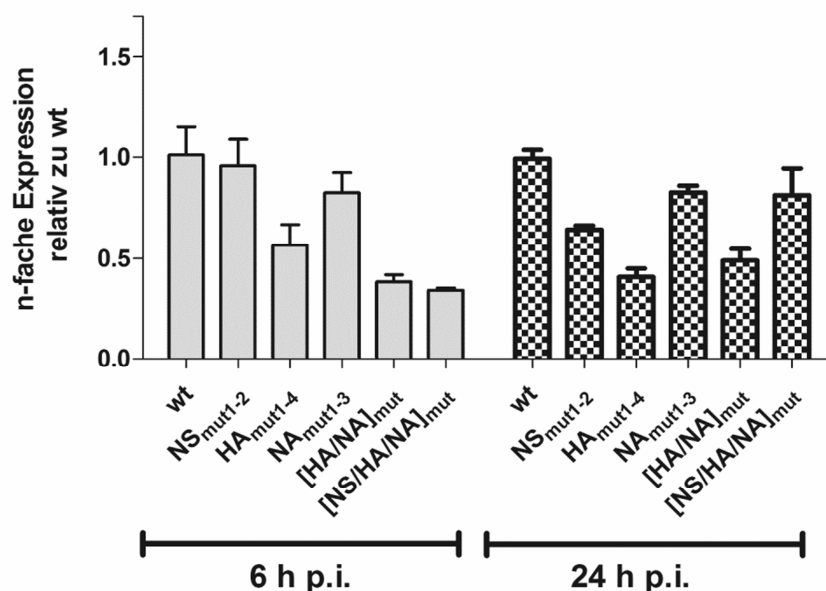


Abbildung 4.8: Quantifizierung der viralen HA-mRNA-Expression während einer Influenzainfektion in CaCo2-Zellen. CaCo2-Zellen wurden mit 2 MOI der rekombinanten PR8-Viren infiziert und für 6h bzw. 24 h inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die RNA der Zellen isoliert und mithilfe von Oligo-(dT)-Primern in cDNA umgeschrieben. Die Analyse erfolgte durch qPCR mit zwei Replikaten und anschließender Quantifizierung mithilfe der $\Delta\Delta C(t)$ -Methode. Dargestellt ist die auf die Expression der M-mRNA normierte n-fache Expression im Vergleich zu Zellen, die mit dem wt-Virus infiziert wurden. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

Sowohl nach 6 h als auch nach 24 h zeigten die Viren mit den Mutationen in der HA-mRNA eine reduzierte normalisierte Expression der HA-mRNA im Vergleich zum wt-Virus. So war die HA-mRNA 6 h nach Infektion mit dem Virus HA_{mut1-4} im Vergleich zum wt-Virus um die Hälfte reduziert, ebenso mit den Viren [HA/NA]_{mut} und

[NS/NA/HA]_{mut}. Dies zeigte sich auch 24 h nach der Infektion, wobei zu diesem Zeitpunkt keine eindeutige Reduktion der HA-mRNA-Expression des Virus [NS/NA/HA]_{mut} mehr festzustellen war. Die Viren NS_{mut1-2} und NA_{mut1-3} zeigten dagegen, wie erwartet, eine mit dem wt-Virus vergleichbare Expression der HA-mRNA. Lediglich nach 24 h war auch die mRNA-Expression des Virus NS_{mut1-2} im Vergleich zum wt leicht reduziert.

Die Mutationen in den GGACT-Motiven der viralen HA-mRNA führten damit zu einer reduzierten Expression der mRNA in den CaCo2-Zellen.

4.4.4 Expression der viralen Proteine in CaCo2-Zellen nach Infektion mit den rekombinanten Viren

Da in anderen Studien bereits gezeigt werden konnte, dass sich m⁶A auf die Translation auswirken kann (Kennedy *et al.* 2016; Wang *et al.* 2015; Zhou *et al.* 2015) und eine Reduktion der mRNA-Expression durch die GGACT-Mutationen beobachtet werden konnte (s. vorheriger Abschnitt), sollte als nächstes die Proteinexpression der Viren durch Western Blot untersucht werden. Dafür wurden CaCo2-Zellen, wie in Abschnitt 3.5.5 beschrieben, mit den Viren infiziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten in RIPA-Puffer lysiert. Da die Viren mit den Mutationen im HA-Gensegment eine reduzierte Replikationseffizienz im Vergleich zum wt-Virus aufwiesen (s. Abbildung 4.7), sollte zunächst die HA-Expression untersucht werden, um zu überprüfen, ob die reduzierte Replikationseffizienz mit einer reduzierten Expression des Proteins einhergeht. Dafür wurden die Zelllysate im denaturierenden SDS-Gel aufgetrennt und das HA-Protein im Western Blot detektiert. Das M-Protein, dessen RNA keine Mutationen aufweist, diente dabei als Kontrolle (Abbildung 4.9 A). Zusätzlich wurde die Proteinexpression anhand der Bandenintensität quantifiziert (s. Abbildung 4.9 B). Die Intensität der HA-Bande wurde dabei auf die der M-Bande normiert und der daraus resultierende Quotient in Relation zu dem des wt-Virus gesetzt. Dabei wurde der Mittelwert aus den Quotienten von zwei verschiedenen Blots mit gleichen Proben gebildet, wobei nur einer der Blots in Abbildung 4.9 gezeigt ist. Um zusätzlich die aus den Zellen freigesetzten Partikel und ihre Infektiosität zu bestimmen, wurde der Überstand der infizierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten im HA-Test und Einzelzellinfektionsassay getestet. Für eine übersichtlichere Darstellung der Ergebnisse wurden die Daten für die Wachstumskurven auf zwei Diagramme aufgeteilt. Die Wachstumskurve des wt-Virus und des Virus HA_{mut1-4} ist zum Vergleich in beiden Diagrammen dargestellt (s. Abbildung 4.10).

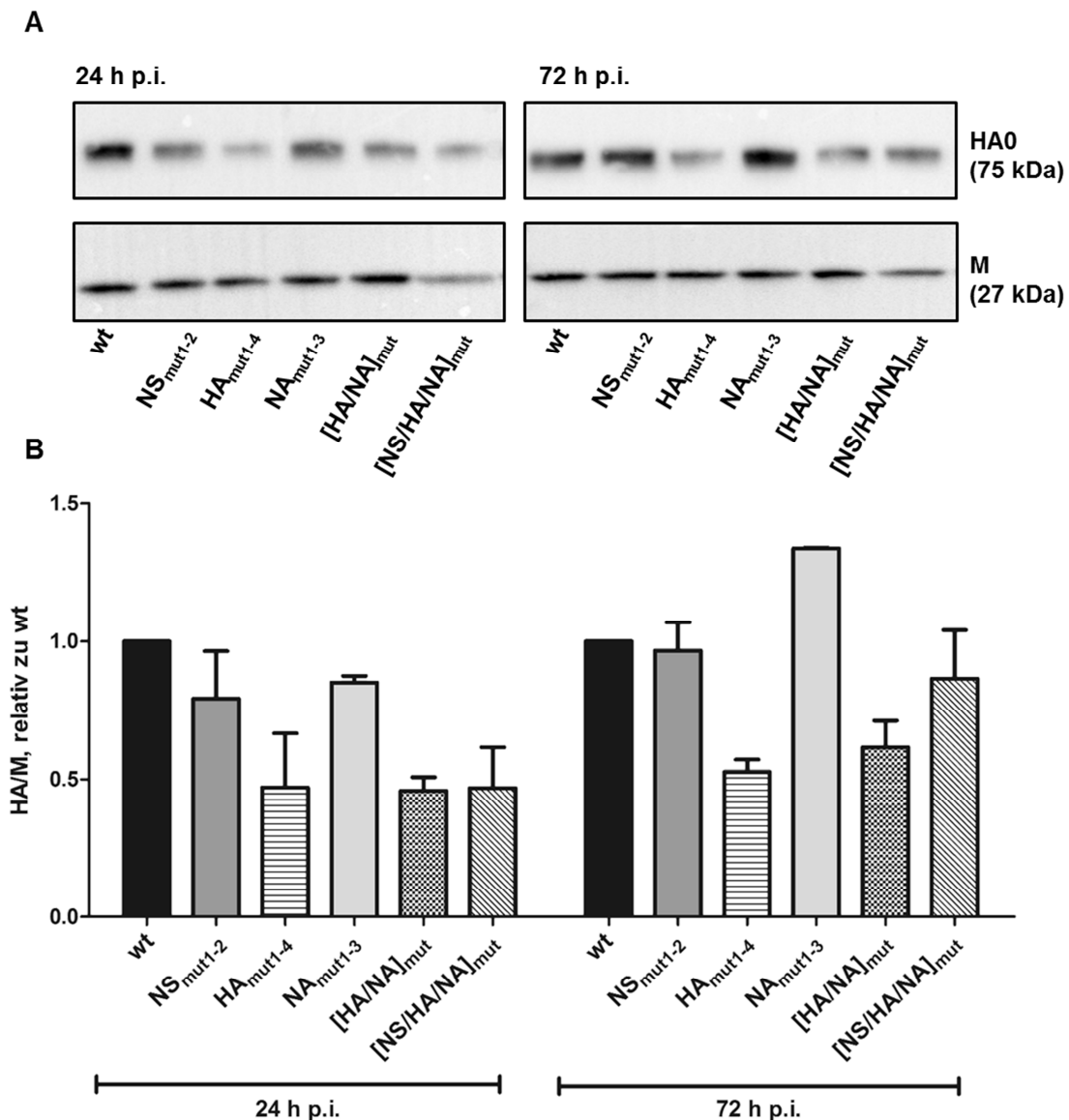


Abbildung 4.9: Expression der viralen Proteine HA und M in CaCo2-Zellen nach Infektion mit den verschiedenen rekombinanten Viren. CaCo2-Zellen wurden mit 2 MOI infiziert und nach 24 und 72 h in RIPA-Puffer lysiert. Von jeder Probe wurden 2 µg Protein (bestimmt durch BCA-Assay) per SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit dem entsprechenden Antikörper detektiert (A). Die Quantifizierung der Bandenintensität erfolgte mit ImageJ. Dargestellt ist das Verhältnis von HA zu M, relativ zu wt als Mittelwert aus zwei Replikaten (B). Dargestellt ist ein repräsentativer Blot aus drei unabhängigen Versuchen.

Sowohl 24 h als auch 72 h nach der Infektion wiesen die Zellen, welche mit den Viren mit mutiertem HA-Gensegment infiziert wurden, eine deutlich geringere Expression des HA-Proteins auf, während die Expression von M während der Infektion keine Unterschiede zwischen den einzelnen Viren zeigte. Zwar ist die Bande des M-Proteins bei dem Virus [NS/NA/HA]_{mut} in Abbildung 4.9 leicht schwächer, dies bestätigte sich in weiteren Versuchen jedoch nicht. Auch die Expression des Nukleoproteins unterschied sich zwischen den Viren nicht (Daten nicht gezeigt). Die HA-Expression, normiert auf die M-Expression, war bei HA_{mut1-4} 24 h und 72 h nach der Infektion nur etwa halb so hoch wie bei der Infektion mit dem wt-Virus. Ähnliche Ergebnisse sind bei der Infektion

mit $[HA/NA]_{mut}$ und $[NS/NA/HA]_{mut}$ zu beobachten: 24 h nach der Infektion ist die HA-Expression im Vergleich zum wt-Virus nur halb so hoch, jedoch ist der Unterschied 72 h nach der Infektion weniger deutlich als bei HA_{mut1-4} . Eine ähnliche Tendenz ist bei der Zahl der infektiösen Viruspartikel im Zellüberstand zu erkennen (s. Abbildung 4.10 A): die Titer der Viren mit mutiertem HA-Gensegment liegen zu allen Zeitpunkten unter denen des wt-Virus. Bei der Gesamtzahl der Viruspartikel im Zellüberstand, die durch den HA-Test ermittelt wurde, sind jedoch keine deutlichen Unterschiede zwischen den Viren zu erkennen (s. Abbildung 4.10 B). Die bereits zuvor beobachtete Reduktion der HA-mRNA-Expression der Viren HA_{mut1-4} , $[HA/NA]_{mut}$ und $[NS/NA/HA]_{mut}$ geht damit mit einer reduzierten Expression des HA-Proteins in CaCo2-Zellen einher.

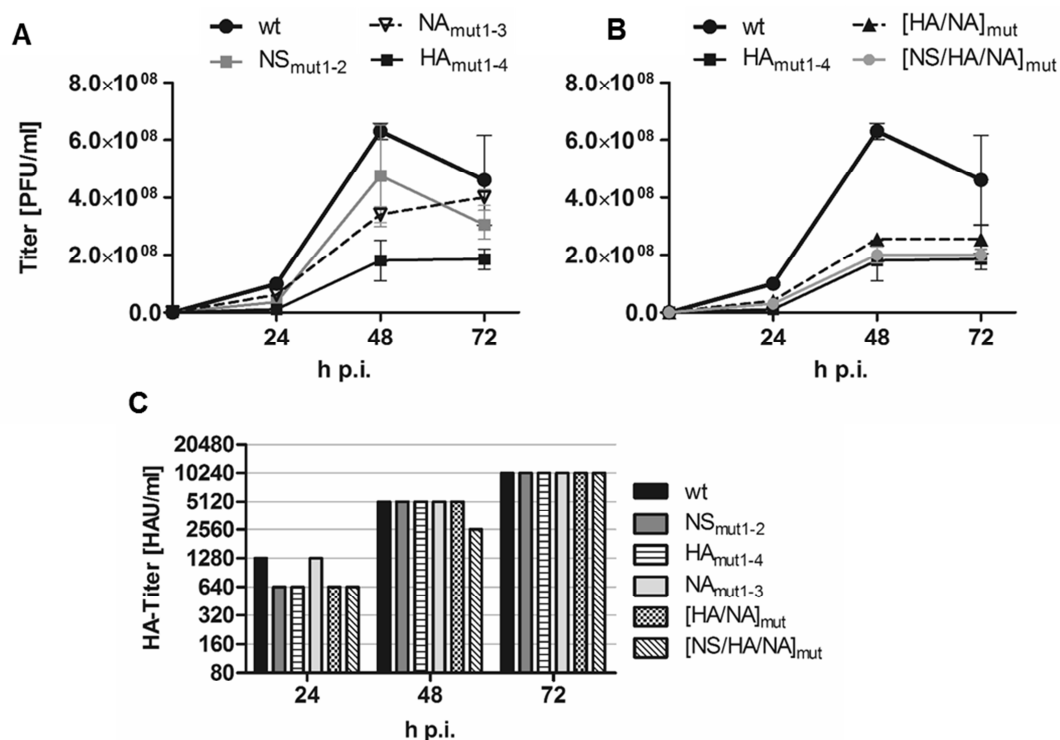


Abbildung 4.10: Quantifizierung der infektiösen Partikel im Zellüberstand der für die Western Blot-Analyse infizierten CaCo2-Zellen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde ein Teil des Mediums entfernt und der Virustiter mittels Einzelzellinfektionsassay auf MDCK-H-Zellen bestimmt (A). Zusätzlich wurde auch der HA-Titer durch Hämagglutinationstest bestimmt (B).

4.4.5 Immunstimulatorische Aktivität der Viren

Da m⁶A die immunstimulatorische Aktivität von RNA reduzieren kann (Kariko *et al.* 2005), sollte untersucht werden, ob sich Mutationen im GGACT-Motiv der viralen mRNA und die damit verbundene Reduktion des m⁶A-Gehalts auf die RNA-vermittelte Immunreaktion von Zellen auswirken kann. Für diese Versuche wurden humane pDCs verwendet, da diese zu den Hauptproduzenten von Typ-I-IFN während einer Virusinfektion zählen und damit eine entscheidende Rolle in der antiviralen Immunität spielen (Barchet *et al.* 2002; Gilliet *et al.* 2008). Dafür wurden zunächst PBMCs aus

humanem Blut präpariert und anschließend die pDCs durch MACS-Separation gereinigt. Die Reinheit der PBMCs wurde durchflusszytometrisch über die Größen- und Granularitätsverteilung im Forward-Scatter (FSC) und Side-Scatter (SSC) analysiert. Zudem wurde der Gehalt an pDCs durch Färbung des Oberflächenmoleküls CD303 (BDCA-2) bestimmt. Die Reinheit der gereinigten pDCs wurde ebenfalls durch Färbung von CD303 und anschließender durchflusszytometrischer Analyse kontrolliert. Abbildung 4.11 A zeigt exemplarisch eine solche Reinheitsanalyse. Durch die MACS-Separation konnten die pDCs von 1,5% in der PBMC-Population auf 98% angereichert werden. Zusätzlich wurde die pDC-depletierte Zellpopulation mit untersucht. Die pDCs und die pDC-depletierte Zellpopulation („non-pDCs“) wurden mit den verschiedenen Viren infiziert und mit diversen Kontrollen stimuliert. Die Produktion von IFN α wurde mittels ELISA nach 18 h im Zellüberstand gemessen. Alle Viren induzierten eine dosisabhängige IFN-Antwort sowohl in den pDCs (s. Abbildung 4.11 B+C), als auch in den pDC-depletierten PBMCs (s. Abbildung 4.11 D+E). Dabei konnte, wie erwartet, in den pDCs eine deutlich stärkere IFN-Antwort gemessen werden als in der pDC-depletierten Zellpopulation. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die pDCs in diesem Versuch mit einer Zellzahl von $1,6 \times 10^4$ pro well eingesetzt wurden, während von den pDC-depletierten Zellen 10^5 Zellen pro well eingesetzt wurden. Jedoch zeigten sich keine Unterschiede in der immunstimulatorischen Aktivität zwischen den verschiedenen Viren. Die Mutation im GGACT-Motiv der viralen mRNA und die damit verbundene Reduktion des m⁶A-Gehalts wirken sich daher in humanen pDCs nicht auf die Virus-vermittelte IFN-Antwort aus.

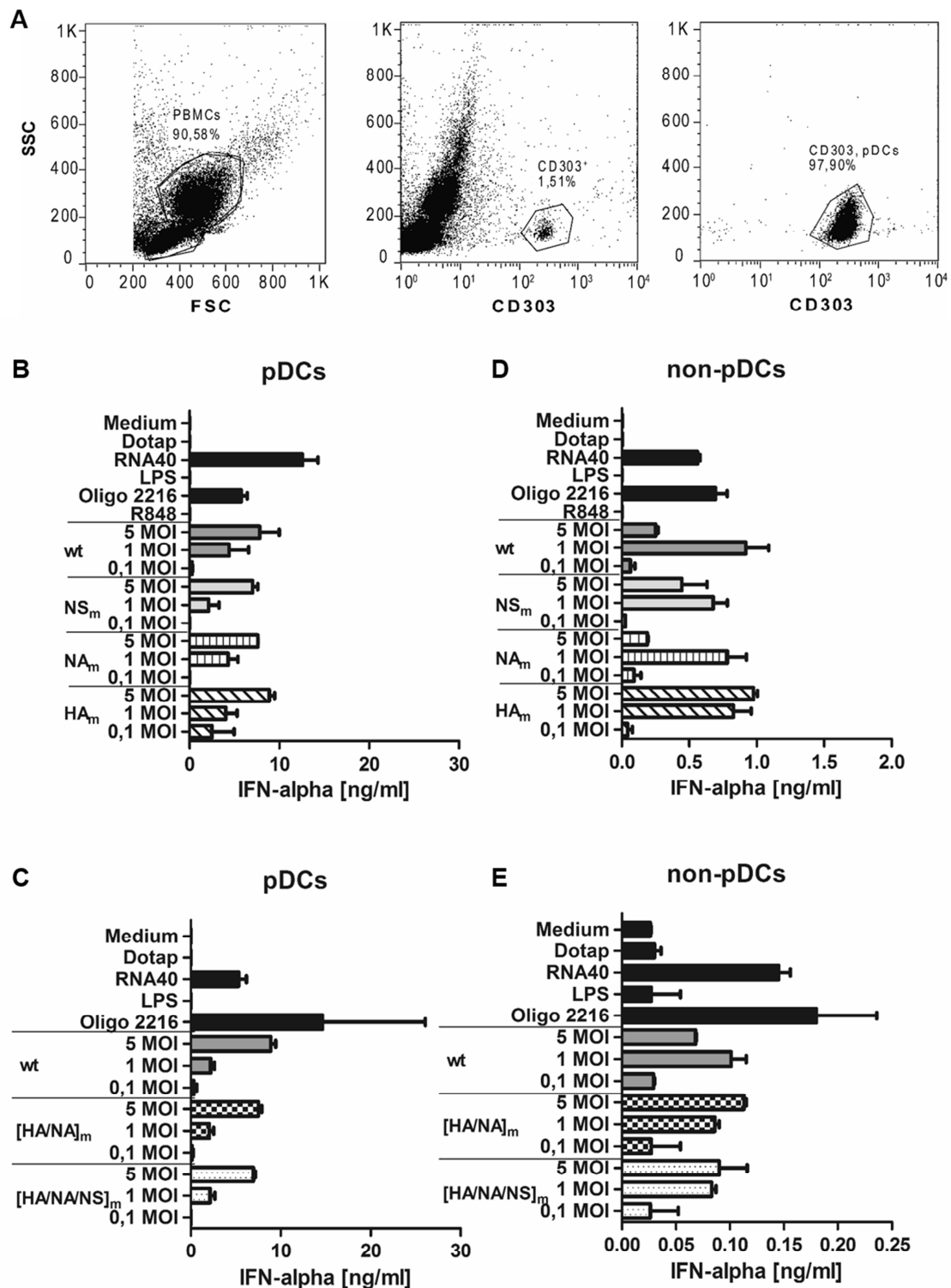


Abbildung 4.11: Infektion humaner pDCs mit den verschiedenen rekombinanten Viren und Messung der IFN- α -Sekretion. Humane pDCs wurden aus PBMCs mittels MACS-Separation isoliert. Die Reinheit der pDCs wurde durch Färbung des Oberflächenmoleküls CD303 kontrolliert. Dargestellt sind die durchflusszytometrischen Messungen der PBMCs (FSC/SSC) und der CD303-Färbung der PBMCs und der gereinigten pDCs (A). Die pDCs (B+C) und die pDC-depletierte Zellpopulation („non-pDCs“, D+E) wurden mit verschiedenen Kontrollen stimuliert und mit verschiedenen MOI der Viren infiziert. Von den pDCs wurden dabei $1,6 \times 10^4$, von den non-pDCs 10^5 Zellen pro well eingesetzt. Nach 18 h p.i. wurden die Überstände geerntet und mittels ELISA analysiert. Dieses Experiment wurde einmal durchgeführt.

4.5 Charakterisierung der rekombinanten Viren mit einzelnen Mutationen im GGACT-Motiv der HA-mRNA

In den vorhergehenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Mutationen in den GGACT-Motiven der viralen HA-RNA zu einer reduzierten HA-Proteinexpression und zu einer verringerten Replikationseffizienz im Vergleich zum wt-Virus führten. Im nächsten Teil der Arbeit sollte untersucht werden, welche der vier Mutationen für diesen Effekt verantwortlich ist oder ob die Mutationen einen additiven Effekt aufweisen. Dafür wurden vier Varianten des HA_{mut}-Virus hergestellt, von denen jede nur ein einziges mutiertes GGACT-Motiv aufwies. Die Mutationen wurden durch PCR-basierte Mutagenese, wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben, in das HA-Expressionsplasmid eingefügt und durch Sequenzierung kontrolliert. Abbildung 4.12 zeigt schematisch die Genotypen der vier rekombinanten Viren. Analog zu den in Abschnitt 4.4 beschriebenen Viren, sollten im Folgenden auch diese Viren anhand ihres Wachstumsverhalten und ihrer Proteinexpression charakterisiert werden.

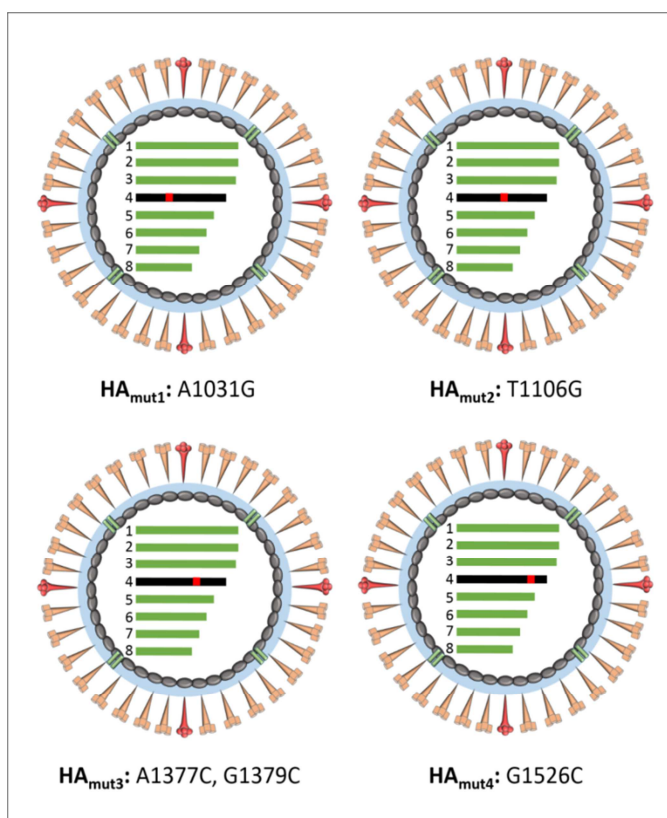


Abbildung 4.12: Schematische Darstellung der Genotypen der rekombinanten PR8-Viren mit Einzelmutationen im HA und ihre Bezeichnungen. Alle wt-Gensegmente sind in grün dargestellt, alle veränderten Gensegmente in schwarz. Die roten Punkte stehen für die mutierten GGACT-Motive. Die Bezeichnung des jeweiligen Virus ist fett gedruckt, daneben sind die genauen Mutationen des jeweiligen Segments aufgeführt.

4.5.1 Wachstumsverhalten der Viren

Um zu untersuchen, ob die rekombinanten Viren mit einzelnen Mutationen in den GGACT-Motiven der HA-mRNA Unterschiede in ihrem Wachstumsverhalten zeigen, wurden wie in Abschnitt 4.4.1 zunächst Wachstumsanalysen auf CaCo2- und Calu3-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden, wie in Abschnitt 4.4.1 beschrieben, mit einer

MOI von 0,001 mit den verschiedenen Viren infiziert und bei 37°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde ein Teil des Überstandes geerntet und der Virustiter mittels Einzelzellinfektionsassay auf MDCK-H-Zellen bestimmt. Für eine übersichtlichere Darstellung der Ergebnisse wurden die Daten für die Wachstumskurven auf zwei Diagramme aufgeteilt. Die Wachstumskurve des wt-Virus und des Virus HA_{mut1-4} ist daher für einen besseren Vergleich in beiden Diagrammen dargestellt. Parallel wurde mit den Überständen ein Hämagglutinationstest durchgeführt. Um zu kontrollieren, dass gleiche Virusmengen für die Infektion verwendet wurden, wurde das auf gleiche Titer eingestellte Virusinokulum, mit dem die Zellen infiziert wurden, ebenfalls im Einzelzellinfektionsassay mitgeführt. Auch bei den Viren mit den einzelnen Mutationen im HA-Segment zeigten sich in den Calu3-Zellen, wie anhand der Ergebnisse aus 4.4.1 bereits erwartet, keine großen Unterschiede zwischen den einzelnen Viren (Abbildung 4.13 E + F). Auch im HA-Test konnte kein großer Unterschied zwischen den Viren festgestellt werden. Lediglich HA_{mut1-4} wies, im Vergleich zu den anderen Viren, einen um zwei log₂-Stufen reduzierten Titer an Tag 2 und einen um eine log₂-Stufe reduzierten Titer an Tag 4 und 7 auf (s. Abbildung 4.13 G).

In den CaCo2-Zellen konnte, wie bereits in vorhergehenden Versuchen (s. Abbildung 4.6) beobachtet, ein leicht reduziertes Wachstum des Virus HA_{mut1-4} im Vergleich zum wt festgestellt werden (Abbildung 4.13 A). Auch das Virus mit der Mutation im 2. GGACT-Motiv (HA_{mut2}) zeigte ein leicht reduziertes Wachstum (Abbildung 4.13 B). Am Tag 4 nach der Infektion lag der Titer beider Viren etwa um den Faktor drei niedriger als der des wt-Virus (Abbildung 4.13 B), obwohl die Titerbestimmung der Viren zum Zeitpunkt 0 eine mehr als doppelt so hohe initiale Infektionsdosis von HA_{mut2} im Vergleich zum wt-Virus ergab (Abbildung 4.13 C). Im HA-Test zeigte das Virus HA_{mut1-4} an Tag 2 einen um zwei log₂-Stufen reduzierten Titer im Vergleich zum wt-Virus, der Titer von HA_{mut2} war um eine log₂-Stufe reduziert (Abbildung 4.13 D). An allen anderen Tagen unterschieden sich die Viren in ihren HA-Titern nicht.

Trotz der geringen Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen den rekombinanten Viren konnte damit bei dem Virus mit der Mutation im 2. GGACT-Motiv (HA_{mut2}), ähnlich wie bei dem Virus mit allen vier mutierten GGACT-Motiven in der HA-mRNA (HA_{mut1-4}), ein tendenziell reduziertes Wachstum im Vergleich zum wt-Virus festgestellt werden. Die Viren mit den Mutationen in den anderen GGACT-Motiven zeigten hingegen im Vergleich zum wt-Virus keine Unterschiede im Wachstumsverhalten und replizierten besser als das Virus HA_{mut1-4}.

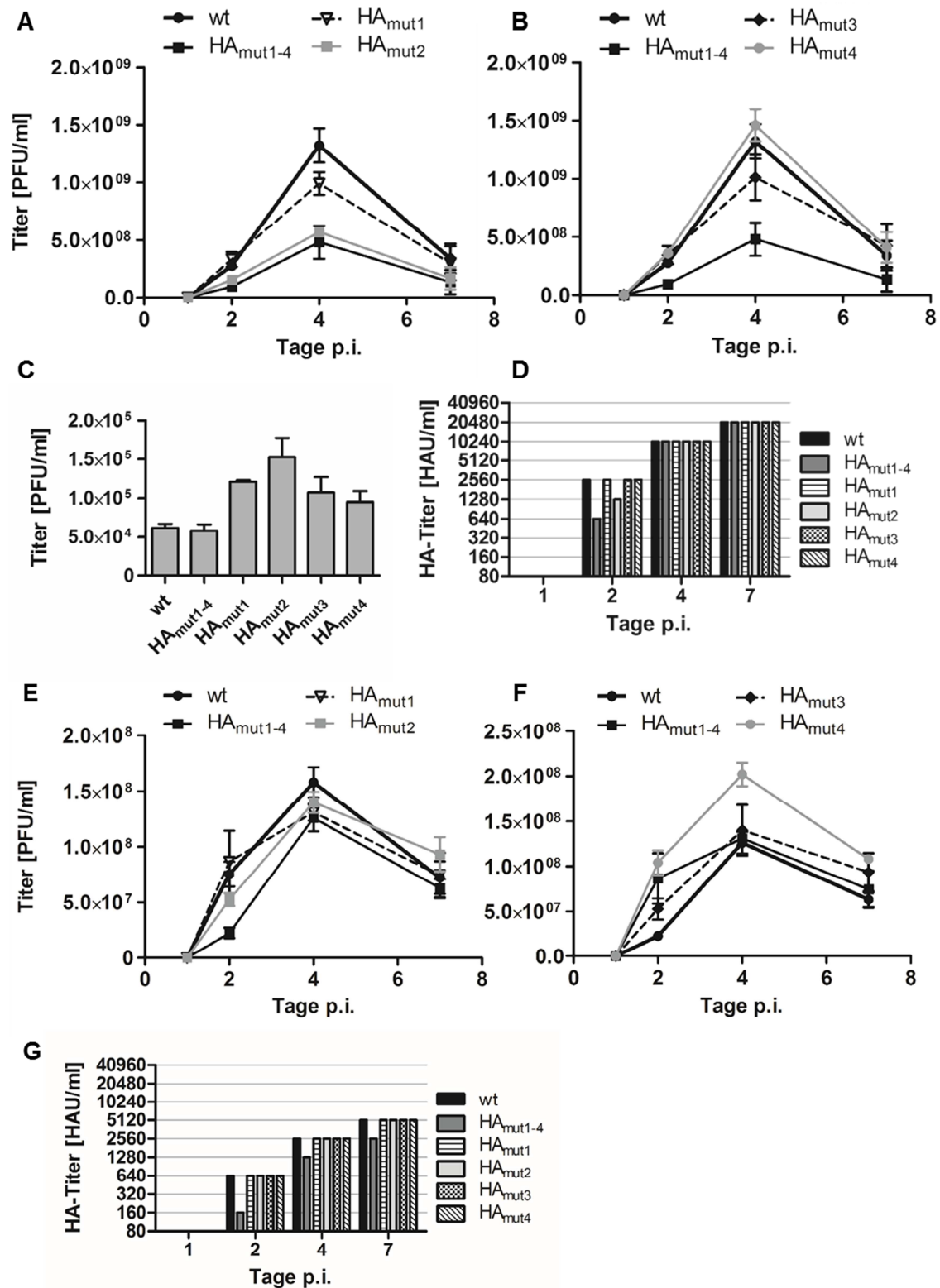


Abbildung 4.13: Wachstumsanalysen mit den rekombinanten Viren HA_{mut1-4}, HA_{mut1}, HA_{mut2}, HA_{mut3} und HA_{mut4}. CaCo2-Zellen (A-D) und Calu3-Zellen (E-G) wurden mit 0,001 MOI der jeweiligen Viren infiziert und bei 37°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde ein Teil des Mediums entfernt und der Virustiter mittels Einzelzellinfektionsassay auf MDCK-H-Zellen bestimmt (A, B, E, F). Parallel wurde auch der HA-Titer des Überstands mittels Hämagglutinationstest bestimmt (D, G). Das Inokulum mit gleichen Virustitern, welches für die Infektion verwendet wurde (0h-Wert), wurde ebenfalls bei der Titration mitgeführt und die Ergebnisse separat gezeigt (C). Gezeigt ist je ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Versuchen. Die Bestimmung der Virustiter erfolgte in Vierfachbestimmungen.

4.5.2 Wachstumsverhalten in kompetitiven Infektionsversuchen

Aufgrund der nur geringen Unterschiede in den Wachstumsanalysen sollten die Viren in einem kompetitiven Infektionsassay zusammen mit dem wt-Virus auf ihre Replikationseffizienz getestet werden. Dafür wurden erneut Calu3- und CaCo2-Zellen mit dem wt-Virus und einer Virusmutante im gleichen Verhältnis mit einer Gesamtinfektionsdosis von 0,001 MOI koinfiziert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde ein Teil des Überstandes abgenommen und die genotypische Zusammensetzung der Virusmischung im Überstand durch Sequenzierung des jeweiligen Gensegments bestimmt (s. 3.5.3). Als 0h-Wert diente das Inokulum mit beiden Viren, welches für die Infektion der Zellen verwendet wurde. Abbildung 4.14 zeigt den Anteil des jeweiligen Genotyps zu den verschiedenen Zeitpunkten, der durch Quantifizierung der Chromatogrammpeaks an der jeweiligen mutierten Genomstelle berechnet wurde. Bei dem Virus mit mehreren mutierten Stellen im HA-Gensegment wurde die Position 1377 analysiert. In den CaCo2-Zellen (s. Abbildung 4.14 A) lag der Anteil des wt-Virus in dem Virusgemisch, welches für die Infektion verwendet wurde (Zeitpunkt 0), bei 36% bis 57%. Übereinstimmend mit den Ergebnissen aus Abschnitt 4.4.2 reduzierte sich der Anteil des Virus HA_{mut1-4} in Konkurrenz mit dem wt-Virus von 53% zu Beginn auf etwa 20% nach 7 Tagen. Dagegen blieb das Verhältnis der Viren mit der einzelnen Mutation an Position 1 (HA_{mut1}), Position 3 (HA_{mut3}) und Position 4 (HA_{mut4}) über 7 Tage hinweg konstant. Diese Viren zeigten also, im Gegensatz zu den Viren mit allen mutierten Positionen (HA_{mut1-4}) keinen replikativen Nachteil. Der Anteil des Virus HA_{mut2} mit der Mutation T1106G reduzierte sich jedoch von über 60% zu Beginn der Infektion auf etwa 36% nach einem Tag und 28% nach 7 Tagen und wurde, ebenso wie das Virus mit allen vier mutierten GGACT-Motiven, aus der Viruspopulation verdrängt. Auch in den Calu3-Zellen (s. Abbildung 4.14 B) reduzierte sich der Anteil des Virus HA_{mut2} am Gesamtviruspool nach 7 Tagen von 65% auf 37%, während der Anteil der anderen Viren mit den einzelnen Mutationen im HA-Gensegment konstant blieb.

Die Ergebnisse bestätigten die bei den Wachstumsanalysen in Abschnitt 4.5.1 bereits beobachtete reduzierte Replikationsfähigkeit der Viren HA_{mut1-4} und HA_{mut2}. Sowohl das Virus HA_{mut1-4} mit allen vier mutierten GGACT-Motiven als auch das Virus HA_{mut2} mit der Mutation im 2. GGACT-Motiv zeigten einen deutlichen replikativen Nachteil im Vergleich zum wt-Virus und wurden bei der kompetitiven Infektion aus der Viruspopulation verdrängt.

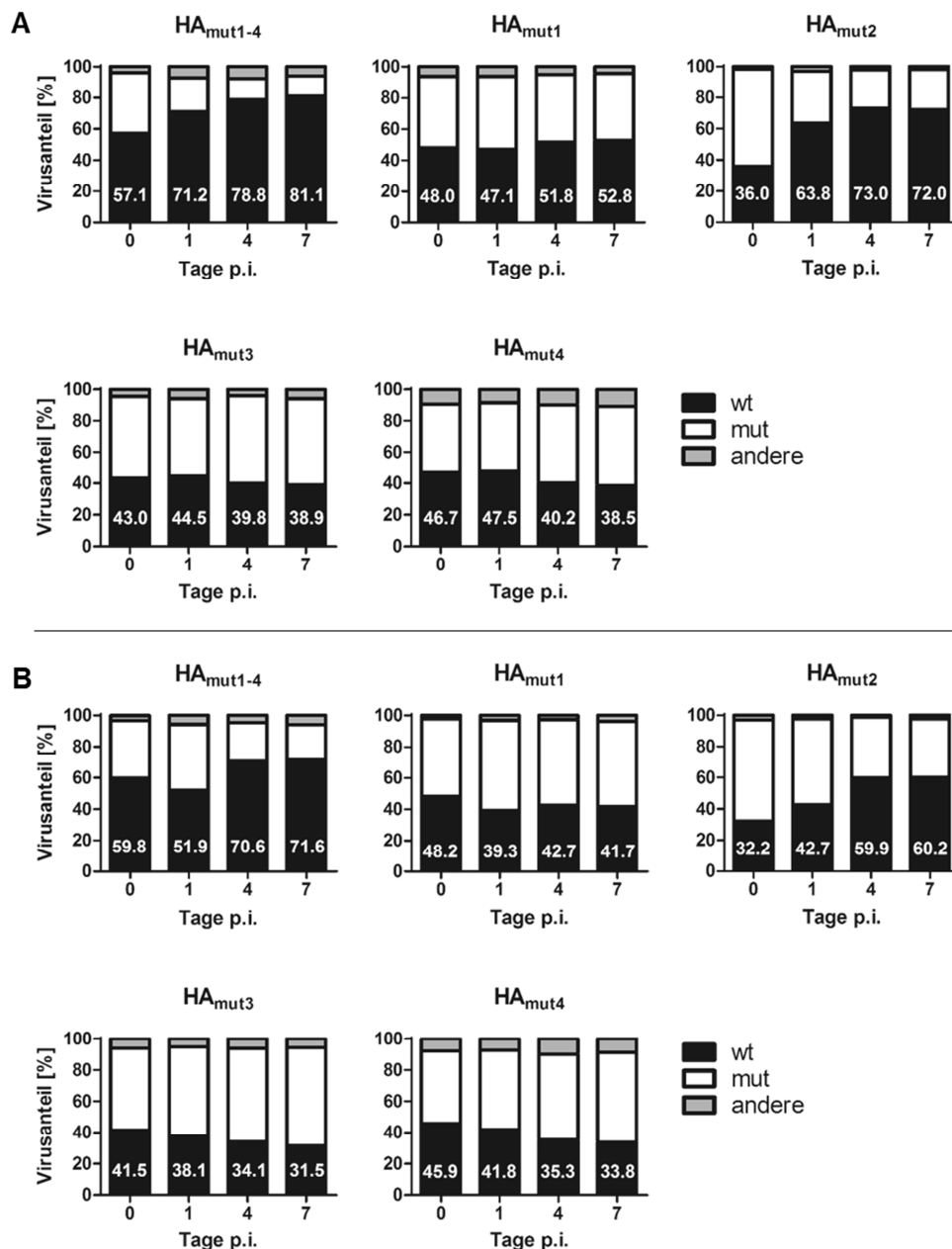


Abbildung 4.14: Wachstumsverhalten der Viren HA_{mut1-4}, HA_{mut1}, HA_{mut2}, HA_{mut3} und HA_{mut4} in kompetitiven Infektionsversuchen mit dem wt-Virus. CaCo2- (A) und Calu3-Zellen (B) wurden mit insgesamt 0,001 MOI einer 1:1-Mischung des wt-Virus und der jeweiligen Virusmutante infiziert. Die genotypische Zusammensetzung zu verschiedenen Zeitpunkten wurde durch Sequenzierung der Virusgenome im Zellüberstand und anschließende Quantifizierung der Chromatogramm-Peaks an einer der mutierten Genomstellen ermittelt. Der prozentuale Anteil des wt-Virus ist in weißer Schrift innerhalb des Diagramms dargestellt. Gezeigt ist je ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Versuchen

4.5.3 Virale mRNA-Expression in CaCo2-Zellen

Da bereits für das Virus HA_{mut1-4} sowohl ein leicht reduziertes Wachstum als auch eine reduzierte HA-mRNA-Expression im Vergleich zum wt-Virus beobachtet werden konnte (s. 4.4.3), sollte im nächsten Versuch untersucht werden, ob auch die Viren mit den einzelnen Mutationen im HA-Gensegment eine reduzierte HA-mRNA-Expression aufwiesen. Erneut wurden dafür CaCo2-Zellen mit den verschiedenen Viren infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten in ExtraZol lysiert. Nach Aufreinigung der RNA

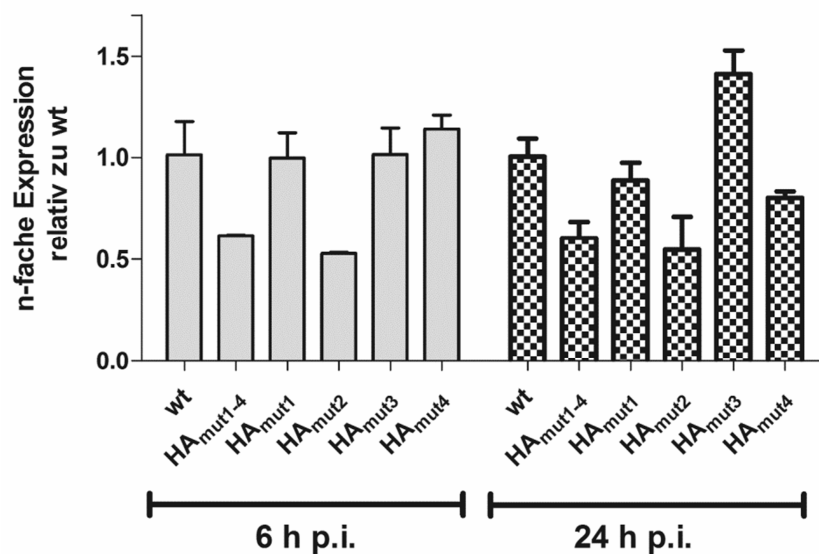


Abbildung 4.15: Quantifizierung der viralen HA-mRNA-Expression während einer Influenzainfektion in CaCo2-Zellen. CaCo2-Zellen wurden mit 2 MOI der rekombinanten PR8-Viren infiziert und für 6 h bzw. 24 h inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die RNA der Zellen isoliert und mithilfe von Oligo-(dT)-Primern in cDNA umgeschrieben. Die Analyse erfolgte durch qPCR mit zwei Replikaten und anschließender Quantifizierung mithilfe der $\Delta\Delta C(t)$ -Methode. Dargestellt ist die auf die Expression der M-mRNA normierte n-fache Expression im Vergleich zu Zellen, die mit dem wt-Virus infiziert wurden. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

erfolgte die cDNA-Synthese mit Oligo-(dT)-Primern und die Analyse der viralen mRNA-Expression mittels qPCR unter Verwendung spezifischer Primer für die HA- und M-mRNA. Die HA-Expression wurde mithilfe der $\Delta\Delta C(t)$ -Methode quantifiziert, dabei auf die Expression der viralen M-mRNA normiert und in Relation zur Expression nach Infektion mit dem wt-Virus berechnet.

Analog zu den in Abschnitt 4.4.3 gezeigten Daten, wies das Virus HA_{mut1-4} auch hier, sowohl 6 h als auch 24 h nach der Infektion, eine um die Hälfte reduzierte Expression der HA-mRNA im Vergleich zum wt-Virus auf. Passend zu den Ergebnissen der Replikationsanalysen zeigte auch das Virus HA_{mut2} eine ebenso deutliche Reduktion der HA-mRNA wie das Virus HA_{mut1-4}. Bei allen anderen Viren war die HA-mRNA-

Expression mit der des wt-Virus vergleichbar. Lediglich die mRNA-Expression des Virus HA_{mut3} war 24 h nach der Infektion etwas höher als beim wt-Virus.

4.5.1 Expression der viralen Proteine in CaCo2-Zellen nach Infektion mit den rekombinanten Viren

Um zu untersuchen, ob die reduzierte HA-mRNA-Expression des Virus HA_{mut2}, wie bereits für das HA_{mut1-4} beobachtet, mit einer reduzierten HA-Proteinexpression einhergeht, sollte im nächsten Versuch die Proteinexpression der verschiedenen Viren mit den einzelnen Mutationen im HA-Segment verglichen werden. Erneut wurden dafür CaCo2-Zellen, wie in Abschnitt 3.5.5 beschrieben, mit den Viren infiziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten in RIPA-Puffer lysiert. Die Zelllysate wurden im Anschluss durch SDS-PAGE aufgetrennt und das HA-Protein im Western Blot detektiert. Zusätzlich wurde auch das M-Protein, dessen RNA keine Mutationen aufweist, als Kontrolle mitgefärbt (s. Abbildung 4.16 A) und die Proteinexpression anhand der Bandenintensität quantifiziert. Die Intensität der HA-Bande wurde dabei auf die der M-Bande normiert und der daraus resultierende Quotient in Relation zu dem des wt-Virus gesetzt (s. Abbildung 4.16 B). Dabei wurde der Mittelwert aus den Quotienten von zwei verschiedenen Blots mit gleichen Proben gebildet, wobei nur einer der Blots in Abbildung 4.16 gezeigt ist. Um zusätzlich die aus den Zellen freigesetzten Partikel und ihre Infektiosität zu bestimmen, wurde der Überstand der infizierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten im HA-Test und Einzelzellinfektionsassay getestet (s. Abbildung 4.17). Für eine übersichtlichere Darstellung der Ergebnisse wurden die Daten für die Wachstumskurven auf zwei Diagramme aufgeteilt. Die Wachstumskurve des wt-Virus und des Virus HA_{mut1-4} ist zum Vergleich in beiden Diagrammen dargestellt (s. Abbildung 4.17 A + B).

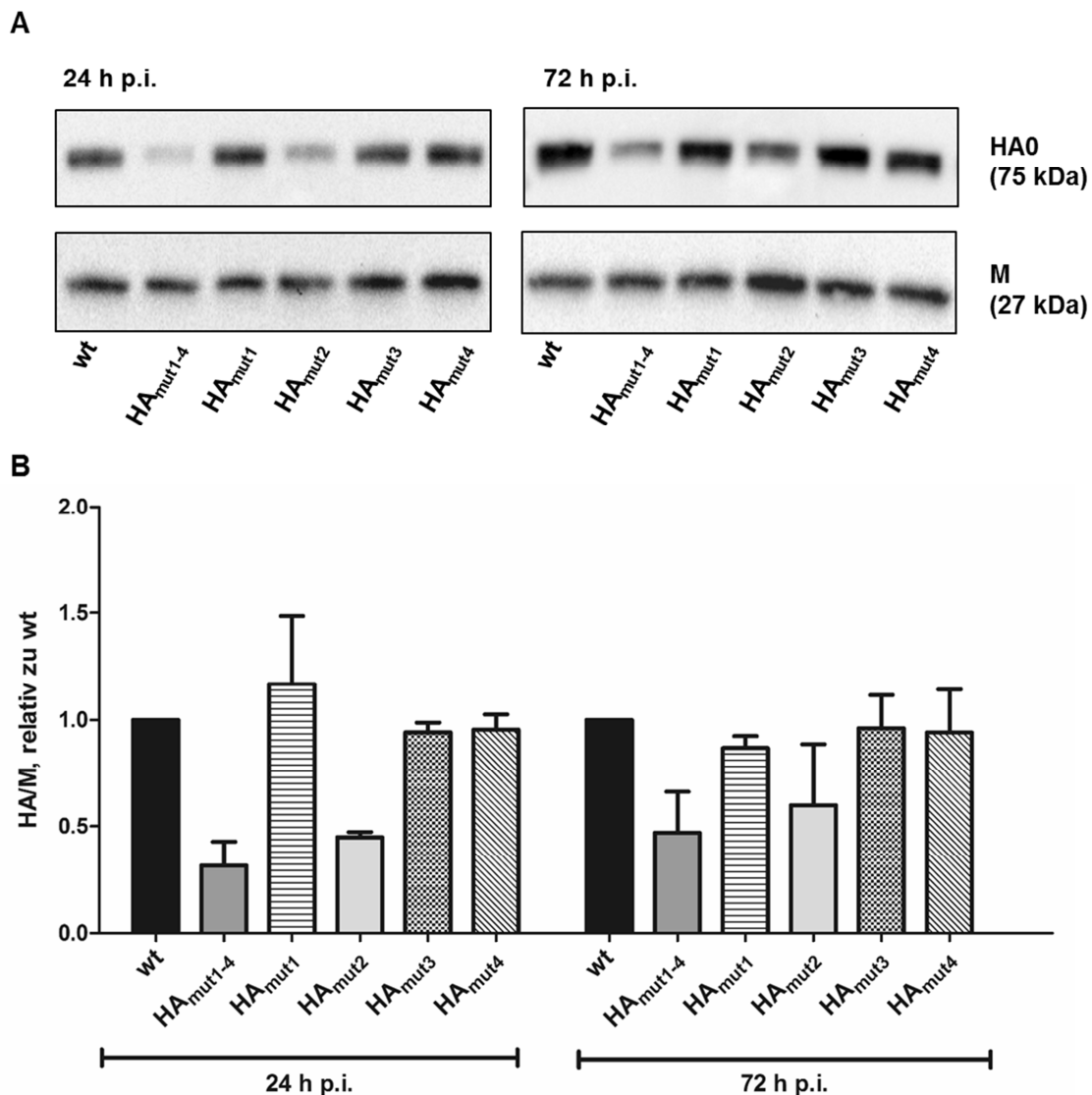


Abbildung 4.16: Expression der viralen Proteine HA und M in CaCo2-Zellen nach Infektion mit den verschiedenen HA-Einzelmutanten. CaCo2-Zellen wurden mit 2 MOI infiziert und nach 24 und 72 h in RIPA-Puffer lysiert. Von jeder Probe wurden 2 µg Protein (bestimmt durch BCA-Assay) per SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit dem entsprechenden Antikörper detektiert (A). Die Quantifizierung der Bandenintensität erfolgte mit ImageJ. Dargestellt ist das Verhältnis von HA zu M, relativ zu wt als Mittelwert aus zwei Replikaten (B). Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Blot von drei unabhängigen Versuchen.

Sowohl nach 24 h als auch nach 72 h konnte in den Zellen, die mit HA_{mut1-4} infiziert wurden, wie in den vorherigen Experimenten, eine reduzierte Expression des HA-Proteins, nicht aber des M-Proteins, beobachtet werden. Die Quantifizierung und Normierung auf das M-Protein zeigt eine um den Faktor 2 bis 2,5 verringerte Expression von HA im Vergleich zum wt-Virus. Analog zu den kompetitiven Wachstumsanalysen in 4.5.2 und in Übereinstimmung mit der reduzierten HA-mRNA-Expression (s. Abbildung 4.15) zeigte auch HA_{mut2} eine reduzierte HA-Proteinexpression in Vergleich zum wt. Die auf M normierte Expression ist bei diesem Virus nach 24 h im Vergleich zum wt-Virus um den Faktor 2 verringert. Nach 72 h liegt

sie etwas über der HA-Expression des Virus HA_{mut1-4}, jedoch noch leicht unter der des wt-Virus. Bei den anderen Viren mit den einzelnen Mutationen im HA-Segment konnte keine so deutliche Reduktion der HA-Expression beobachtet werden. Auch bei diesem Experiment spiegeln sich die reduzierten Proteinexpressionen in den Titern der in den Überstand freigesetzten, infektiösen Viren wieder. Die Titer von HA_{mut1-4} und HA_{mut2} lagen zu allen Zeitpunkten unter denen des wt-Virus, auch wenn hier die Unterschiede weniger deutlich waren als bei der Proteinexpression. Im HA-Test (s. Abbildung 4.17 C) zeigten sich nach 24 h und 48 h nach der Infektion leichte Unterschiede im HA-Titer: an Tag 1 zeigten das wt-Virus und das Virus HA_{mut1} den höchsten HA-Titer, der von HA_{mut2} und HA_{mut4} lag eine log₂-Stufe darunter, der von HA_{mut1-4} und HA_{mut3} lag zwei log₂-Stufen unter dem des wt-Virus. Nach 48 h wies lediglich das Virus HA_{mut1-4} einen um eine log₂-Stufe reduzierten HA-Titer im Vergleich zu den anderen Viren auf. Nach 72 h wiesen alle Viren gleiche HA-Titer auf.

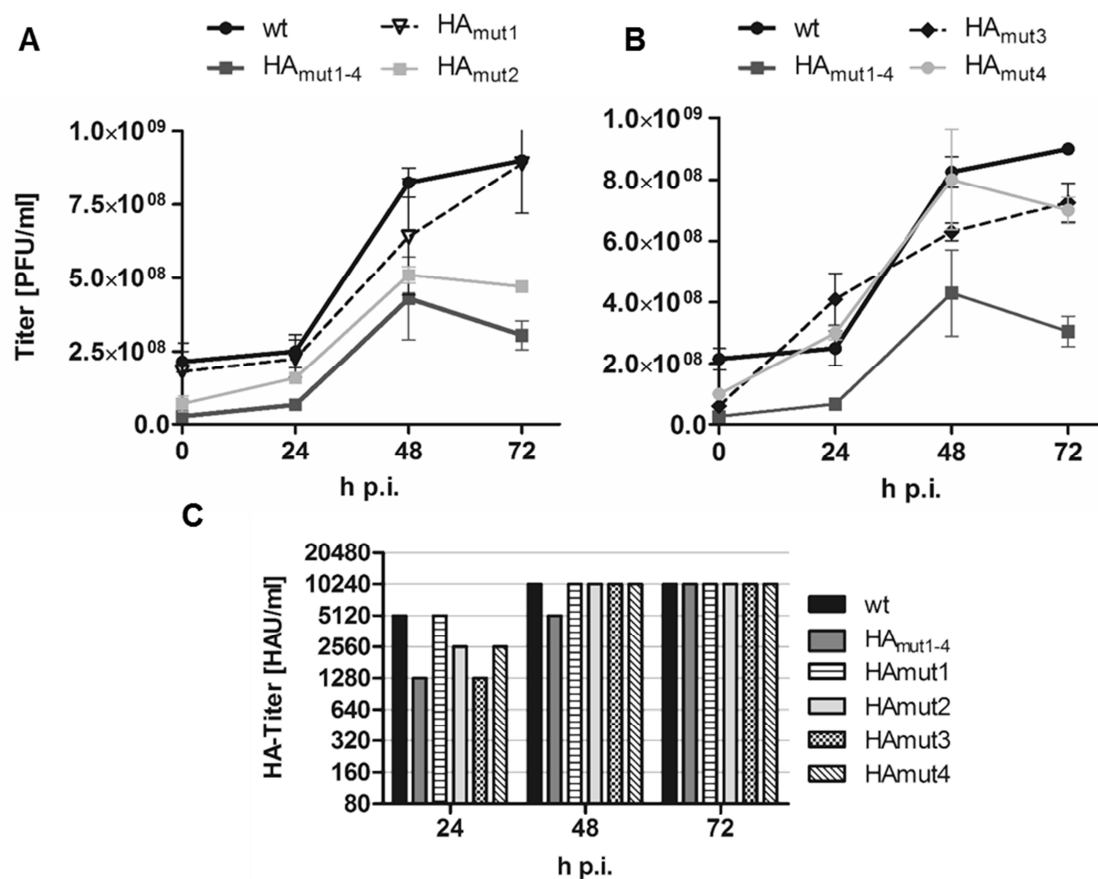


Abbildung 4.17: Quantifizierung der infektiösen Partikel im Zellüberstand der für die Western Blot-Analyse infizierten CaCo2-Zellen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde ein Teil des Mediums entfernt und der Virustiter mittels Einzelzellinfektionsassay auf MDCK-H-Zellen bestimmt (A + B). Zusätzlich wurde auch der HA-Titer durch Hämagglutinationstest bestimmt (C).

4.6 Identifikation von m⁶A in Influenza mRNA durch MeRIP-Sequenzierung (2)

In Abschnitt 4.4 und 4.5 konnte gezeigt werden, dass sich die Mutationen in den GGACT-Motiven des HA-Gensegments auf die Replikationseffizienz und auf die virale Proteinexpression in infizierten Zellen auswirken. Dabei konnte insbesondere ein Einfluss der Mutation T1106G im 2. GGACT-Motiv der RNA beobachtet werden. Dass das Adenosin der viralen wt-mRNA an dieser Stelle durch eine Methylierung modifiziert vorliegt, konnte jedoch bisher nicht gezeigt werden. Um die Positionen der m⁶A-Modifikationen in der viralen mRNA nachzuweisen, sollte das zu Beginn der Arbeit durchgeführte Verfahren des MeRIP-Seq (s. 4.1) mit einigen methodischen Veränderungen und einer abgewandelten Sequenziermethode erneut angewendet werden. Wieder wurden CaCo2-Zellen für die Infektion verwendet, jedoch wurden diese nicht mit dem PR8-Virus, welches in Hühnereiern gezüchtet wurde, infiziert, sondern mit dem rekombinanten wt-Virus und dem HA_{mut1-4}-Virus. Der Vergleich beider Viren sollte zeigen, ob die Mutationen eine Veränderung des m⁶A-Profiles bei dem HA_{mut1-4}-Virus im Vergleich zum wt-Virus bewirkten. Nach der RNA-Isolation aus den infizierten Zellen wurde die gesamt-RNA durch HPLC-Analyse auf DNA-Kontaminationen untersucht. Eine N6-Methylierung von Adenin in der DNA kann zu einer Anreicherung in der IP führen und eine Fehlinterpretation der Daten bewirken (Dominissini *et al.* 2012). In der HPLC konnten jedoch keine DNA-Nukleoside nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Abbildung 4.18 zeigt die weiteren Qualitätskontrollen der Proben für die NGS-Analyse am Beispiel der RNA aus den mit dem wt-Virus infizierten Zellen. Die Daten der anderen Probe wurden nicht grafisch dargestellt. Zunächst wurde die Integrität der gesamt-RNA durch Analyse auf einem RNA Pico Chip im Bioanalyzer überprüft (s. Abbildung 4.18 A). Das Verhältnis der ribosomalen RNA zu der Menge an kleineren RNAs ist dabei ein Indikator für die RNA-Integrität und wird als *RNA integrity number* (RIN) angegeben. Je näher dieser Wert an 10 liegt, desto besser ist die Integrität der RNA. Sowohl bei dieser, als auch bei der nicht gezeigten Probe wurde ein RIN-Wert von 9,4 ermittelt. Anschließend wurde, wie bereits bei dem ersten MeRIP-Seq-Versuch, die mRNA mithilfe von Oligo-(dT)-Beads angereichert. Die Anreicherung wurde diesmal nicht durch Auftrennung der Probe im Agarosegel kontrolliert, sondern ebenfalls mithilfe des Bioanalyzers. Dabei wurde deutlich, dass immer noch sehr viel rRNA in der Probe vorhanden war (s. Abbildung 4.18 B). Daher wurde die mRNA-Anreicherung erneut durchgeführt. Nach der 2. Anreicherung konnten nur noch geringe Mengen rRNA nachgewiesen werden (s. Abbildung 4.18 C). Auch die Fragmentierung in Stücke von 100 bp, wie in 3.2.2.3 beschrieben, wurde mithilfe des Bioanalyzers kontrolliert (s. Abbildung 4.18 D).

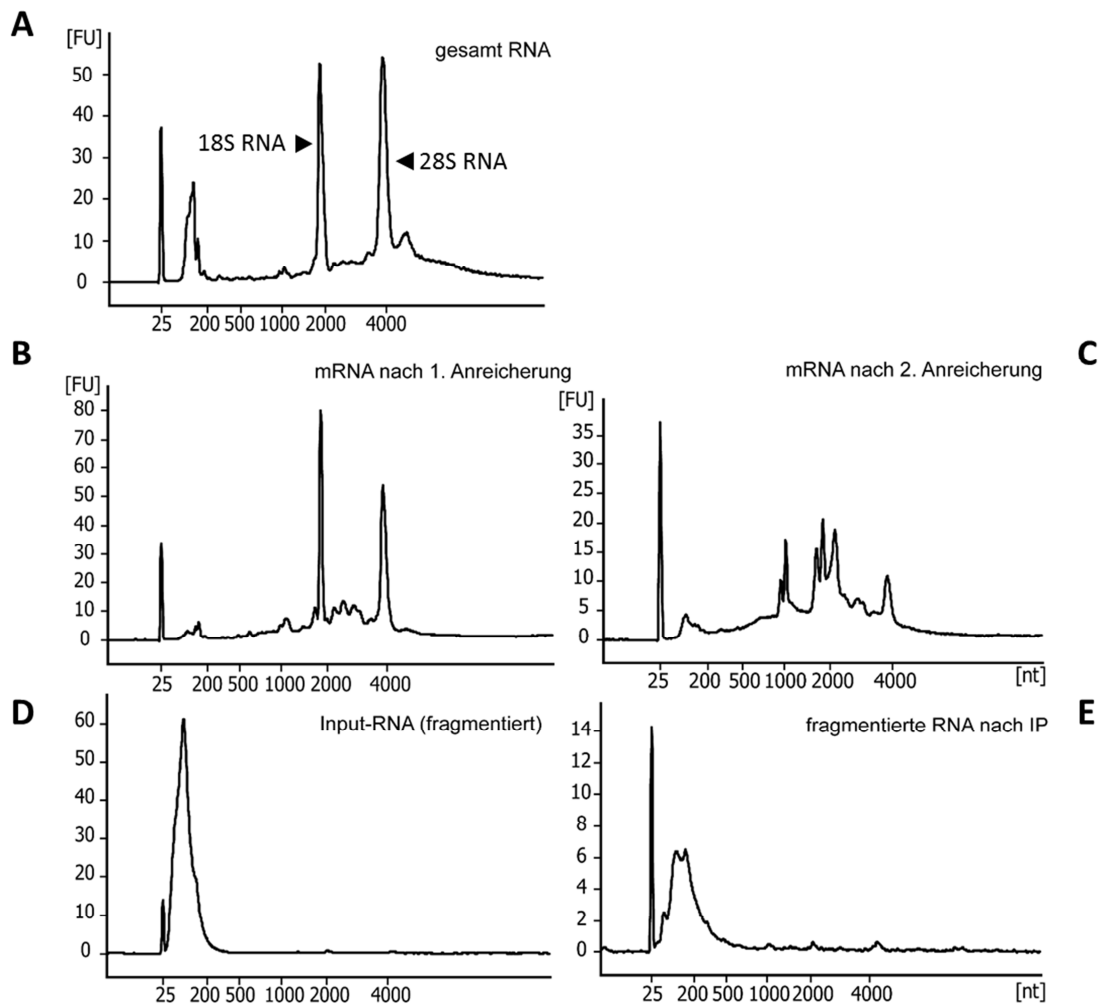


Abbildung 4.18: Qualitätskontrollen für die NGS-Analyse am Beispiel der RNA aus den mit wt-Virus infizierten CaCo2-Zellen. Mithilfe des Bioanalyzers wurden die gesamt-RNA (A), mRNA nach einer Anreicherung mit Oligo-(dT)-Beads (B), mRNA nach einer zweiten Anreicherung mit Oligo-(dT)-Beads (C), mRNA nach chemischer Fragmentierung (D) und die mRNA nach IP (E) auf einem RNA Pico Chip analysiert.

Ein Teil der RNA wurde für die Immunpräzipitation eingesetzt. Diese wurde, wie in Abschnitt 3.2.2.4 beschrieben, durchgeführt und die RNA abschließend im Bioanalyzer erneut auf ihre Integrität überprüft (s. Abbildung 4.18 E). Eine Degradation der RNA konnte dabei nicht festgestellt werden. Nach der Aufreinigung der Proben erfolgte die *library*-Erstellung und das NGS durch die Firma vertis Biotechnologie AG. Dabei wurde die nicht-immunpräzipitierte RNA als „Input-Kontrolle“ mitgeführt. Die bioinformatische Auswertung wurde von Herrn Oliver Rupp (Universität Gießen) durchgeführt. Für die Detektion und Visualisierung der Peaks wurde zusätzlich das Online-Tool „m⁶AViewer“ verwendet (Antanaviciute *et al.* 2017).

Als Referenzgenom wurde das Genom des wt-Virus verwendet, dessen einzelne Segmente in einer Datei zusammengefasst wurden, sodass das Genom als eine zusammenhängende Sequenz mit NS am Anfang und PB2 am Ende dargestellt wurde. Alle *reads*, welche dem Influenzagenom zugeordnet werden konnten, wurden für die

Analyse verwendet. Um Unterschiede in der Gesamt-RNA-Menge zu berücksichtigen, wurde die Sequenzierung auf die durchschnittliche *read*-Zahl der Probe normiert. Abbildung 4.19 zeigt die Zahl der *reads* an jeder Stelle des Influenzagenoms, einmal für die RNA, die aus den mit dem wt-Virus infizierten CaCo2-Zellen isoliert wurde (A) und einmal für die RNA aus den mit dem HA_{mut1-4}-Virus infizierten CaCo2-Zellen (B). Die Sequenziertracks der IP-Probe (rote Linie) und der Input-Kontrolle (blaue Linie) wurden dabei übereinandergelegt. Je größer an einer bestimmten Stelle die *read*-Zahl in der IP-Probe im Vergleich zur Input-Kontrolle, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass hier eine signifikante Anreicherung der Sequenz und damit eine m⁶A-Modifikation an dieser Stelle vorlag. Diese Wahrscheinlichkeit wurde für jede Position mithilfe des exakten Fisher-Tests (p-Wert), der Benjamini-Hochberg-Prozedur (*false discovery rate*, FDR) und der n-fachen Anreicherung in der IP-Probe im Vergleich zur Inputkontrolle (*fold enrichment*) berechnet. Eine Position wurde von dem Programm als „m⁶A-modifiziert“ definiert, wenn der p-Wert und die FDR < 0,05 und die Anreicherung >2 waren. Diese Positionen sind durch ein Dreieck markiert, dessen Farbintensität die Höhe der Anreicherung repräsentiert.

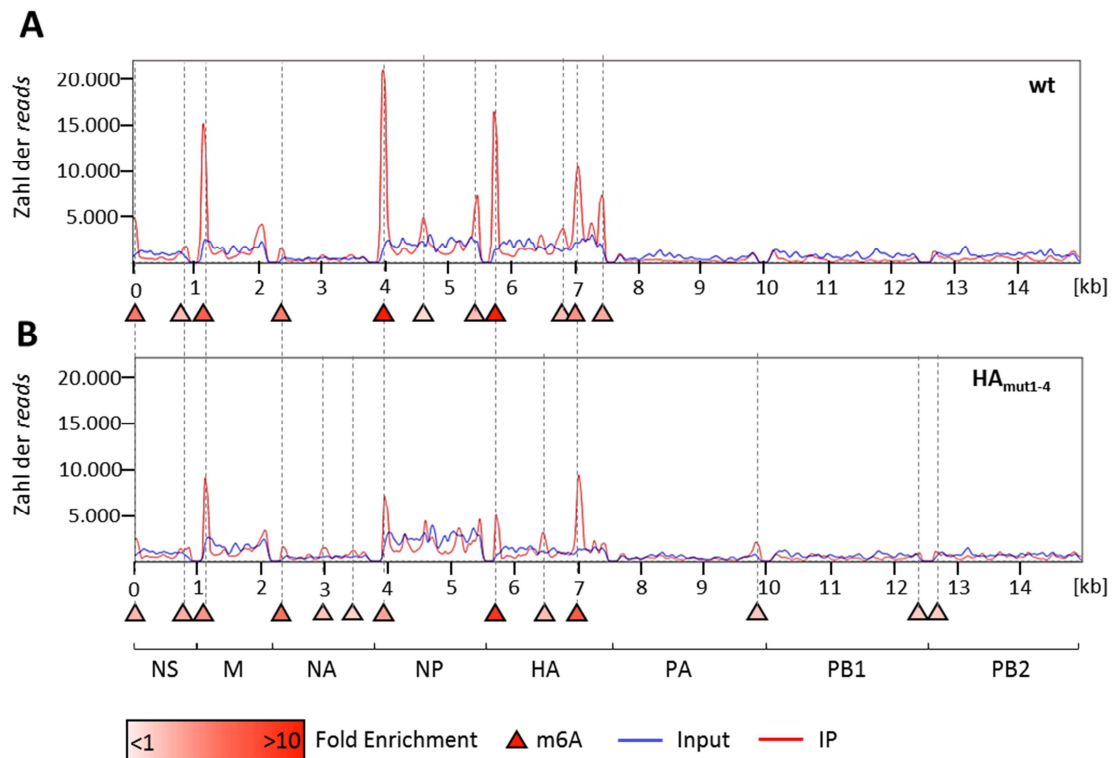


Abbildung 4.19: Grafische Darstellung der detektierten m⁶A-Positionen in den mRNAs des PR8-Virus. Die Identifizierung der m⁶A-Peaks erfolgte mithilfe des Tools „m⁶AViewer“, wie durch Antanaviciute *et al.* (2017) beschrieben. Die Grafik zeigt die Überlagerung der Sequenziertracks des Influenzagenoms von der IP-Probe (rot) und der Input-Kontrolle (blau), jeweils bei der Sequenzierung der wt-Proben (oben) und der HA_{mut1-4}-Proben (unten). Die roten Dreiecke und gestrichelten Linien markieren die Positionen, an denen eine signifikante Anreicherung der Sequenz in der IP-Probe im Vergleich zur Input-Kontrolle detektiert wurde, wobei die Farbintensität der Dreiecke die Höhe der Anreicherung und damit die Wahrscheinlichkeit einer m⁶A-Modifikation repräsentiert (*fold enrichment*). Die Genomsegmente der Influenzaviren wurden als Referenzgenom für das *mapping* in einer Datei zusammengefasst, sodass das Genom als zusammenhängende Sequenz dargestellt ist. Die eckigen Klammern unterhalb der Sequenziertracks markieren die einzelnen Segmente.

Zunächst fiel auf, dass sich die einzelnen Segmente in der Zahl der Sequenzreads unterschieden: die RNAs der Segmente NS und NA sowie die Polymerasesegmente wiesen relativ geringe *read*-Zahlen auf und waren damit, sowohl in der wt-Probe als auch in der HA_{mut1-4}-Probe, in geringerer Zahl vorhanden als die RNAs der Segmente M, NP und HA. In der HA_{mut1-4}-Probe wies jedoch auch die HA-mRNA geringere *read*-Zahlen im Vergleich zum wt-Virus auf, sowohl in der Input-Kontrolle als auch in der IP-Probe. Dies bestätigte die Beobachtungen aus den qPCR-Analysen, welche eine reduzierte HA-mRNA-Expression bei einer Infektion von CaCo2-Zellen mit dem Virus HA_{mut1-4} zeigen konnten. Sequenzanreicherungen in der IP-Probe im Vergleich zur Inputkontrolle (m⁶A-Peaks) konnten an 11 Positionen in der mRNA des wt-Virus und an 13 Positionen in der mRNA des Virus HA_{mut1-4} gefunden werden. Die mRNA des wt-Virus wies zwei Methylierungen im NS-Segment auf, eine davon in der 5'- und eine in der 3'-Region. Auch in den M-, NA-, NP- und HA-mRNAs wurde jeweils eine Methylierung in der 5'-Region detektiert, wobei in der NP- und HA-mRNA zusätzlich

auch die 3'-Region methyliert war. In der NP-mRNA konnte eine zusätzliche Methylierung um Position 650 detektiert werden, die HA-mRNA wies zwei weitere Methylierungen um Position 1100 und 1300 auf. Interessanterweise konnten die Peaks mit der höchsten Anreicherung am 5'-Ende der Segmente M, NP und HA beobachtet werden.

Die Methylierungen um Position 1100 in der HA-mRNA, um Position 650 in der NP-mRNA und in der 3'-Region der NP-mRNA fehlten in der mRNA des Virus HA_{mut1-4}. Dafür wies das Virus zwei zusätzliche m⁶A-Peaks in der NA-mRNA, einen in der HA-mRNA um Position 750 und jeweils einen in der 3'-Region der Polymerase-mRNAs auf.

Um die Positionen, an denen m⁶A-Peaks detektiert wurden, genauer zu untersuchen, wurden die Sequenzen unter den Peaks mithilfe des Programms IGV extrahiert und tabellarisch dargestellt (s. Tabelle 4). Zwar ermittelt das Programm m⁶A-Viewer ein einzelnes Nukleotid als Peakspitze, jedoch zeigten Antanaviciute *et al.* (2017), dass nur bei 32% der m⁶A-Peaks ein Konsensusmotiv in der Nähe von < 10 nt gefunden werden konnte, bei 75% der ermittelten Peaks ist das nächste m⁶A-Motiv mehr als 30 nt entfernt. Dies deckt sich mit den Daten von Dominissini *et al.* (2012), welche eine durchschnittliche Entfernung von 24 nt zwischen der Peakspitze und einem m⁶A-Konsensusmotiv beobachteten, was in etwa der Auflösung dieser Methode entspricht. Aus diesem Grund wurde an jeder Position eine Sequenz von etwa 30 bis 100 nt um die ermittelte Peakspitze analysiert und das mithilfe des Programms ermittelte Nukleotid in der Peakspitze rot markiert. Die Sequenzen wurden anschließend auf m⁶A-Konsensusmotive untersucht und die Entfernung von der ermittelten Peakspitze bestimmt. Bei 11 von 24 Stellen betrug die Entfernung der nächsten m⁶A-Konsensussequenz von der ermittelten Peakspitze ≤ 10 nt, an zehn Stellen zwischen 10 und 20 nt und an drei Stellen mehr als 20 nt. Bei den drei Peaks mit einer Entfernung von > 20 nt handelte es sich um die Peaks in den Polymerase-segmenten, welche nur in der mRNA des HA_{mut1-4}-Virus gefunden wurden.

Abbildung 4.20 zeigt den Vergleich der Sequenziertracks zwischen der HA-mRNA des wt-Virus und des HA_{mut1-4}-Virus. Die x-Achse wurde hierbei, für eine bessere Übersicht, an die HA-mRNA angepasst. Unterhalb sind die Positionen der GGACT-Motive dargestellt. Die Analyse machte deutlich, dass an nur einer Position das GGACT-Motiv unterhalb eines m⁶A-Peaks gefunden wurde: die HA-mRNA des wt-Virus zeigte einen m⁶A-Peak um Position 1100, wobei die ermittelte Peakspitze nur 6 nt von dem GGACT-Motiv entfernt lag. Hierbei handelte es sich um das 2. GGACT-Motiv der HA-mRNA, dessen Mutation sich negativ auf die Replikationsfähigkeit des PR8-Virus auswirkte (s. Abschnitt 4.5). Interessanterweise konnte dieser Peak in der mRNA des

Virus HA_{mut1-4} nicht detektiert werden. In der HA-mRNA des Virus HA_{mut1-4} konnte dagegen ein Peak an Position 6461 identifiziert werden, der in der mRNA des wt-Virus nicht auftrat. Abbildung 4.20 zeigt zwar, dass dieser Peak auch in der wt-Probe andeutungsweise erkennbar war, die Anreicherung gegenüber der Inputkontrolle lag jedoch unter zwei, sodass die statistischen Kriterien für die Identifikation eines m⁶A-Motivs nicht erfüllt waren. Die Peaks in der 3'- und 5'-Region des Virus HA_{mut1-4} waren dagegen im Vergleich zum wt-Virus stark reduziert, sodass der 3'-Peak in der HA_{mut1-4}-Probe nicht mehr als solcher identifiziert werden konnte.

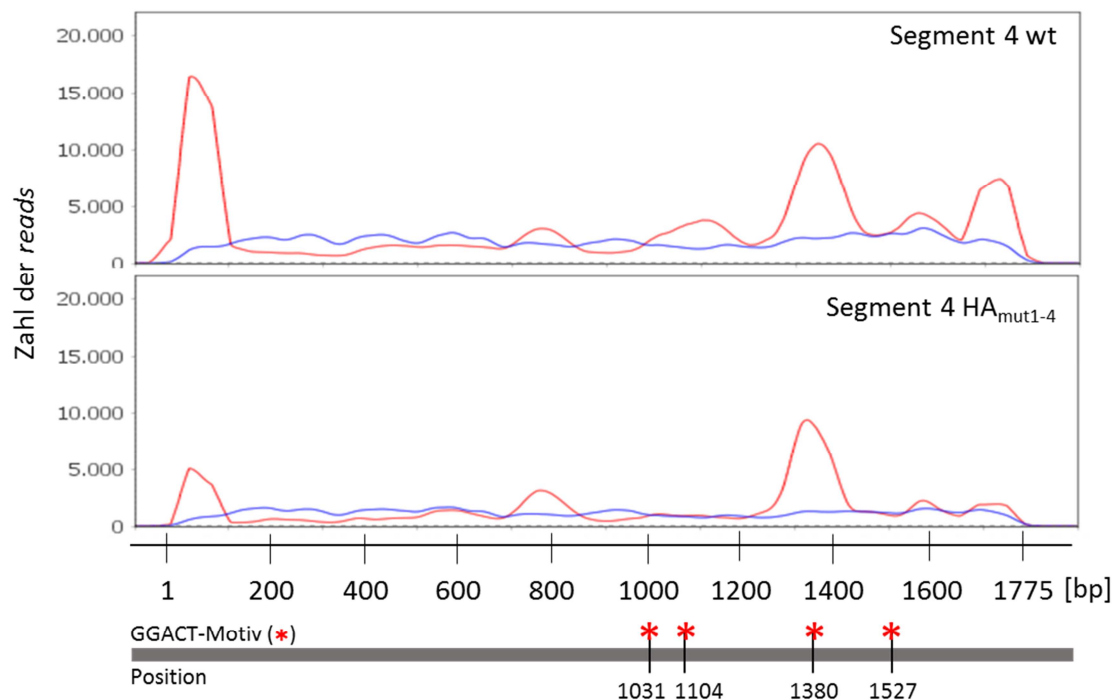


Abbildung 4.20: Vergleich der detektierten m⁶A-Positionen in den mRNAs des HA-Segments vom wt-Virus und dem Virus HA_{mut1-4}. Die Grafik zeigt die Überlagerung der Sequenziertracks der HA-mRNA von der IP-Probe (rot) und der Inputkontrolle (blau), jeweils bei der Sequenzierung der wt-Proben (oben) und der HA_{mut1-4}-Proben (unten). Die Skala der x-Achse bezieht sich hierbei auf die Basenpaarposition innerhalb der HA-mRNA. GGACT-Motive sind als rote Sternchen dargestellt, die Zahl darunter bezieht sich auf die Position des Motivs.

Zusammenfassend konnten in den mRNAs von NS, M, NA, NP und HA eindeutige m⁶A-Peaks identifiziert werden, insbesondere in den 5'- und 3'-Regionen der viralen mRNAs. Unterschiede zwischen dem wt-Virus und dem Virus HA_{mut1-4}, welches Mutationen an allen vier GGACT-Motiven aufwies, zeigten sich in den Segmenten für NA, NP und HA. An dem 2. GGACT-Motiv in der HA-mRNA konnte beim wt-Virus eine m⁶A-Modifikation identifiziert werden, die bei dem Virus HA_{mut1-4} fehlte. Damit ist gezeigt, dass die Mutation des Motivs von GGACT zu GGACG die Methylierung an dieser Position verhinderte und das Virus HA_{mut1-4} an dieser Position keine Methylierung mehr aufweist. An den anderen GGACT-Motiven der HA-mRNA sowie in den GGACT-Motiven der NS- und NA-mRNAs, konnten keine m⁶A-Peaks identifiziert werden.

Segm.	wt				HA _{mut1-4}			
	Pos.	Fold	Seq.	Entf.	Pos.	Fold	Seq.	Entf.
NS	31	6,21	16-45: ACAAAAACATAATGGATCCAA ACACTGTGT	6 nt	23	3,71	16-45: ACAAAAACATAATGGATCC AAACTGTGT	1 nt
	849	3,12	837-880: AAGAACTTTCTCGTTTCAGCTT ATTTAGTACTAAAAACACCC T	8 nt	854	3,77	837-880: AAGAACTTTCTCGTTTCAGC TTATTTAGTACTAAAAACA CCCT	13 nt
M	1122	7,14	1-51: AGCAAAAGCAGGTAGATATT GAAAGATGAGTCTTCTAACCG AGGTCGAAAC	6 nt	1116	4,92	1-51: AGCAAAAGCAGGTAGATAT TGAAAGATGAGTCTTCTAAC CGAGGTCGAAAC	12 nt
NA	2348	5,81	1-48: AGCAAAAGCAGGAGTTTAAA ATGAATCCAATCAGAAAATA ATAACCA	14 nt	2343	6,26	1-48: AGCAAAAGCAGGAGTTTAA AATGAATCCAATCAGAAA ATAATAACCA	19 nt
					3019	2,96	616-708: AAACCATAAAAAGTTGGAG GAAGAAAATATTGAGGACA CAAGAGTCTGAATGTGCCT GTGTAATGGTTCATGTTTT ACTATAATGACTGATG	0 nt
					3453	2,56	1115-1158: GACAGAGACTGATAGTAAG TTCTCTGTGAGGCAAGATGT TGTGG	14 nt
NP	3964	14,46	1-45: AGCAAAAGCAGGGTAGATAA TCACTCACTGAGTGACATCAA AATC	1 nt	3951	4,48	1-45: AGCAAAAGCAGGGTAGATA ATCACTCACTGAGTGACATC AAAATC	15 nt
	4604	2,19	623-679: TGGTCAGAATGATCAAACGTG GGATCAATGATCGGAACTTCT GGAGGGGTGAGAATG	15 nt				
	5457	3,13	1493-1539: ATGAAGGATCTTATTTCTCG GAGACAATGCAGAGGAGTAC GACAAT	10 nt				
HA	5718	13,61	1-46: AGCAAAAGCAGGGGAAAATA AAACAACCAAAATGAAGGC AAACCT	1 nt	5716	8,87	1-46: AGCAAAAGCAGGGGAAAAT AAACAACCAAAATGAAG GCAACCT	3 nt
					6461	2,98	735-787: AAAGTAAGAGATCAAGCTG GGAGGATGAACTTTACTG GACCTTGCTAAAACC	19 nt
	6804	2,97	1078-1123: TTGCCGTTTTATTGAAGGGG GATGGACTGGATGATAGAT GGATG	6 nt				
	7048	4,87	1299-1364: TTAAATAAAAAAGTTGATGAT GGATTTCTGGACATTTGGACA TATAATGCAGAAATGTTAGTT CTA	15 nt	7027	7,25	1299-1364: TTAAATAAAAAAGTTGATGA TGGATTTCTGGACATTTGGA CATATAATGCAGAAATGTTA GTTCTA	2 nt
	7434	4,26	1707-1772: TTGCAGTGCAGAATATGCATC TGAGATTAGAAATTCAGAGAT ATGAGGAAAACACCCITGTT TCT	20 nt				

PA					9823	2,86	2130-2221: TAATGCTTCTTGGTCAACT CCTTCCTTACACATGCATTG AGTTAGTTGGCAGTGCTA CTATTTGCTATCCATACTGTC CAAAAAAGTAC	91 nt
PB1					12421	2,67	2257-2340: AAATAGTGAATTTAGCTTGT CCTTCATGAAAAATGCCTT GTTTCTAC	112 nt
PB2					12666	2,93	1-47: AGCGAAAGCAGGTCAATTA TATCAATATGGAAAGAATA AAAGAACT	23 nt

Tabelle 4: Tabellarische Darstellung der m⁶A-Peakpositionen und der Sequenzen unter den Peaks. Die Sequenzen unter den in Abbildung 4.19 gezeigten m⁶A-Peaks wurden mithilfe des Programms IGV extrahiert und tabellarisch mit ihren Positionen aufgelistet. Die Zahlen über den Sequenzen repräsentieren die Position der Sequenz innerhalb des jeweiligen Influenzasegments. Segm.: Name des Segments, Pos.: Position der Peakspitze im zusammengefassten PR8-Genom, Fold: n-fache Anreicherung im Vergleich zur Input-KO, Entf.: Entfernung der ermittelten Peakspitze (rot) zum nächsten Konsensusmotiv (unterstrichen).

4.7 Einfluss der Influenzainfektion auf die m⁶A-assozierten Proteine in verschiedenen Zelllinien

Eine Influenzainfektion induziert eine Stressantwort in infizierten Zellen, was unter anderem zu einer verstärkten Expression des Hitzeschockproteins Hsp70 führt (Halder *et al.* 2011). Zhou *et al.* (2015) konnten außerdem zeigen, dass murine embryonale Fibroblasten sowie HeLa-Zellen im Rahmen einer Stressantwort, ausgelöst durch einen Hitzeschock, die mRNA- und Proteinlevel des m⁶A-reader-Proteins YTHDF2 hochregulieren, was zu einer selektiven m⁶A-Modifikation bestimmter RNAs führt und deren Translation verstärkt. Daher wurde vermutet, dass auch eine Influenzainfektion die Expression der an der m⁶A-Maschinerie beteiligten Enzyme beeinflusst. Die Regulation bestimmter Enzyme während einer Influenzainfektion könnte außerdem Hinweise geben, welche Rolle m⁶A während der Virusinfektion spielt und welche Enzyme an diesen Prozessen beteiligt sind. Ob die Infektion sich auf die Expression der Enzyme auswirkt, sollte zunächst auf mRNA-Ebene untersucht werden. Dabei sollte die Expression der mRNAs der beiden Methyltransferasen METTL3 und METTL14, der beiden Demethylasen FTO und AlkBH5 und der beiden reader-Proteine YTHDF1 und YTHDF2 untersucht werden.

Dafür wurden CaCo2-Zellen mit 2 MOI des wt-PR8-Virus infiziert und unbehandelte Zellen als Kontrolle mitgeführt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mithilfe einer qPCR mit genspezifischen Primern und anschließender Berechnung nach der $\Delta\Delta C(t)$ -Methode wurde die mRNA-Expression quantifiziert. In allen Experimenten wurde für die Normierung eine GAPDH-

PCR mitgeführt. Abbildung 4.21 A zeigt die auf GAPDH normierte n-fache Expression der jeweiligen mRNA im Vergleich zu nicht-infizierten CaCo2-Zellen zu dem jeweiligen Infektionszeitpunkt. Die Expression der Methyltransferasen METTL3 und METTL14, sowie der Demethylase AlkBH5 veränderte sich während der Virusinfektion kaum. Auch die mRNA des *reader*-Proteins YTHDF1 zeigte in den CaCo2-Zellen keine veränderte Expression. Die Menge der mRNA der Demethylase FTO hingegen war 6 h, 12 h und 24 h nach der Infektion im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen um die Hälfte reduziert. Die mRNA von YTHDF2 zeigte 24 h nach der Infektion mit dem Influenzavirus in den CaCo2-Zellen eine 2,5-mal stärkere Expression als in nicht-infizierten Zellen.

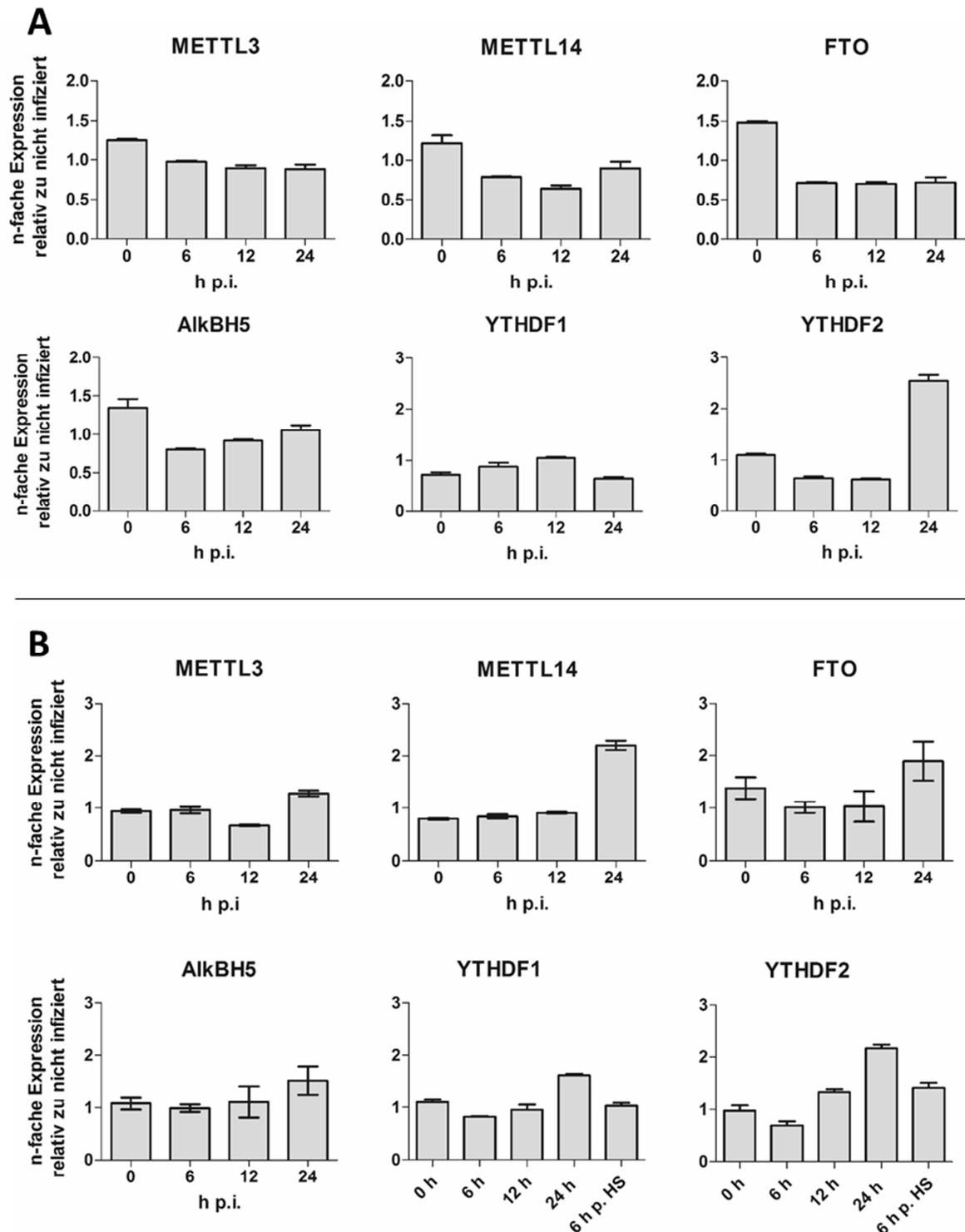


Abbildung 4.21: Quantifizierung der mRNAs von METTL3, METTL14, FTO, AlkBH5, YTHDF1 und YTHDF2 in A549- und CaCo2-Zellen während einer Influenzainfektion. CaCo2-Zellen (A) und A549-Zellen (B) wurden mit 2 MOI des PR8-Virus infiziert. A549-Zellen wurden zusätzlich für 1 h einem Hitzeschock unterzogen und danach weitere 6 h inkubiert (6 h p. HS). Unbehandelte Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die RNA der Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Analyse erfolgte durch qPCR mit zwei Replikaten und anschließender Quantifizierung mithilfe der $\Delta\Delta C(t)$ -Methode. Dargestellt ist die auf GAPDH normierte n-fache Expression im Vergleich zu nicht infizierten Zellen zu dem jeweiligen Zeitpunkt. Die Experimente in A549-Zellen wurden einmal durchgeführt, für die CaCo2-Zellen ist ein repräsentatives Experiment aus zwei bzw. drei (YTHDF2) unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen gezeigt.

Da in der Publikation von Halder *et al.* (2011) für die Induktion einer Stressantwort nach Infektion mit Influenzaviren A549-Zellen verwendet wurden, sollten die qPCR-Ergebnisse in diesen Zellen verifiziert werden. Dafür wurden auch die A549-Zellen mit 2 MOI des PR8-Virus infiziert und unbehandelte Zellen als Kontrolle mitgeführt. Um zu untersuchen, ob die Induktion eines Hitzeschocks, wie von Zhou *et al.* (2015) gezeigt, zu einer Hochregulation der YTHDF2-mRNA führt, wurden A549-Zellen für 1 h bei 42°C und anschließend für weitere 6 h bei 37°C bis zur RNA-Isolation inkubiert. Diese Probe wurde nur in den YTHDF-qPCRs mitgeführt. Auch in den A549-Zellen blieb die mRNA-Expression der Methyltransferase METTL3, der Demethylase AlkBH5 und des *reader*-Proteins YTHDF1 im Verlauf der Infektion konstant. Abweichend zu den CaCo2-Zellen konnte jedoch für METTL14 24 h nach der Infektion eine mehr als doppelt so hohe mRNA-Expression im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen gemessen werden. Die zuvor in CaCo2-Zellen beobachtete, reduzierte mRNA-Expression von FTO nach der Infektion konnte in A549-Zellen nicht bestätigt werden. In den A549-Zellen zeigte die FTO-mRNA nach 6 h und 12 h eine unveränderte Expression im Vergleich zu nicht infizierten Zellen und war nach 24 h sogar leicht erhöht. Die mRNA von YTHDF2 zeigte jedoch, wie in den CaCo2-Zellen, 24 h nach der Infektion eine ca. 2,2-mal stärkere Expression als in nicht-infizierten Zellen. Die von Zhou *et al.* gezeigte Hochregulation der YTHDF2-mRNA durch einen Hitzeschock konnte in den A549-Zellen nicht bestätigt werden. Auch in primären humanen Zellen (Vorhautfibroblasten) konnte kein Effekt des Hitzeschocks auf die YTHDF-mRNA-Expression beobachtet werden, wobei die durch die Influenzainfektion induzierte Hochregulation der YTHDF2-mRNA auch in diesen Zellen bestätigt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Infektion mit Influenzaviren in CaCo2- und A549-Zellen zu keiner eindeutigen Regulation der verschiedenen Methyltransferasen und Demethylasen auf mRNA-Ebene führte. Lediglich die mRNA von YTHDF2 zeigte 24 h nach der Infektion mit Influenza eine leicht verstärkte Expression in beiden Zelllinien.

Um zu untersuchen, ob die Hochregulation der YTHDF2-mRNA im Rahmen der antiviralen Antwort stattfindet und auch durch eine Stimulation mit IFN α induziert werden kann, wurden A549-Zellen zum Zeitpunkt 0 mit IFN α behandelt und die RNA zu verschiedenen Zeitpunkten isoliert. Ebenso wurde mit unbehandelten Zellen verfahren. Die mRNA-Expression von YTHDF2 wurde ebenfalls durch qPCR quantifiziert. Eine Veränderung der YTHDF2-mRNA-Expression durch die Behandlung mit IFN α konnte jedoch nicht beobachtet werden (s. Abbildung 4.22 A). Dass IFN α generell in der Lage ist, einen Effekt in der Zelle zu induzieren, wurde durch die Messung der IFIT1-

Expression kontrolliert (s. Abbildung 4.22 B). Die IFN α -Behandlung führte in A549-Zellen nach 14 h zu einer mehr als 400-mal stärkeren Expression der IFIT1-mRNA im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Damit ist gezeigt, dass das IFN α in den A549-Zellen, wie erwartet, eine antivirale Antwort induziert, dass dabei jedoch keine Hochregulation der YTHDF2-mRNA stattfindet.

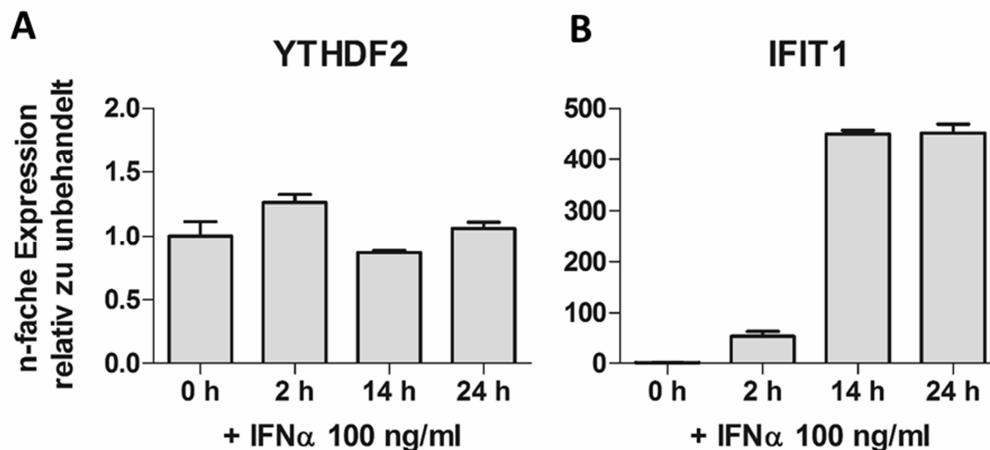


Abbildung 4.22: Quantifizierung der YTHDF2- und IFIT1-mRNA in IFN-behandelten A549-Zellen. A549-Zellen wurden zum Zeitpunkt 0 mit 100 ng/ml IFN α behandelt. Unbehandelte Zellen wurden als Referenz mitgeführt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Analyse erfolgte durch qPCR und anschließender Quantifizierung mithilfe der $\Delta\Delta C(t)$ -Methode. Dargestellt ist die auf GAPDH normierte n-fache Expression im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen zu dem jeweiligen Zeitpunkt als Mittelwerte aus Doppelbestimmungen. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

4.7.1 *Knockout* und Proteinexpression von YTHDF2 in Zelllinien

Da in den qPCR-Analysen eine erhöhte Expression der YTHDF2-mRNA infolge einer Influenzainfektion beobachtet werden konnte, sollte im Folgenden die Rolle des YTHDF2-Proteins bei einer Influenzainfektion näher untersucht werden. Dafür wurde zunächst die Expression des Proteins in CaCo2-Zellen durch Western Blot überprüft. Dabei waren mit dem verwendeten Antikörper mehrere Banden im zu erwartenden Größenbereich detektierbar, jedoch konnte keine genaue Zuordnung der Banden zu den zwei bekannten Isoformen des YTHDF2-Proteins (62 und 57 kDa) erfolgen (Daten nicht gezeigt). Um zu klären, welche Banden den YTHDF2-Isoformen entsprechen, sollte ein *knockout* des Proteins in CaCo2-Zellen durchgeführt werden. Dafür wurde die CRISPR/Cas9-Methode angewendet, wobei zwei verschiedene *guide*-RNAs eingesetzt wurden. Der Genotyp der selektierten Einzelzellklone wurde mithilfe von DNA-Sequenzanalysen untersucht. Dabei konnten ein wt-Klon (2.5), ein homozygoter *knockout* für die Isoform 1 (1.6), ein homozygoter *knockout* für beide Isoformen (2.2) und ein heterozygoter *knockout* für die Isoform 1 (1.5) identifiziert werden. Aufgrund von alternativem Spleißen sollten die Klone 1.6 und 1.5 die verkürzte Isoform 2 des

YTHDF2-Proteins normal exprimieren, Klon 2.2 sollte dagegen keine der beiden Isoformen exprimieren. Im Folgenden sollte der Genotyp der Zellklone anhand der YTHDF2-Proteinexpression verifiziert werden.

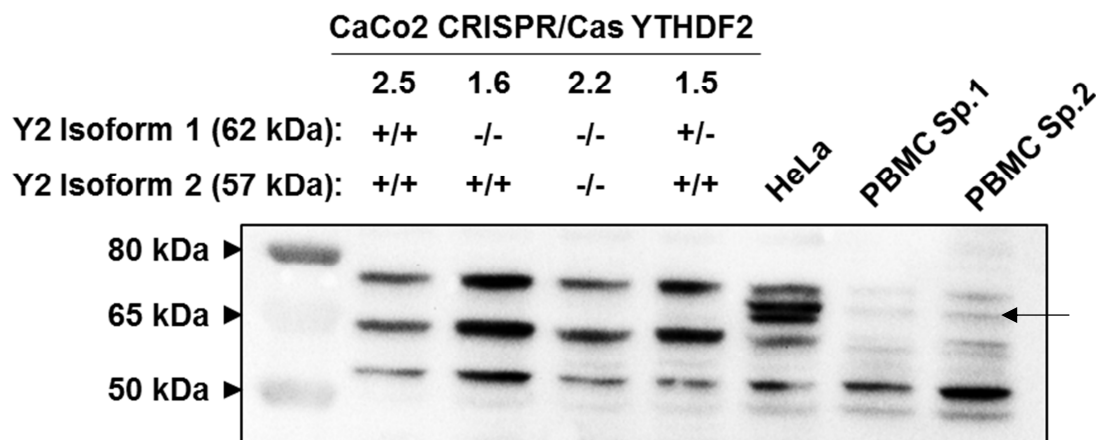


Abbildung 4.23: YTHDF2-Expression in den CaCo2 YTHDF2-CRISPR-Cas-Zellen im Vergleich mit HeLa-Zellen und humanen PBMCs. Die verschiedenen Zellen wurden in RIPA-Puffer lysiert und je 10 µg Gesamtprotein durch SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis von YTHDF2 erfolgte durch Western Blot. Oberhalb des Blots ist der anhand der Sequenzierung ermittelte Genotyp der Zellklone für beide Isoformen von YTHDF2 (Y2) gezeigt: +/+ : Wildtyp, +/- : heterozygoter *knockout*, -/- : homozygoter *knockout*. Pfeil rechts: Isoformen von YTHDF2. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Versuchen.

Im Western Blot zeigten sich jedoch keine Unterschiede im Bandenmuster zwischen den verschiedenen Zellklonen (s. Abbildung 4.23). Als Kontrolle wurden in diesem Blot HeLa-Zellen mitgeführt, da diese vom Hersteller des YTHDF2-Antikörpers positiv für YTHDF2 beschrieben wurden. Zusätzlich wurden PBMCs als primäre humane Zellen mitgeführt. Die HeLa-Zellen zeigten dabei eine deutlich ausgeprägte Doppelbande zwischen 80 und 65 kDa (s. Abbildung 4.23, roter Pfeil), welche in den CaCo2-Zellen nicht und in den PBMCs nur gering nachweisbar war. Aufgrund des unveränderten Bandenmusters bei den CRISPR/Cas-Zellklonen und des geringen Größenunterschieds zwischen den zwei Isoformen, wurde geschlussfolgert, dass es sich hierbei um die beiden Isoformen von YTHDF2 handelt. Demnach liegt die Menge des in CaCo2-Zellen exprimierten YTHDF2-Proteins entweder unterhalb der Nachweisgrenze des Western Blots oder das Protein wird in den Zellen nicht exprimiert. Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde die YTHDF2-Expression in weiteren Zelllinien analysiert.

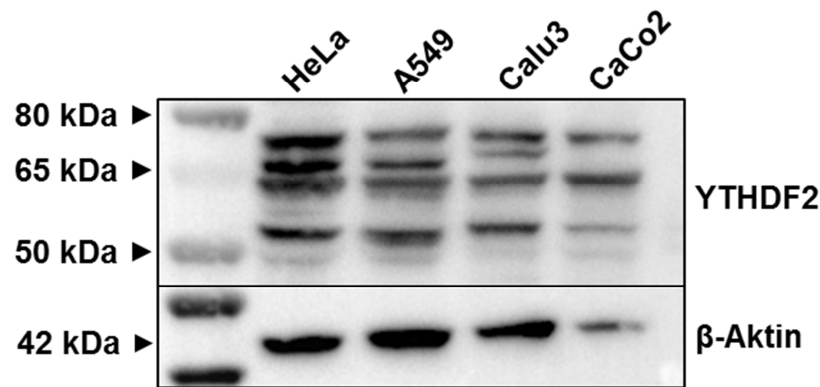


Abbildung 4.24: YTHDF2-Expression in verschiedenen humanen Zelllinien. Die verschiedenen Zelllinien wurden in RIPA-Puffer lysiert und je 20 µg Gesamtprotein per SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis von YTHDF2 und β -Aktin als Ladekontrolle erfolgte durch Western Blot. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus zwei unabhängigen Versuchen.

Dabei konnte das Protein in A549-Zellen und in geringem Maße auch in Calu3-Zellen nachgewiesen werden (s. Abbildung 4.24). Wie in dem vorherigen Experiment konnte YTHDF2 auch in den HeLa-Zellen, nicht jedoch in den CaCo2-Zellen detektiert werden. Sowohl in den HeLa-Zellen als auch in den A549- und Calu3-Zellen zeigte sich bei diesem Experiment jedoch keine Doppelbande von YTHDF2, sondern nur eine einzelne Bande, die sich in der Größe zwischen den Zelllinien leicht unterschied.

Da die CaCo2-Zellen eine Hochregulation der YTHDF2-mRNA als Antwort auf eine Influenzainfektion gezeigt hatten, sollte im nächsten Experiment untersucht werden, ob eine Influenzainfektion eine Erhöhung der Proteinexpression bewirkt. Dafür wurden CaCo2-Zellen mit 2 MOI des PR8-Virus infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit RIPA-Puffer lysiert und durch Western Blot auf ihre YTHDF2-Expression untersucht. Dabei konnte zu keinem Zeitpunkt eine Expression des YTHDF2-Proteins nachgewiesen werden (s. Abbildung 4.25 A).

Auch in Calu3-Zellen konnte durch eine Influenzainfektion keine wesentliche Erhöhung der Proteinexpression von YTHDF2 beobachtet werden (s. Abbildung 4.25 B), ebenso wenig in A549-Zellen (Daten nicht gezeigt). Die in den qPCR-Versuchen beobachtete Erhöhung der YTHDF2-mRNA-Expression als Antwort auf eine Influenzainfektion geht daher nicht mit einer erhöhten Proteinexpression einher.

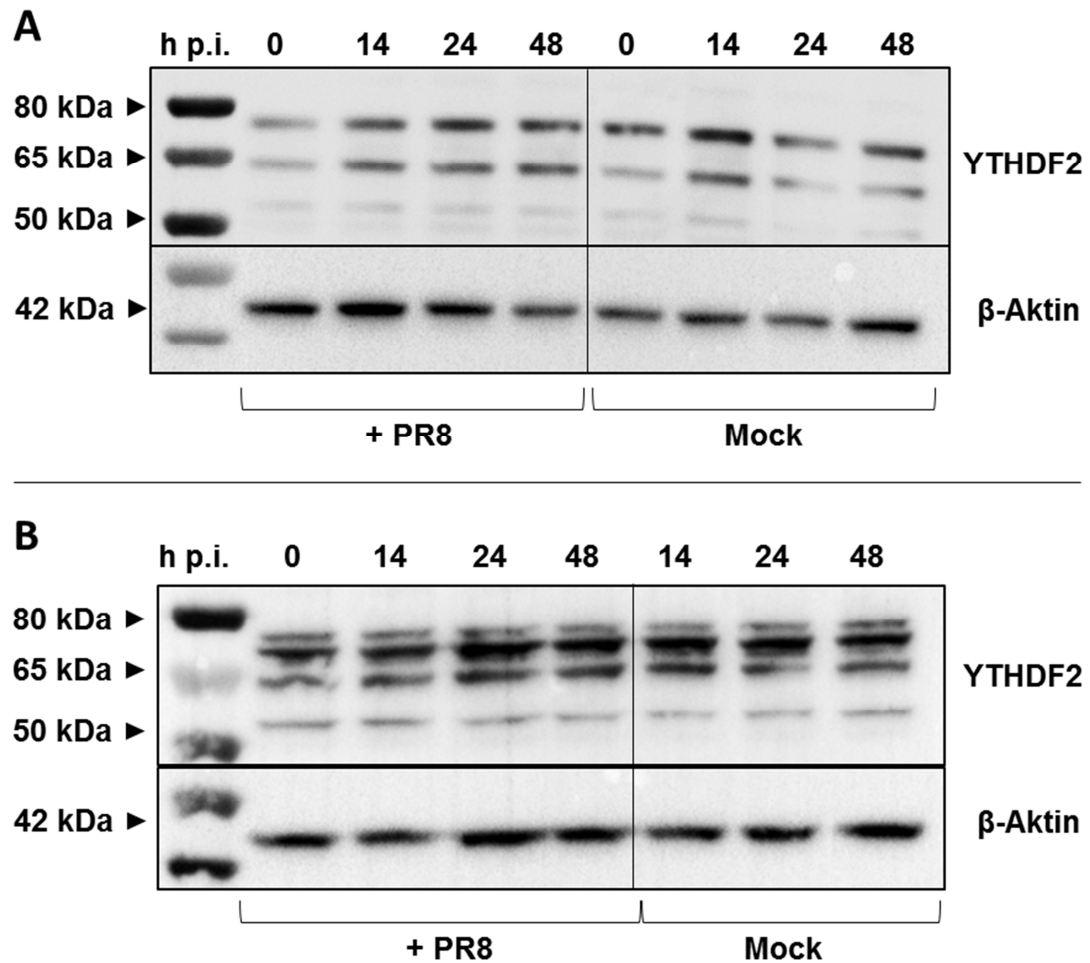


Abbildung 4.25: YTHDF2-Expression von Influenza-infizierten CaCo2- und Calu3-Zellen. CaCo2- (A) und Calu3-Zellen (B) wurden mit 2 MOI des PR8-Virus infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten in RIPA-Puffer lysiert. Je 20 µg Gesamtprotein wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis von YTHDF2 und β-Aktin als Ladekontrolle erfolgte durch Western Blot. Calu3, 0 h Mock: ND. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss von m⁶A auf die Pathogenität von Influenzaviren untersucht werden. Die N6-Methylierung von Adenosin ist die am häufigsten vorkommende Modifikation in eukaryotischer mRNA und ist evolutionär konserviert, da sie in nahezu allen Organismen zu finden ist. Auch in viraler mRNA konnte m⁶A bereits detektiert werden, unter anderem in der mRNA von Influenzaviren, Adenoviren und RSV (Kane und Beemon 1985; Krug *et al.* 1976; Narayan *et al.* 1987; Sommer *et al.* 1976). Die genaue Lokalisation der methylierten Nukleoside konnte mit den damals zur Verfügung stehenden Methoden jedoch nicht bestimmt werden. Auch über die Funktion von m⁶A, sowohl in viraler als auch zellulärer mRNA, war lange Zeit wenig bekannt. Erst durch die Entdeckung der Methyltransferase METTL3 wurde deutlich, dass m⁶A vermutlich wichtige regulatorische Funktionen vermittelt, da der *knockdown* der Methyltransferase zum Zelltod durch Apoptose führt (Bokar *et al.* 1994; Lin *et al.* 2016; Pan 2013). Nach der Entdeckung weiterer Enzyme des Methyltransferasekomplexes, der Demethylasen und m⁶A-*reader*-Proteine konnte in *knockout*-Versuchen die Beteiligung dieser Enzyme an Schritten des RNA-Metabolismus gezeigt werden, darunter Translation, RNA-Metabolismus und Spleißen. Dies legt eine Rolle von m⁶A bei der Regulation der Translation nahe. Über den unmittelbaren Einfluss bestimmter m⁶A-Modifikationen ist jedoch bislang wenig bekannt. Welche Rolle m⁶A in der mRNA von Influenzaviren spielt, ist ebenfalls unklar. Um die Funktion von m⁶A in der viralen mRNA von Influenzaviren zu untersuchen, sollten in dieser Arbeit zunächst alle N6-methylierten Adenosine in der viralen mRNA des humanpathogenen Influenzastamm A/Puerto Rico/8/1934 H1N1 (PR8) lokalisiert werden. Dieser Stamm wurde aufgrund seiner guten Charakterisierung durch die langjährige Verwendung in Infektionsstudien und seiner effizienten Replikation in Zelllinien und Hühnereiern ausgewählt. Da m⁶A in früheren Studien nur in der mRNA von Influenzaviren gefunden wurde (Narayan *et al.* 1987), wurde in dieser Arbeit die Rolle von m⁶A ausschließlich im Kontext der viralen mRNA untersucht.

5.1 Untersuchung des Einflusses von m⁶A auf die Replikation von Influenzaviren durch Mutation des GGACT-Motivs in der viralen mRNA

5.1.1 Der erste Versuch der Lokalisation von m⁶A durch MeRIP-Seq

Für die Lokalisation von m⁶A wurde eine im Jahr 2012 publizierte Methode angewendet, durch welche methylierte Fragmente zellulärer RNA mithilfe eines m⁶A-spezifischen Antikörpers in einer Immunpräzipitation (IP) angereichert werden und anschließend durch *next generation sequencing* (NGS) sequenziert werden (abgekürzt: MeRIP-Seq) (Dominissini *et al.* 2012; Meyer *et al.* 2012). Wie in Abschnitt 4.1 beschrieben, waren jedoch sowohl die mRNAs der Influenzaviren als auch zelluläre mRNAs durch die *reads* des NGS sehr ungleichmäßig abgedeckt, sodass sich aus den Ergebnissen keine Informationen über die Lokalisation von m⁶A in der Influenza-mRNA ableiten ließen. Einen Grund dafür kann die Präsenz von restlicher rRNA in der Probe darstellen. Auch rRNA ist durch m⁶A modifiziert und macht bis zu 90% der Gesamt-RNA aus (Machnicka *et al.* 2013). Eine nicht ausreichende Entfernung der rRNA vor der IP kann dazu geführt haben, dass nur ein kleiner Teil der während der IP angereicherten m⁶A-haltigen Fragmente aus mRNA stammten. Diese Annahme wird durch spätere Analysen von angereicherter mRNA im Vergleich zu gesamt-RNA mithilfe des Bioanalyzers unterstützt, die zeigten, dass eine einzige Anreicherung mit Oligo-(dT)-Beads den Anteil an rRNA kaum reduzierte (s. Abbildung 4.18).

5.1.2 Generierung rekombinanter Viren mit fehlender N6-Adenosinmethylierung in viraler mRNA

Um den Einfluss von m⁶A auf die virale Replikation auch ohne die Informationen zur Lokalisation der methylierten Adenosine untersuchen zu können, wurden rekombinante Influenzaviren hergestellt, deren mRNAs von HA, NA und NS Mutationen in den m⁶A-Konsensussequenzen trugen. Die N6-Methylierung von Adenosin in der viralen mRNA während der Infektion sollte dadurch verhindert werden. Die Stellen für die Mutationen wurden anhand der Daten aus verschiedenen Publikationen ausgewählt. Bereits 1985 konnten Kane und Beemon durch die Analyse eines Teils der genomischen RSV-RNA zeigen, dass m⁶A besonders häufig innerhalb der Konsensussequenz RGACT auftritt (Kane und Beemon 1985). Diese konnte in späteren NGS-Analysen auf die Konsensussequenz [G/A/T][G>A]m⁶AC[T>A>C] erweitert werden (Dominissini *et al.* 2012; Meyer *et al.* 2012). Auch bei der Identifikation der RNA-Bindestellen der Methyltransferasen METTL3 und METTL14 wurde dieses Sequenzmotiv bestätigt. Der

Komplex aus METTL3 und METTL14 zeigte dabei in *in vitro* Methylierungsassays eine deutliche Präferenz für RNA mit dem Motiv GGACT im Vergleich zu RNA mit dem Motiv GGATT (Liu *et al.* 2014). Das Motiv GGACT stellt damit das am häufigsten durch m⁶A modifizierte Motiv dar. Da das erweiterte Konsensusmotiv 18 mögliche Kombinationsmöglichkeiten beinhaltet und damit statistisch alle 57 Nukleotide vorkommt, die m⁶A-Modifikation jedoch durchschnittlich nur ein- bis fünfmal pro mRNA-Molekül (Meyer *et al.* 2012), wird deutlich, dass nicht jedes Konsensusmotiv methyliert wird. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass der Methylierungsstatus der m⁶A-Motive stark variieren kann. Von manchen mRNAs werden nur 6% an einem bestimmten Motiv modifiziert, während andere mRNAs mit einer Häufigkeit von 80% an einer bestimmten Stelle eine m⁶A-Modifikation tragen (Liu *et al.* 2013). Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, durch Mutation eine oder mehrere m⁶A-Modifikationen der mRNA zu verhindern, wurden daher alle GGACT-Motive in den NS-, NA- und HA-mRNAs jeweils gleichzeitig mutiert (s. Abbildung 4.4). Dabei wurde das Motiv in der Influenza-mRNA so verändert, dass es die Kriterien für die Konsensussequenz nicht mehr erfüllt, gleichzeitig jedoch, mit Ausnahme des NS-Proteins (s. 4.3), kein Aminosäureaustausch im Protein stattfindet. Mithilfe des Online-Tools SRAMP kann die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer m⁶A-Modifikation in einer RNA-Sequenz in Säugetierzellen vorhergesagt werden (Zhou *et al.* 2016). Dabei wird der Sequenzkontext berücksichtigt und mit den Daten aus hochaufgelösten, transkriptomweiten m⁶A-Kartierungen abgeglichen. Anhand dieses Vergleichs wird die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von m⁶A an bestimmten Stellen einer mRNA berechnet. Alle GGACT-Motive in den wt-mRNAs von NS, NA und HA wiesen eine moderate (Position 1 im NA-Segment), eine hohe (Position 2 im NS-, Position 3 im NA- und Position 1, 2, und 4 im HA-Segment) oder eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit (Position 1 im NS-, Position 2 im NA- und Position 3 im HA-Segment) für eine m⁶A-Modifikation auf (Daten nicht gezeigt). Dies bestätigte die hohe Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer m⁶A-Modifikation an den ausgewählten Positionen in der mRNA von NS, NA und HA. An den entsprechenden mutierten Motiven wurde hingegen, wie erwartet, keine N6-Methylierung von Adenosin vorhergesagt.

5.1.3 Konservierung der m⁶A-Sequenzmotive in verschiedenen Influenzastämmen

Anhand von Sequenzvergleichen zwischen humanpathogenen H1N1-Viren konnte nachgewiesen werden, dass zwar nicht alle Viren an den in Abbildung 4.4 gezeigten Positionen ein GGACT-Motiv aufwiesen, dass das erweiterte Motiv [G/A/T][G>A]m⁶AC[T>A>C] an diesen Stellen jedoch überdurchschnittlich oft vorkam.

Ein Sequenzmotiv von 5 Basen beinhaltet 1024 Kombinationsmöglichkeiten, von denen nur 18 auf das Konsensusmotiv entfallen. Trotzdem wurde in mehr als 99% der Influenzasequenzen an diesen Stellen ein m⁶A-Motiv identifiziert (s. Tabelle 2). Lediglich an der Position 1 der NA-mRNA konnte das m⁶A-Motiv nur in 0,1% der Sequenzen nachgewiesen werden. Wurden nur die Influenzasequenzen berücksichtigt, welche an den untersuchten Positionen für die gleichen Aminosäuren wie das PR8-Virus codierten, konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die m⁶A-Motive unter allen möglichen Sequenzkombinationen häufiger auftraten als es der Wahrscheinlichkeit nach zu erwarten gewesen wäre (s. Tabelle 3). An der Position 1 der HA-mRNA, an Position 1 der NA-mRNA und an Position 2 der NS-mRNA lag die statistische Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines m⁶A-Motivs unter allen synonymen Sequenzkombinationen beispielsweise bei 17% (24/4). Trotzdem wurde das Motiv in 99,8% der Influenzasequenzen an Position 1 im HA-Segment, bei 50 % an Position 1 im NA-Segment und bei 99,5% an Position 2 im NS-Segment gefunden. Zwar werden nicht alle Varianten des m⁶A-Motivs mit der gleichen Wahrscheinlichkeit methyliert, dennoch legt das Ergebnis dieser Analyse nahe, dass das Auftreten eines m⁶A-Motivs an diesen Positionen einen evolutionären Vorteil für die Viren darstellt. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass die Wahrscheinlichkeit eines bestimmten Sequenzmotivs auch durch weitere Faktoren beeinflusst werden kann. Beispielsweise werden nicht alle tRNAs in der Zelle gleich stark exprimiert, was dazu führt, dass bestimmte Codons für eine Aminosäure häufiger verwendet werden als andere (Kanaya *et al.* 2001). Auch kann die Sequenz Einfluss auf die Sekundär- und Tertiärstruktur der mRNA nehmen und so neben der Stabilität auch Prozesse wie die Translationsinitiation oder die Effizienz des Spleißens beeinflussen (Nemeroff *et al.* 1992). In Regionen, in denen die Sekundärstruktur der RNA wichtige Funktionen vermittelt, kann die Verwendung alternativer Codons daher eingeschränkt sein. Dies könnte auch erklären, warum an bestimmten Stellen m⁶A-Motive nicht durch andere, synonyme Sequenzen ersetzt werden. Moss *et al.* (2011) konnten solche Regionen in den mRNAs verschiedener Influenzasegmente identifizieren. So wird beispielsweise die Verwendung synonymer Codons ab der Position 487 in der NS-mRNA aufgrund der Überlappung mit dem ORF des NS2-Proteins unterdrückt. Dies kann die in Tabelle 2 gezeigte, geringe Variabilität der Sequenzmotive an der Position 2 in der NS-mRNA erklären und bestätigt die Beobachtung, dass es bei der Mutation des GGACT-Motivs an dieser Position nicht möglich war, ein alternatives Codon zu finden ohne eine Aminosäureveränderung im NS1- oder NS2-Protein zu induzieren. Für die NA-mRNA wurde eine starke Unterdrückung der Verwendung synonymer Codons in der Region von Position 100 bis 250 beschrieben (Moss *et al.* 2011). In dieser Region liegt jedoch keins der

untersuchten GGACT-Motive. Die HA-mRNA weist laut Moss *et al.* zwar eine konservierte Strukturregion zwischen Position 961 und 1080 auf, jedoch ohne eine auffällige Unterdrückung synonymen Codons. Die von Moss *et al.* beschriebenen Konservierungen der RNA-Sekundärstruktur und die damit verbundene Unterdrückung synonymen Codons können daher (mit Ausnahme der Position 2 der NS-mRNA) die an den untersuchten Positionen beobachtete Konservierung des m⁶A-Motivs nicht erklären. Die Konservierung des Motivs ist daher weiterhin ein Argument für das Vorliegen einer N6-Methylierung, die an einen evolutionären Vorteil für die Viren gekoppelt ist.

5.1.4 Einfluss der Mutationen in den GGACT-Motiven der viralen mRNAs von NS, NA und HA auf die virale Replikation und Proteinexpression

Aufgrund der evolutionären Konservierung der m⁶A-Motive wurde erwartet, dass sich die Mutationen in den GGACT-Motiven und die damit verbundene Unterbindung der N6-Methylierung negativ auf die virale Replikation auswirken. Ähnliches konnte bereits für HIV gezeigt werden: die Daten von Kennedy *et al.* (2016) deuten darauf hin, dass die Inhibition der N6-Modifikation durch Mutation der Konsensusmotive in der HIV-mRNA die virale mRNA- und Proteinexpression reduziert und damit die virale Replikation negativ beeinflusst.

Zwar wirkten sich die Mutationen der GGACT-Motive in der mRNA von NS und NA in dieser Arbeit nicht auf die Replikationseffizienz der Viren in den untersuchten CaCo2- und Calu3-Zellen aus, jedoch zeigten die Viren mit den Mutationen in der HA-mRNA ein deutlich reduziertes Wachstum im Vergleich zum wt-Virus. In den Wachstumskurven war dieser Unterschied nur gering (s. Abbildung 4.6), wurde aber bei der Doppelinfektion mit dem wt-Virus und der HA-Mutante deutlicher (s. Abbildung 4.7). Der Anteil von HA_{mut1-4} reduzierte sich dabei in CaCo2-Zellen von 40% zum Zeitpunkt der Infektion auf 20% nach 7 Tagen, in Calu3-Zellen von 48% auf 13% innerhalb des gleichen Zeitraums. Ähnliche Ergebnisse konnten mit den Viren [HA/NA]_{mut} und [HA/NA/NS]_{mut} beobachtet werden, bei denen alle GGACT-Motive in der HA- und NA-mRNA bzw. in der HA-, NA- und NS-mRNA mutiert waren. Die zusätzlichen GGACT-Mutationen in den mRNAs von NS und NA führten zu keiner weiteren Reduktion der Replikationseffizienz im Vergleich zu dem Virus HA_{mut1-4}, bei dem nur die HA-mRNA Mutationen aufwies. Ein additiver Effekt der GGACT-Mutationen in den verschiedenen mRNAs lag nicht vor.

Dass die Mutationen in den mRNAs von NS und NA keinen Einfluss auf die virale Replikationseffizienz haben, kann mehrere Gründe haben: zum einen ist es möglich,

dass die virale wt-mRNA an den untersuchten Positionen keine Methylierung aufweist und die Mutationen an diesen Stellen deshalb keine Auswirkungen auf die virale Replikation haben. Zum anderen ist denkbar, dass die Positionen nur zu einem sehr geringen Maße in der Zelle methyliert werden (Liu *et al.* 2013), sodass die durch Mutation der entsprechenden Stelle verursachte Reduktion des m⁶A-Gehalts nur einen geringen Effekt auf die Virusreplikation hat. Möglich ist außerdem, dass der Verlust der Methylierung an der mutierten Position durch die Methylierung eines alternativen m⁶A-Motivs in der Nähe der mutierten Position ausgeglichen wird. Ein solcher Mechanismus wurde jedoch bisher nicht beschrieben, daher ist unklar, inwieweit die exakte Position einer m⁶A-Modifikation für ihre Funktion wichtig ist.

Da bereits bekannt ist, dass m⁶A die Stabilität von mRNA beeinflussen kann (Dominissini *et al.* 2012; Wang *et al.* 2013; Wang *et al.* 2015), wurde mithilfe von qPCR-Analysen untersucht, inwieweit sich die Viren zu bestimmten Zeitpunkten in ihrer viralen mRNA-Expression unterscheiden. Da nur die Viren mit den Mutationen in der HA-mRNA Unterschiede in der Replikation zeigten, wurde dabei nur die HA-mRNA-Expression untersucht und auf die der M-mRNA normiert, deren Expression sich durch die Mutationen in der HA-RNA nicht ändern sollte. Dabei zeigte sich, dass die Viren mit Mutationen in der viralen HA-mRNA nach 6 h und 24 h eine um etwa die Hälfte reduzierte HA-mRNA-Expression aufwiesen (s. Abbildung 4.8). Da die HA-mRNA-Expression auf die der M-mRNA normiert wurde, ist ein Unterschied in der Zahl der Viruspartikel keine Erklärung für diese Reduktion. Vielmehr deuten diese Ergebnisse auf eine verringerte Stabilität oder einen beschleunigten Abbau der mutierten HA-mRNAs hin.

Wang *et al.* (2015) konnten zeigen, dass die Reduktion des m⁶A-Gehalts durch einen *knockdown* von METTL3 zu einer Verringerung der Translationseffizienz der entsprechenden mRNAs führt. Kennedy *et al.* (2016) untersuchten den Einfluss von m⁶A in der mRNA von HIV auf die Translation und konnten ebenfalls nachweisen, dass die m⁶A-Modifikation in der viralen mRNA eine erhöhte Translationsrate bewirkt. Beide Studien deuten darauf hin, dass m⁶A die Translation der modifizierten mRNAs verstärkt. Aufgrund dieser Studien und der bereits beobachteten reduzierten HA-mRNA-Expression wurde vermutet, dass die reduzierte Replikationseffizienz der Viren mit GGACT-Mutationen in der HA-mRNA mit einer verringerten Expression des HA-Proteins einhergeht. Übereinstimmend mit dieser Vermutung zeigten die Viren eine reduzierte HA-Proteinexpression in CaCo2-Zellen im Vergleich zum wt-Virus (s. Abbildung 4.9). Die Expression des NP-Proteins (Daten nicht gezeigt) und die des M-Proteins unterschieden sich hingegen zwischen den Viren nicht. Da die Viren NS_{mut1-2}

und NA_{mut1-3} keine Unterschiede in der Replikationseffizienz aufwiesen, wurde die Expression des NS- bzw. NA-Proteins nicht untersucht.

Eine reduzierte Detektion der viralen Proteine in Lysaten infizierter Zellen kann mehrere Gründe haben: zum einen könnten zu einem bestimmten Zeitpunkt weniger Zellen infiziert sein, zum anderen könnten die infizierten Zellen weniger virale Proteine exprimieren. In diesem Fall spricht die reduzierte HA-Expression zusammen mit der normalen Expression der Virusproteine M und NP dafür, dass die infizierten Zellen weniger HA-Protein exprimieren. Unterschiede in der Anzahl der infizierten Zellen sind nicht unbedingt zu erwarten, da die Zellen mit 2 MOI infiziert wurden und daher bereits zu Beginn alle Zellen infiziert waren. Unterschiede in der Zahl der infizierten Zellen wären erst nach mehreren Replikationszyklen sichtbar, dafür müsste jedoch eine niedrigere MOI-Zahl eingesetzt werden. Dies zeigt, dass die Mutationen in der HA-mRNA direkt zu einer reduzierten Expression des HA-Proteins führen. Ob dafür allein die zuvor gezeigte reduzierte mRNA-Expression verantwortlich ist oder ob dabei eine zusätzlich reduzierte Translationseffizienz eine Rolle spielt, müssen weitere Versuche zeigen.

Da die reduzierte Expression der HA-mRNA und des HA-Proteins mit einer geringeren viralen Replikationseffizienz einhergeht, sind folgende Szenarien denkbar: zum einen könnten aufgrund der geringeren HA-Expression weniger infektiöse Viren aus der Zelle freigesetzt werden, zum anderen könnten die freigesetzten Viren weniger HA-Partikel auf ihrer Oberfläche und damit eine geringere Infektiösität aufweisen. Zwar konnten im HA-Test lediglich an Tag 2 nach der Infektion geringe Unterschiede in der Anzahl der hämagglutinierenden Partikel zwischen den Viren festgestellt werden (s. Abbildung 4.10), jedoch ist der Assay nicht sensitiv genug, um geringe Unterschiede in der Anzahl der HA-Moleküle pro Virus oder der Partikelzahl verlässlich zu zeigen. Die in den dualen Infektionsversuchen beobachtete Verdrängung des Virus HA_{mut1-4} durch das wt-Virus, welche bereits am ersten Tag nach der Infektion deutlich wurde (s. Abbildung 4.7 B), spricht dafür, dass der Verlust von m⁶A direkt zu einer reduzierten Expression und/oder Replikation der viralen HA-mRNA führt, welche eine reduzierte HA-Proteinexpression zur Folge hat, und so letztlich auch die Virusreplikation beeinflusst.

Es ist nicht ausgeschlossen, dass sich die Mutationen in der viralen mRNA auch unabhängig von m⁶A auf die Proteinexpression auswirken können, dennoch stimmt die verringerte Proteinexpression durch die Reduktion des m⁶A-Gehalts in der mRNA mit den Daten von Kennedy *et al.* (2016) und Wang *et al.* (2015) überein. Dies spricht für einen positiven Effekt von m⁶A auf die Replikationseffizienz von Influenzaviren. Allerdings kann erst eine genaue Bestimmung der Lokalisation der m⁶A-Modifikationen

in der viralen mRNA klären, ob die durch die Mutationen in den GGACT-Motiven induzierten Effekte auf die Proteinexpression und Replikation durch einen Verlust von m⁶A an der entsprechenden Stelle hervorgerufen werden.

5.1.5 Die Bedeutung von m⁶A für die immunstimulatorische Aktivität der Viren

Im Rahmen der Charakterisierung der verschiedenen rekombinanten Viren, sollte auch ihre immunstimulatorische Aktivität bestimmt werden. Bei der Erkennung einer Influenzainfektion durch das angeborene Immunsystem sind verschiedene TLRs beteiligt, darunter TLR3 und TLR7 (Guillot *et al.* 2005). TLR7 wird vor allem von pDCs exprimiert, welche als Antwort auf eine Stimulation mit ihren TLR-Liganden große Mengen an IFN freisetzen (Diebold *et al.* 2004; Gilliet *et al.* 2008; Siegal *et al.* 1999). Damit spielen pDCs auch bei der Regulation von Zytokinantworten während einer Influenzainfektion eine wichtige Rolle. So konnte gezeigt werden, dass pDCs und die Aktivierung des TLR7-Signalweges in Mäusen während einer Influenzainfektion protektiv wirken und die Letalität sowie die Virustiter in der Lunge senken (Kaminski *et al.* 2012). Zugleich deuten Studien darauf hin, dass hochpathogene Viren im Vergleich zu niedrigpathogenen Viren zu einer verstärkten IFN-Produktion in pDCs führen. Dies trägt vermutlich zu den bei Infektionen mit hochpathogenen Viren beobachteten dysregulierten Zytokinantworten bei, welche mit einer hohen Mortalität assoziiert sind (Sandbulte *et al.* 2008). Daneben ist bekannt, dass RNA mit m⁶A ein weniger potenter Ligand für die Stimulation von TLR7 ist als unmodifizierte RNA (Kariko *et al.* 2005). Daher sollte untersucht werden, inwieweit sich die Veränderungen im Methylierungsstatus der viralen mRNA auch auf die IFN-Produktion von pDCs auswirken. Zwar produzierten die pDCs nach Stimulation mit den verschiedenen Viren große Mengen an IFN α im Vergleich zu der pDC-depletierten Zellpopulation, jedoch konnten keine Unterschiede zwischen den Viren festgestellt werden (s. Abbildung 4.11). Da sich der Unterschied im Methylierungsstatus der Viren erst nach oder während der viralen mRNA-Synthese in der Zelle manifestiert, ist ein Unterschied zwischen den Viren hinsichtlich der Aktivierung des angeborenen Immunsystems nicht unbedingt zu erwarten. Allerdings zeigte die später durchgeführte Bestimmung der m⁶A-Lokalisation, dass nur an einem der untersuchten GGACT-Motive tatsächlich eine Methylierung vorlag. Der Großteil der Mutationen hatte damit keinen Einfluss auf den Methylierungsstatus der Viren. Daher müssen weitere Analysen zeigen, inwieweit sich der Verlust von m⁶A an mehreren Positionen der viralen mRNA auf die Immunreaktion während einer Influenzainfektion auswirkt.

Es wird vermutet, dass die Aktivierung des TLR7 bereits nach der Aufnahme des Viruspartikels im Endosom erfolgt, indem einige Viruspartikel durch endosomale Proteasen degradiert werden, sodass das virale Genom freigelegt wird und als Ligand für TLR7 zur Verfügung steht (Diebold *et al.* 2004). Damit findet die Aktivierung des angeborenen Immunsystems bereits vor der Synthese der viralen mRNA statt und kann daher durch Unterschiede im immunstimulatorischen Potential der mRNA vermutlich nicht mehr beeinflusst werden. Zwar ist von anderen Viren bekannt, dass sie Modifikationen wie 2'O-Methylierungen ihrer mRNA-Capstruktur nutzen um der Immunerkennung zu entgehen, jedoch handelt es sich hierbei um Viren mit einem positivsträngigen RNA-Genom, deren mRNA bereits bei Eintritt in die Zelle vorliegt (Daffis *et al.* 2010; Züst *et al.* 2011).

5.2 Der Einfluss einzelner GGACT-Mutationen in der HA-mRNA auf die virale Replikation und Proteinexpression

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass sich die Mutationen in allen vier GGACT-Motiven der HA-mRNA zusammen negativ auf die Proteinexpression des HA-Proteins und auf die Replikation der Influenzaviren auswirken. Im zweiten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob dafür einzelne Mutationen verantwortlich sind, oder ob mehrere Mutationen durch einen additiven Effekt zu der beobachteten reduzierten Replikationsfähigkeit beitragen. Wie bereits erwähnt, konnten Kennedy *et al.* (2016) in einem Reportergensystem nachweisen, dass m⁶A-Modifikationen in der mRNA des Reportergens die Proteintranslation verstärken. Dieser Effekt war umso stärker, je mehr m⁶A-Motive in der mRNA vorhanden waren, was auf einen additiven Effekt mehrerer m⁶A-Modifikationen hindeutet.

In dieser Arbeit konnte jedoch kein additiver Effekt nachgewiesen werden, da nur das Virus mit der Mutation im 2. GGACT-Motiv (HA_{mut2}) eine reduzierte Replikation im Vergleich zum wt-Virus aufwies. Ähnlich wie bei dem Virus HA_{mut1-4} mit allen mutierten GGACT-Motiven in der HA-mRNA, waren die Unterschiede in den Wachstumskurven nur gering (s. Abbildung 4.13), wurden jedoch bei der Doppelinfektion mit dem wt-Virus deutlicher (s. Abbildung 4.14). In den Calu3-Zellen reduzierte sich der Anteil des Virus HA_{mut2} in der Population innerhalb von 7 Tagen von 65% auf 37%, in den CaCo2-Zellen von 60% auf 28%. Das Virus zeigte damit einen ähnlichen replikativen Nachteil wie das Virus HA_{mut1-4} und wurde vom wt-Virus aus der Viruspopulation verdrängt. Analog zu dem Virus HA_{mut1-4} zeigte auch das Virus HA_{mut2} eine um die Hälfte reduzierte Expression der HA-mRNA (s. Abbildung 4.15) und des HA-Proteins in CaCo2-Zellen im Vergleich zum wt-Virus, während die Expression des M-Protein zwischen den einzelnen Viren vergleichbar war (s. Abbildung 4.16). Diese Daten

zeigen, dass die Mutation in dem 2. GGACT-Motiv der HA-mRNA für die reduzierte Replikationsfähigkeit des Virus HA_{mut1-4} verantwortlich war und die Mutationen der anderen drei Motive keinen nachweisbaren Effekt auf das Viruswachstum hatten. Damit ist wahrscheinlich, dass das Adenosin des 2. GGACT-Motivs eine N6-Methylierung aufweist, während die anderen Motive entweder nicht methyliert sind oder nur zu einem so geringen Anteil, dass die Unterschiede in der Virusreplikation zwischen dem wt-Virus und der jeweiligen Mutante mit den hier angewendeten Methoden nicht nachweisbar sind. Wie sich in späteren Analysen zeigte, wiesen die anderen Motive keine m⁶A-Modifikationen auf, stattdessen konnten m⁶A-Modifikationen an anderen Positionen identifiziert werden. Inwieweit die Mutationen mehrerer m⁶A-Positionen additiv auf die Virusreplikation wirken, muss in weiteren Versuchen untersucht werden. Dass sich die Mutation in dem 2. GGACT-Motiv (von GGACT zu GGACG) negativ auf die Replikationsfähigkeit des Virus auswirkt, lässt sich mit den Ergebnissen aus den Sequenzanalysen in Einklang bringen: hier konnte eine Konservierung der m⁶A-Sequenzmotive GGACT und GGACA in den humanpathogenen H1N1-Viren beobachtet werden (s. Tabelle 2), was bereits darauf hindeutete, dass die Veränderung dieses Sequenzmotivs einen replikativen Nachteil für die Viren bedeutet. Auch für die drei weiteren Positionen in der HA-mRNA sowie in den mRNAs von NA und NS konnte im Rahmen der Sequenzanalysen eine überdurchschnittliche Häufigkeit des m⁶A-Sequenzmotivs beobachtet werden. Trotzdem führte die Mutation zu einem „Nicht-m⁶A-Motiv“ zu keiner veränderten Replikation der Viren. Dies könnte ebenfalls durch einen niedrigen Methylierungsstatus an dieser Position und damit einen nur geringen Effekt des Verlustes von m⁶A auf die Wachstumseigenschaften erklärt werden, der mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden nicht nachweisbar war. Auch könnten zelltypspezifische Unterschiede eine Rolle spielen. Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass der Gehalt an m⁶A in verschiedenen Zelltypen und Geweben variieren kann (Chen *et al.* 2015; Dominissini *et al.* 2012; Meyer *et al.* 2012). Unklar ist jedoch, inwieweit sich auch die Positionen von m⁶A in verschiedenen Zelltypen und Geweben unterscheiden. Dominissini *et al.* (2012) konnten eine Übereinstimmung von 50% zwischen dem murinen und humanen Methylom feststellen, eine 66%ige Übereinstimmung der m⁶A-Regionen zwischen humanen Gehirnzellen und Leberkarzinomzellen und eine 70-96%ige Übereinstimmung der m⁶A-Regionen zwischen Zellen, welche unterschiedlichen Behandlungen und Stimuli ausgesetzt wurden. Dies deutet zwar auf ähnliche Verteilungsmuster von m⁶A innerhalb des Transkriptoms verschiedener Zelltypen hin, zeigt jedoch nicht, welche Motive innerhalb dieser Regionen genau methyliert sind, da die Nachweismethode eine Auflösung von >24 bp aufweist. Es ist also denkbar, dass

auch bei der Methylierung der Influenza-mRNAs bestimmte Regionen von Bedeutung sind, dass sich verschiedene Zelltypen aber in den genauen Positionen der Methylierungen innerhalb dieser Regionen unterscheiden. Da Influenzaviren neben Lungenepithelzellen auch andere Zelltypen, beispielsweise Immunzellen, infizieren können (Manicassamy *et al.* 2010; Matrosovich *et al.* 2004b; Perrone *et al.* 2008), können zelltypspezifische Unterschiede in den m⁶A-Positionen die Konservierung eines m⁶A-Motivs erklären, obwohl eine Methylierung an dieser Position in einer anderen Zelllinie nicht nachgewiesen werden kann.

5.3 Die Rolle der Methylierungsmaschinerie während einer Influenzainfektion

Die Wirkung von m⁶A kann durch zwei verschiedene Mechanismen vermittelt werden: zum einen wird vermutet, dass m⁶A als ein *cis*-Element wirken kann, welches in der Lage ist, durch Struktur- oder Stabilitätsveränderungen des methylierten Transkripts RNA-assoziierte Prozesse zu regulieren (Roost *et al.* 2015). Zum anderen ist m⁶A ein Bindungsmotiv für *trans*-wirkende Faktoren, die ebenfalls Prozesse wie Spleißen, Translation und RNA-Abbau regulieren können (Wang *et al.* 2013; Wang *et al.* 2015; Zhou *et al.* 2015). Dieses Bindungsmotiv kann nicht nur durch die Methylierung selbst gebildet werden, sondern auch durch m⁶A-vermittelte lokale Strukturveränderungen in der RNA (Liu *et al.* 2015b; Theler und Allain 2015). Als *trans*-wirkende Faktoren wurden in diesem Zusammenhang die YTHDF-Proteine 1-3 und die Proteine hnRNPA2B1 und hnRNPC identifiziert (Alarcon *et al.* 2015; Liu *et al.* 2015b; Shi *et al.* 2017; Wang *et al.* 2013; Wang *et al.* 2015). Die verstärkte Expression von solchen *trans*-wirkenden Faktoren in der Zelle unter bestimmten Bedingungen kann ein indirekter Hinweis auf die Beteiligung von m⁶A an den entsprechenden zellulären Prozessen sein. Zhou *et al.* (2015) konnten beispielsweise zeigen, dass die Behandlung von Zellen mit einem Hitzeschock zu einer verstärkten Expression des YTHDF2-Proteins führt. Dadurch werden die m⁶A-Modifikationen in der 5'UTR bestimmter mRNAs vor dem Abbau geschützt und vermitteln eine Cap-unabhängige Translationsinitiation bestimmter mRNAs unter Stressbedingungen. Dieser Mechanismus wurde am Beispiel der mRNA des Hitzeschockproteins Hsp70 gezeigt. Interessanterweise ist bekannt, dass die Infektion mit Influenzaviren, ähnlich wie ein Hitzeschock, zu einer Stressantwort in der Zelle führt und so beispielsweise auch die Hochregulation des Hsp70 induziert (Halder *et al.* 2011). Die Rolle von m⁶A-Modifikationen und der damit assoziierten Enzyme während der Translation unter Zellstressbedingungen lassen einen Mechanismus vermuten, durch den Influenzaviren

die Translation ihrer mRNAs unter Stressbedingungen erhöhen, ähnlich wie es für das Hitzeschockprotein Hsp70 gezeigt werden konnte (Zhou *et al.* 2015).

Die Infektion von CaCo2- und A549-Zellen mit dem PR8-Virus führte jedoch zu keiner eindeutigen Regulation der verschiedenen Methyltransferasen und Demethylasen auf mRNA-Ebene. Lediglich die mRNA von YTHDF2 zeigte 24 h nach der Infektion mit dem Influenzavirus eine leicht verstärkte Expression in beiden Zelllinien (s. Abbildung 4.21). Wang *et al.* (2013) konnten zeigen, dass m⁶A-modifizierte Transkripte durch die Bindung von YTHDF2 zu *processing bodies* transportiert werden, wo der Abbau der mRNA stattfindet. Eine Hochregulation der YTHDF2 mRNA, welche auf eine erhöhte Expression des Proteins hindeutet, könnte daher ein Mechanismus der Zelle sein, m⁶A-methylierte, virale mRNAs verstärkt abzubauen und so die virale Replikation einzudämmen. Dies widerspricht jedoch zum einen den von Zhou *et al.* (2015) publizierten Ergebnissen und zum anderen den bisherigen Beobachtungen in dieser Arbeit, die auf eine positive Rolle von m⁶A für die Replikation der Influenzaviren hindeuten. Auch konnte gezeigt werden, dass die Stimulation der CaCo2-Zellen mit IFN α nicht zu einer Hochregulation der YTHDF2-mRNA führte (s. Abbildung 4.22). Damit ist dies kein Mechanismus, der im Rahmen der antiviralen Antwort durch IFN induziert wird. Im Widerspruch zu den Daten von Wang *et al.*, konnten Kennedy *et al.* (2016) zeigen, dass eine Überexpression von YTHDF2, ebenso wie von YTHDF1 und 3, zu einer verstärkten HIV-Replikation führt, der *knockout* jedoch zu einer reduzierten Replikation. Auch eine Bindung von YTHDF1 und 2 an die mRNA von HIV konnte nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass der *knockout* von YTHDF2, analog zu HIV, auch bei den Influenzaviren zu einer m⁶A-vermittelten Reduktion der Replikation führt. Dies konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Zwar wurden mithilfe der CRISPR-Cas9-Technologie YTHDF2-defiziente CaCo2-Zellen generiert, jedoch zeigte sich erst retrospektiv, dass auch die wt-CaCo2-Zellen das Enzym nicht oder nur in nicht nachweisbarem Maße exprimieren. Mit dem verwendeten Antikörper konnten im Western Blot zuvor mehrere Banden in der Größenordnung des YTHDF2-Proteins detektiert werden, sodass ein *knockout* von YTHDF2 zeigen sollte, bei welcher Bande es sich um das nachzuweisende Protein handelte. Bei den YTHDF2-defizienten Zellen zeigte jedoch keine dieser Banden eine veränderte Ausprägung (s. Abbildung 4.23). Zudem wiesen HeLa-Zellen, welche als positiv für YTHDF2 beschrieben wurden, im Vergleich zu den CaCo2-Zellen zwei zusätzliche Banden im Western Blot auf, welche in den CaCo2-Zellen nicht auftraten. Aufgrund des geringen Größenunterschieds der Banden wurde geschlussfolgert, dass es sich hierbei um die beiden Isoformen von YTHDF2 in der Größe von 62 und 57 kDa handelte. Zwar stimmt die vorhergesagte Proteingröße nicht mit der auf dem Blot

detektierten Größe überein, dies kann jedoch an posttranslationalen Modifikationen des Proteins liegen. Auch für Calu3- und A549-Zellen konnte die Expression von YTHDF2 nachgewiesen werden (s. Abbildung 4.24), wobei beide Zelllinien anstelle einer Doppelbande nur eine einzige YTHDF2-Bande in leicht unterschiedlicher Höhe aufwiesen. Da bei diesem Blot auch im HeLa-Lysat nur eine einzelne YTHDF2-Bande detektiert werden konnte, während bei dem Calu3-Lysat auf dem Blot in Abbildung 4.25 B wiederum eine leichte Doppelbande erkennbar ist, wird die Expression der verschiedenen Spleißvarianten vermutlich zelltypspezifisch oder auch abhängig von den Kulturbedingungen reguliert. Auch unterschiedliche posttranslationale Modifikationen kommen als Erklärung für geringe Größenunterschiede der Banden infrage.

Die auf mRNA-Ebene beobachtete Hochregulation von YTHDF2 durch eine Influenzainfektion konnte auf Proteinebene nicht bestätigt werden. In CaCo2-Zellen konnte das YTHDF2-Protein auch nach einer Influenzainfektion nicht im Western Blot nachgewiesen werden (s. Abbildung 4.25 A). Auch Calu3-Zellen (s. Abbildung 4.25 B) und A549-Zellen (Daten nicht gezeigt) wiesen zu den untersuchten Zeitpunkten nach der Infektion keine verstärkte Expression des Proteins auf. Da die YTHDF2-mRNA in den CaCo2- und A549-Zellen nur um etwa einen Faktor 2 hochreguliert war, war eine stark verstärkte Expression des Proteins in den Zellen jedoch nicht zu erwarten. Auch Kennedy *et al.* (2016) konnten bei einer HIV-Infektion keine erhöhte Proteinexpression von YTHDF2 nachweisen. Dies deutet darauf hin, dass die basalen Expressionslevel von YTHDF2 in der Zelle für die Virusreplikation möglicherweise ausreichend sind. Es ist daher weiterhin möglich, dass YTHDF2 eine Rolle bei der Replikation von Influenzaviren spielt, dies konnte jedoch mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden nicht nachgewiesen werden. Um diesen Zusammenhang zu untersuchen, müsste der *knockout* von YTHDF2 in anderen Zellen als den CaCo2-Zellen durchgeführt werden und der Einfluss auf die Replikation der Influenzaviren anhand von Wachstumskinetiken analysiert werden. Auch eine Überexpression des Proteins könnte in diesem Zusammenhang Erkenntnisse liefern. Jedoch muss erwähnt werden, dass Tirumuru *et al.* (2016), analog zu Kennedy *et al.* (2016), die Replikation von HIV im Kontext einer YTHDF2-Überexpression bzw. eines *knockdowns* untersucht haben und gegensätzliche Ergebnisse erzielten. Im Widerspruch zu Kennedy *et al.* (2016) führte die Überexpression der YTHDF-Proteine hier zu einer reduzierten HIV-Replikation, der siRNA-vermittelte *knockdown* dagegen zu einer verstärkten Replikation. Diese widersprüchlichen Ergebnisse werfen daher die Frage auf, welche Aussagekraft die Untersuchung der Virusreplikation unter Überexpressions- oder *knockout*-Bedingungen hat, da sich die veränderten Expressionsbedingungen auch

indirekt durch die Beeinflussung zellulärer Prozesse auf die Virusreplikation auswirken können. Eine Analyse, ob und an welchen Positionen die m⁶A-assoziierten Enzyme mit der mRNA von Influenza interagieren, wäre für diesen Zweck vermutlich geeigneter. Hierfür könnte das Verfahren des PAR-CLIP (*photoactivatable-ribonucleoside-enhanced crosslinking and immunoprecipitation*) angewendet werden, bei dem durch Immunpräzipitation Komplexe aus RNA und einem RNA-bindenden Protein aufgereinigt werden und die gebundene RNA-Sequenz sequenziert wird (Chen *et al.* 2014; Hafner *et al.* 2012). Dies konnte jedoch aus Zeitgründen im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

5.4 Die Lokalisation von m⁶A in der mRNA von Influenza

Da der inhibitorische Einfluss der Mutation T1106G im 2.GGACT-Motiv auf die virale Replikation und Proteinexpression ohne Lokalisation von m⁶A nicht eindeutig auf eine Veränderung des Methylierungsstatus an dieser Position zurückgeführt werden konnte, war die Positionsbestimmung der Methylierungen in der mRNA der Influenzaviren unerlässlich. Da die Methode des MeRIP-Seq die bislang am häufigsten verwendete Methode zur Identifikation von m⁶A darstellt, wurde diese mit einigen methodischen Veränderungen erneut durchgeführt und dabei der Methylierungsstatus der viralen mRNA des wt-Virus mit der des Virus HA_{mut1-4} verglichen. Durch die Kontrolle von DNA-Kontaminationen und eine doppelte Anreicherung der mRNA wurde gewährleistet, dass die Proben neben der mRNA kaum weitere, durch m⁶A-modifizierte Nukleinsäuren enthielten (s. Abbildung 4.18) und damit möglichst viele Sequenzierreads auf virale mRNAs entfielen. Anreicherungen bestimmter Sequenzen in der immunpräzipitierten Probe im Vergleich zur Inputkontrolle zeigen dabei die Positionen von m⁶A und konnten in mehreren viralen mRNAs detektiert werden. Die mRNAs der unterschiedlichen Segmente wiesen dabei sowohl in der IP-Probe als auch in der Input-Kontrolle Unterschiede in der Expression auf. Die mRNAs der Segmente M, NP und HA waren im Vergleich mit den RNAs der anderen Segmente deutlich häufiger in den Proben vertreten, was mit der Höhe der Proteinexpression von M, NP und HA korreliert (Lamb und Krug 2001).

5.4.1 Vergleich der m⁶A-Profile zwischen dem wt-Virus und dem Virus HA_{mut1-4}

In der mRNA des wt-Virus konnten zwei m⁶A-Peaks im NS, jeweils einer in der M- und NA-mRNA, drei in der NP-mRNA und vier in der HA-mRNA identifiziert werden. Die meisten Peaks lagen dabei in der 5'- und 3'-Region der viralen mRNAs. Lediglich die NP- und HA-Segmente wiesen auch m⁶A-Peaks in den mittleren Bereichen der mRNAs

auf. Die Peaks in den viralen mRNAs des Virus HA_{mut1-4} waren zum Teil deutlich niedriger als die Peaks in der wt-Probe, insbesondere in den Randbereichen der mRNAs. Hierbei könnten Schwankungen bei der Effizienz der RNA-Aufreinigung nach der IP eine Rolle gespielt haben oder Unterschiede in der Menge der für die IP eingesetzten RNA-Mengen. Dennoch konnten von den 11 Peaks in der wt-Probe 7 auch in der HA_{mut1-4}-Probe identifiziert werden. Hier waren die Positionen der ermittelten Peakspitzen bei beiden Proben jedoch nicht exakt gleich, sondern lagen im Durchschnitt 9 nt auseinander. Bedenkt man jedoch die in früheren Studien beobachteten durchschnittlichen Entfernungen der Peakspitze vom nächsten Konsensusmotiv, wird deutlich, dass diese Unterschiede unterhalb der Auflösungsgrenze der Methode liegen (Dominissini *et al.* 2012; Meyer *et al.* 2012; Schwartz *et al.* 2014). Die Auflistung der Sequenzen innerhalb der Peaks zeigt deutlich, dass bei den meisten dieser Peaks ein m⁶A-Konsensusmotiv ([G/A/U][G>A]m⁶AC[U>A>C]) in unmittelbarer Nähe liegt (s. Tabelle 4), was die Verlässlichkeit der Ergebnisse unterstreicht. Statistisch kommt das m⁶A-Konsensusmotiv nur alle 57 nt vor, in der wt-Probe lagen alle ermittelten m⁶A-Peaks hingegen im Durchschnitt 9 nt vom nächsten Konsensusmotiv entfernt. An vier Positionen konnten sogar jeweils zwei Konsensusmotive innerhalb der Peaksequenz detektiert werden. Hier kann jedoch aufgrund der Auflösung der Methode nicht unterschieden werden, ob nur eine oder beide dieser Positionen methyliert sind.

In der NA-mRNA konnten bei dem Virus HA_{mut1-4} zwei Peaks identifiziert werden, die in der mRNA des wt-Virus nicht detektiert werden konnten. Hierbei handelte es sich jedoch um Peaks mit einer nur zwei- bis dreifachen Anreicherung gegenüber der Input-Kontrolle. Zudem lagen die Peaks in Segmenten mit geringen *read*-Zahlen, sodass hier die Berechnung der Anreicherungswahrscheinlichkeit deutlich ungenauer ist. Daher handelte es sich hier vermutlich nicht um Unterschiede im Methylierungsstatus zwischen dem wt-Virus und dem Virus HA_{mut1-4}, sondern um falsch-positive Peakdetektionen. Die Gensegmente der Polymerasen wiesen bei dem Virus HA_{mut1-4} ebenfalls jeweils einen Peak auf, der in der wt-RNA fehlte. Da bei diesen Segmenten, ähnlich wie bei NA, die *read*-Zahlen gering waren, ebenso wie die Anreicherungen der Peaks gegenüber der Inputkontrolle, sind diese Ergebnisse vermutlich nur bedingt aussagekräftig. Auch die großen Entfernungen von 23 bis 112 nt von den Peaks bis zum nächsten m⁶A-Konsensusmotiv sprechen für eine falsch-positive Detektion von m⁶A-Modifikationen an diesen Positionen.

Einige Peaks konnten dagegen nur in der wt-mRNA identifiziert werden. Die meisten dieser Peaks waren in den Sequenziertracks jedoch auch ansatzweise in der mRNA des HA_{mut1-4}-Virus zu finden. Die Höhe der Peaks war jedoch, wie bereits erwähnt, in

der HA_{mut1-4}-Probe allgemein geringer, was erklärt, warum einige Peaks in der HA_{mut1-4}-Probe nicht mehr als m⁶A-Peaks identifiziert wurden. Lediglich an der Position des 2. GGACT-Motivs, das bei dem Virus HA_{mut1-4} mutiert vorlag, konnte in der mRNA der Virusmutante im Vergleich zum wt-Virus keinerlei Peak mehr nachgewiesen werden. Etwas höher im Vergleich zum wt-Virus war bei dem Virus HA_{mut1-4} dagegen der Peak in der Region von 735 bis 787. Auch der Peak in der Region 1299 bis 1364 fiel bei dem HA_{mut1-4}-Virus im Vergleich zu den umliegenden Peaks deutlich höher aus als in der wt-Probe. Dies deutet darauf hin, dass der Verlust der Methylierung am 2. GGACT-Motiv möglicherweise durch eine verstärkte Methylierung anderer Motive in der Nähe ausgeglichen wird.

Interessanterweise entfielen auf die HA-mRNA des Virus HA_{mut1-4} bereits in der Input-Kontrolle deutlich weniger *reads* als bei der HA-mRNA des wt-Virus. Zwar waren, wie bereits erwähnt, nicht alle mRNAs aller Segmente gleich stark exprimiert, jedoch unterschied sich die Expression der Segmente, mit Ausnahme des HA-Segments, nicht zwischen dem wt-Virus und dem Virus HA_{mut1-4}. Die reduzierte Expression der HA-mRNA bei der Virusmutante zeigt, dass die eingefügten Mutationen und der damit einhergehende Verlust der Methylierung an Position 1104 in der HA-mRNA zu einer verringerten Expression der mRNA führte. Das bestätigt die bereits in den qPCR-Analysen beobachtete reduzierte HA-mRNA-Expression (s. Abbildung 4.8 und Abbildung 4.15), sowie die durch Western Blot-Experimente gezeigte Reduktion der HA-Proteinexpression (s. Abbildung 4.9 und Abbildung 4.16) des Virus HA_{mut1-4}.

Bei der Interpretation der Ergebnisse muss jedoch beachtet werden, dass bestimmte methodische Verfahren ebenfalls zu einer Anreicherung bestimmter Sequenzen und so zu einer Detektion falsch-positiver Peaks führen können. Dazu zählen eine nicht-zufällige Fragmentierung, eine ungleichmäßige reverse Transkription oder PCR-Amplifikation während der *library*-Herstellung (Head *et al.* 2014), sowie eine unspezifische Bindung des Antikörpers. Die Spezifität des Antikörpers wurde jedoch zuvor bereits in verschiedenen Publikationen und in dieser Arbeit kontrolliert (Dominissini *et al.* 2012; Jia *et al.* 2011; Meyer *et al.* 2012). Um die anderen Fehlerquellen zu minimieren, die zu einer Falschinterpretation der Ergebnisse führen können, müssen die Sequenzierungen mit unabhängigen Replikaten wiederholt und die Ergebnisse verglichen werden. Zudem könnte die Sequenzierung viraler mRNA aus METTL3/14-*knockdown*-Zellen, die keine Methylierung durchführen können, zeigen, bei welchen Peaks es sich möglicherweise um falsch-positive Detektionen handelt.

5.4.2 m⁶A in der 5'-Region der Influenza-mRNA

Interessanterweise traten die deutlichsten m⁶A-Peaks in der 5'-Region der mRNAs von M, NP und HA auf. Zugleich zeigten diese mRNAs die stärkste Expression unter den viralen RNA-Segmenten. Der Peak in der 5'-Region der NP-mRNA wies beispielsweise in der IP-Probe im Vergleich zur Inputkontrolle eine Anreicherung um den Faktor 14 auf, in der HA_{mut1-4}-Probe um den Faktor 4. Auch Dominissini *et al.* (2012) konnten 15% der m⁶A-Peaks in der 5'-UTR von Transkripten und an der Transkriptionsstartstelle identifizieren. Da der anti-m⁶A-Antikörper, der für die IP verwendet wurde, auch die häufig an Cap-Strukturen vorkommende Modifikation (N⁶,2'-O)-Dimethyladenosin (m⁶A_m) erkennt (Wei *et al.* 1975), postulierten Dominissini *et al.*, dass die Peaks in der 5'-UTR von mRNAs Anreicherungen der Cap-Struktur aufgrund der Erkennung von m⁶A_m repräsentieren könnten. Da Inflenzaviren den Mechanismus des „Cap-Stehls“ verwenden, ist es sehr wahrscheinlich, dass auch die mRNAs von Influenza m⁶A_m an der Cap-Struktur aufweisen. Interessanterweise konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass mRNAs, welche ein m⁶A_m als erstes Nukleotid nach der Cap-Struktur tragen, deutlich stabiler sind als mRNAs mit einem anderen Startnukleotid (Mauer *et al.* 2016). Studien zur Bevorzugung bestimmter mRNAs während des „Cap-Stehls“ haben gezeigt, dass die „gestohlenen“ Cap-Strukturen häufiger ein Adenosin an der Position 1 aufweisen als die Gesamtheit der Wirts-mRNAs (Gu *et al.* 2015). Zwar konnten auch Präferenzen der Polymerase für bestimmte Nukleotide an den 3'-Enden des mRNA-Fragments beobachtet werden (Rao *et al.* 2003), jedoch scheinen weitere Faktoren, wie die 5'-Cap-Region, die Effizienz der endonukleolytischen Spaltung zu beeinflussen, sodass mRNA-Caps mit einem Adenosin an Position 1 von der Influenza-Polymerase bevorzugt werden. Es wäre also denkbar, dass Inflenzaviren durch die Bevorzugung m⁶A_m-modifizierter Cap-Strukturen die Stabilität ihrer mRNAs in der Wirtszelle erhöhen. Da die m⁶A-Peaks in der 5'-Region jedoch vor allem in den mRNAs von M, NP und HA zu finden sind, müsste ein Mechanismus existieren, durch den bestimmte virale mRNAs selektiv m⁶A_m-modifizierte Cap-Strukturen erhalten.

Denkbar ist auch, dass die m⁶A-Modifikationen in der 5'-Region zu einer Cap-unabhängigen Translationsinitiation viraler mRNAs führen. Meyer *et al.* (2015) konnten einen solchen Mechanismus für m⁶A in der 5'-UTR zellulärer mRNAs nachweisen. Dabei bindet der eukaryotische Initiationsfaktor 3 (eIF3), anstelle des Cap-Bindungsfaktor eIF4E, spezifisch an m⁶A und initiiert so die Translation. Insbesondere unter Stressbedingungen konnte ein Anstieg von m⁶A in den 5'-UTRs beobachtet werden. Dies könnte erklären, warum bestimmte mRNAs auch unter Zellstressbedingungen, bei denen die Aktivität des eIF4E beeinträchtigt ist (Holcik und Sonenberg 2005), dennoch translatiert werden. Für Influenza ist bisher jedoch kein

solcher Mechanismus bekannt. Zwar konnte gezeigt werden, dass Influenzaviren auch ohne die Aktivität des Cap-Bindungsfaktors eIF4E replizieren können (Yanguéz *et al.* 2012), sie benötigen jedoch die Faktoren eIF4A und eIF4G, die ebenfalls Teil des eIF4F-Komplexes sind (Yanguéz *et al.* 2011). Dies spricht gegen einen Cap-unabhängigen Translationsinitiationsmechanismus bei Influenzaviren. Da der Prozess der Translationsinitiation bei Influenzaviren noch nicht komplett verstanden ist, ist es dennoch möglich, dass m⁶A in der 5'-Region durch einen bislang unbekanntem Mechanismus die Translation der viralen mRNAs fördert.

Schwartz *et al.* (2014) konnten zeigen, dass solche Methylierungen innerhalb der 5'-Region an der Transkriptionsstartstelle zellulärer mRNAs positiv mit der Translationseffizienz korrelierten, während sie, im Gegensatz zu internen Methylierungen, nicht mit einer veränderten Stabilität assoziiert waren. Da die mRNAs der am stärksten exprimierten Influenza-Proteine besonders deutliche m⁶A-Peaks in der 5'-Region zeigten, können die m⁶A-Modifikation in dieser Region ebenfalls zu einer erhöhten Translationseffizienz und damit zu einer stärkeren Proteinexpression führen. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, welchen Einfluss die m⁶A-Modifikationen in der 5'-Region auf die Translation und Replikation der Influenzaviren haben.

5.4.3 m⁶A in der 3'-Region der Influenza-mRNAs

Deutliche m⁶A-Peaks wurden auch im Bereich der Stopcodons an den 3'-Enden der viralen mRNAs für NP und HA detektiert (s. Abbildung 4.19). Auch das 3'-Ende des NS-Segments wies einen kleinen m⁶A-Peak auf. Diese Daten stimmen mit verschiedenen Publikationen überein, in denen ein Großteil der N6-methylierten Adenosine innerhalb der 3'UTR zellulärer mRNAs und in der Region der Stopcodons gefunden wurde (Dominissini *et al.* 2012; Meyer *et al.* 2012; Wang *et al.* 2013).

Durch PAR-CLIP-Analysen konnte bestätigt werden, dass sich auch die Bindungsstellen der YTHDF-Proteine, überlappend mit den m⁶A-Positionen, zu einem Großteil innerhalb der 3'-UTR und im Bereich der Stopcodons zellulärer mRNAs befinden (Wang *et al.* 2013, 2015). Welche Auswirkungen die Methylierungen auf die mRNA-Expression und Translation haben, ist jedoch bislang umstritten. In si-RNA-vermittelten *knockdown*-Experimenten konnte ein destabilisierender Einfluss von YTHDF2 auf m⁶A-modifizierte mRNAs beobachtet werden. Zudem zeigte YTHDF2 in Immunfluoreszenzanalysen eine Kolo-kalisation mit Markern, welche in *processing bodies* zu finden sind (Wang *et al.* 2013). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die m⁶A-Modifikationen, die sich zu einem Großteil innerhalb der 3'-UTR und im Bereich der Stopcodons befinden, die Stabilität der mRNAs verringern. Für YTHDF1 konnte hingegen ein stabilisierender Einfluss auf m⁶A-modifizierte mRNAs

nachgewiesen werden. Ein *knockdown* der Methyltransferase METTL3 und die damit verbundene Reduktion der m⁶A-Level in der mRNA führten, ebenso wie der *knockdown* von YTHDF1, zu einer verringerten Translation der YTHDF1-Target-mRNAs (Wang et al. 2015). Für YTHDF1 und 2 konnten in den PAR-CLIP-Analysen ca. 50% gemeinsame Targettranskripte gefunden werden. Es ist daher unklar, ob die m⁶A-Modifikationen in der 3'-UTR beispielsweise durch Unterschiede in angrenzenden Sequenzmotive oder Sekundärstrukturen von unterschiedlichen *reader*-Proteinen gebunden werden, oder ob YTHDF1 und 2 in unterschiedlicher zeitlicher Reihenfolge an ihre Target-mRNAs binden und so zunächst die Translation und danach den Abbau regulieren.

Auch Kennedy *et al.* (2016) wiesen m⁶A-Modifikationen in der 3'-UTR von HIV-mRNAs nach. Diese wurden von allen drei YTHDF-Proteinen gebunden, wobei PAR-CLIP-Analysen nur geringe Unterschiede im Bindungsmuster zwischen den einzelnen Proteinen zeigten. Dabei konnte ein verstärkender Effekt von m⁶A in der 3'-UTR auf die mRNA-Expression und Proteintranslation beobachtet werden. Dieser Effekt konnte auf die Bindung der YTHDF-Proteine zurückgeführt werden, da eine Überexpression die virale mRNA- und Proteinexpression verstärkte, während ein YTHDF-*knockout* den gegenteiligen Effekt zeigte. Ein Unterschied in der Wirkung der YTHDF-Proteine 1-3 konnte dabei jedoch nicht beobachtet werden, was den Ergebnissen von Wang *et al.* (2014b) und Wang *et al.* (2015) widerspricht. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, welche Bedeutung die m⁶A-Modifikationen in der 3'-Region der Influenza-mRNAs für die virale Replikation haben. Zwar spricht die in dieser Arbeit beobachtete verstärkte Replikation und Proteinexpression durch die m⁶A-Modifikation im 2. GGACT-Motiv der HA-mRNA für eine stabilisierende Wirkung oder eine Erhöhung der Translationsrate durch m⁶A, ob dies jedoch auch für die m⁶A-Modifikationen in der 3'-Region der viralen mRNA gilt, muss durch weitere Versuche geklärt werden.

5.4.4 Einordnung der bisherigen Ergebnisse in den Kontext der m⁶A-Lokalisation

Die Ergebnisse, die zuvor in den Replikations- und Proteinexpressionsstudien mit den mutierten Viren erzielt wurden, wurden durch die Ergebnisse des MeRIP-Seq bestätigt. Die Viren mit Mutationen in den GGACT-Motiven der NS- und NA-mRNA wiesen keine veränderte Replikation oder Proteinexpression im Vergleich zu den wt-Viren auf. In Übereinstimmung damit konnten durch die Sequenzierung der NS- und NA-mRNAs keine m⁶A-Peaks in den Regionen der GGACT-Motive detektiert werden. Das gleiche galt für die Mutationen im ersten, dritten und vierten GGACT-Motiv der HA-mRNA. Warum die untersuchten Influenzasequenzen an diesen Positionen dennoch auffällig

häufig ein m⁶A-Motiv aufweisen (s. Abschnitt 4.2), kann, wie bereits erläutert, mehrere Gründe haben. Zum einen kann die mRNA zwar nicht in CaCo2-Zellen, aber in den Zielzellen der Influenzaviren an diesen Positionen methyliert werden, zum anderen können bestimmte Sequenzmotive vorteilhaft für die RNA-Struktur und Funktion sein.

Die Mutation des 2. GGACT-Motivs innerhalb der HA-mRNA führte hingegen zu einer reduzierten Replikationsfähigkeit und einer reduzierten Expression des HA-Proteins und der HA-mRNA. Die Sequenzierungsergebnisse bestätigten, dass das wt-Virus an dieser Position eine m⁶A-Modifikation aufweist, welche in der HA-Virusmutante nicht mehr detektiert werden konnte. Daraus kann geschlossen werden, dass die Mutation und der damit einhergehende Verlust der m⁶A-Modifikation an Position 1104 in der HA-mRNA zu der reduzierten HA-Protein- und -mRNA-Expression führte. Auch zeigten die Viren mit der Mutation an dieser Position einen replikativen Nachteil gegenüber den wt-Viren und wurden bei einer Koinfektion vom wt-Virus aus der Viruspopulation verdrängt. Die reduzierte HA-Proteinexpression wirkte sich daher negativ auf die Replikationsfähigkeit des Influenzavirus aus.

Ob m⁶A-Modifikationen generell einen positiven oder negativen Einfluss auf die Replikation von Viren haben oder ob verschiedene m⁶A-Positionen unterschiedliche Effekte vermitteln, ist bislang unklar. Wie bereits diskutiert, deuten Studien darauf hin, dass m⁶A-Modifikationen in verschiedenen Regionen von zellulärer mRNA unterschiedliche Effekte vermitteln. Weitere Versuche mit rekombinanten Viren, bei denen neben dem 2. GGACT-Motiv weitere, durch das MeRIP-Seq identifizierte, Positionen mutiert vorliegen, müssen zeigen, ob die Mutationen die Replikationsfähigkeit der Viren additiv reduzieren, sich in ihrer Wirkung auf die Replikation möglicherweise aufheben oder zu ausgleichenden Methylierungen an anderen Positionen führen.

Bisherige Studien deuten darauf hin, dass sich m⁶A in verschiedenen Viren unterschiedlich auf die virale Replikation auswirkt. Kennedy *et al.* (2016) haben den Einfluss von m⁶A in der HIV-mRNA auf die Translation ausschließlich mithilfe eines Reportersystems untersucht. Dabei wurde ein nachweislich durch m⁶A-modifizierter Teil der HIV-mRNA, die 3'UTR, in ein Luziferasereporterplasmid kloniert, sodass in der resultierenden Reporter-mRNA die 3'UTR von HIV durch die Luziferase ersetzt wurde. Damit konnte zwar der Einfluss von m⁶A auf die Translationseffizienz im Kontext der viralen mRNA bestimmt werden, nicht jedoch der direkte Einfluss von m⁶A auf die Virusreplikation. Dennoch deuten die Daten auf einen positiven Effekt von m⁶A auf die Replikation von HIV hin. In Übereinstimmung damit führte die Depletion der Methylasen oder Demethylasen in humanen T-Zellen zu einer verringerten bzw. verstärkten HIV-Replikation (Lichinchi *et al.* 2016a). Gokhale *et al.* (2016) hingegen

konnten nachweisen, dass METTL3- und METTL14-depletierte Zellen eine verstärkte Produktion von Viruspartikeln bei einer Hepatitis-C-Virus(HCV)-Infektion zeigten, FTO-depletierte Zellen dagegen eine reduzierte Viruspartikelproduktion. Die Mutation von m⁶A-modifizierten Sequenzmotiven in der genomischen viralen Positivstrang-RNA führte zu einer erhöhten viralen Partikelproduktion, weshalb ein negativer Effekt von m⁶A auf die virale Replikation von HCV postuliert wurde. Auch für Zika-Viren konnte durch die Depletion der Methyltransferasen und Demethylasen eine negative Rolle von m⁶A für die Virusreplikation gezeigt werden (Lichinchi *et al.* 2016b). Da bislang nur wenige Studien zu dem Einfluss von m⁶A auf die virale Replikation vorliegen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass Unterschiede in den verwendeten Zelltypen und Virusstämmen sowie Unterschiede im experimentellen Design oder Nebeneffekte von Überexpressionen und *knockdowns* für diese zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse verantwortlich sind (Gonzales-van Horn und Sarnow 2017). Eine weitere Erklärung für die gegensätzlichen Effekte von m⁶A, die in den verschiedenen Studien beobachtet wurden, könnte jedoch auch die unterschiedliche zelluläre Lokalisation der viralen RNAs darstellen. Während die Replikation von HIV im Nukleus stattfindet, replizieren Flaviviren im Zytoplasma. Eine ungleiche Verfügbarkeit der Wirtsproteine, die m⁶A-abhängige Effekte vermitteln, könnte daher für die unterschiedlichen Effekte von m⁶A verantwortlich sein (Gonzales-van Horn und Sarnow 2017). Da Inflenzaviren jedoch, wie HIV, im Kern replizieren, ist davon auszugehen, dass sich die Anwesenheit von m⁶A in der viralen mRNA ähnlich wie bei HIV auswirkt, also einen positiven Effekt auf die Virusreplikation hat, worauf die Ergebnisse dieser Arbeit eindeutig hinweisen.

5.5 Vergleich der Ergebnisse mit der Studie von Courtney *et al.* (2017)

Während der Fertigstellung dieser Arbeit veröffentlichten Courtney *et al.* (2017) eine Studie, die sich ebenfalls mit dem Einfluss von m⁶A auf die Replikation von Inflenzaviren befasste und in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit einen positiven Effekt von m⁶A auf die virale RNA-Expression und das Wachstum in Zellkultur nachweisen konnte. Die m⁶A-Positionen in dem Inflenzastamm PR8 wurden dabei, unter anderem mithilfe der *photocrosslinking-assisted m⁶A sequencing* (PA-m⁶A-Seq) Technik, in 293T-Zellen identifiziert. Übereinstimmend mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit konnten dabei die meisten m⁶A-Positionen in den mRNAs für die Strukturproteine nachgewiesen werden, während die mRNAs für die Polymeraseproteine nur wenige m⁶A-Positionen aufwiesen. Ein Vergleich der gefundenen m⁶A-Positionen kann nur für die HA-mRNA erfolgen, da nur für dieses Segment eine m⁶A-Kartierung in höherer Auflösung veröffentlicht wurde. Der Vergleich

der in dieser Arbeit gefundenen m⁶A-Positionen mit denen von Courtney *et al.* ist in Abbildung 5.1 grafisch dargestellt. Die Abbildung dient lediglich einem Positionsvergleich, da die absolute Höhe der Peaks von Courtney *et al.* nicht bekannt ist und daher nicht mit der Höhe der Peaks aus dieser Arbeit verglichen werden kann. Die in dieser Arbeit identifizierten m⁶A-Peaks am 5'- und am 3'-Ende der HA-mRNA konnten von Courtney *et al.* mithilfe der PA-m⁶A-Seq-Technik nicht gefunden werden. Während in dieser Arbeit lediglich vier m⁶A-Peaks in der HA-mRNA identifiziert wurden, wiesen Courtney *et al.* acht eindeutige Peaks nach. Der erste Peak lag bei etwa 300 bp, die vier folgenden Peaks zwischen 500 und 900 bp, zwei weitere Peaks um 1400 bp und der letzte Peak zwischen 1600 und 1700 bp. Der vierte Peak bei etwa 750 bp konnte auch in dieser Arbeit ansatzweise identifiziert werden, wurde jedoch statistisch nicht als eindeutig eingestuft (s. Abbildung 5.1 und Abbildung 4.19). Um Position 1100, an der in dieser Arbeit in der wt-mRNA ein eindeutiger m⁶A-Peak an dem 2. GGACT-Motiv identifiziert wurde, befinden sich auch bei Courtney *et al.* zwei Peaks, welche jedoch nicht als eindeutige Anreicherung eingestuft wurden. Auch die Peaks 6 und 7 um 1400 bp (Courtney *et al.*) stimmen in etwa mit dem Peak überein, welcher in dieser Arbeit um Position 1350 gefunden werden konnte. Für alle anderen Peaks in der HA-mRNA konnten keine Gemeinsamkeiten identifiziert werden. Gründe für diese Diskrepanz können zum einen in den unterschiedlichen Zelllinien liegen, welche für das Experiment verwendet wurden und zum anderen in den verschiedenen Techniken des m⁶A-Nachweises. Grundsätzlich führt die Technik des PA-m⁶A-Seq (bei der die mRNA aus Influenza-infizierten, 4-Thiouridin-behandelten Zellen *in vitro* einem *crosslinking* mit dem m⁶A-Antikörper und einem anschließenden RNase-Verdau unterzogen wird, sodass nur die Protein-gebundenen RNA-Bereiche sequenziert werden) zu einer genaueren Auflösung bei der m⁶A-Positionsbestimmung. Dies kann auch erklären, warum Courtney *et al.* zwei Peaks um Position 1400 in der HA-mRNA identifizieren konnten, während in dieser Arbeit nur ein Peak in dieser Region gefunden wurde.

Durch Experimente mit mutierten Viren, welche stille Mutationen in allen identifizierten m⁶A-Motiven aufwiesen, konnten Courtney *et al.* zeigen, dass die Reduktion des m⁶A-Gehalts zu einer verringerten HA-Proteinexpression und HA-mRNA-Expression in A549-Zellen führte, während die Protein- und mRNA-Expression von M2 nicht verändert war, was den Ergebnissen dieser Arbeit entspricht. Zusätzlich konnten Courtney *et al.* zeigen, dass die viralen Partikel ebenfalls weniger HA-Protein aufwiesen. Die Infektion von A549-Zellen mit einem METTL3-*knockout* führte zu einer reduzierten Expression verschiedener viraler mRNAs und Proteine, welche mit einer reduzierten Virusreplikation einherging. Die Überexpression von YTHDF2, nicht aber

YTHDF1 und YTHDF3, hatte hingegen einen gegenteiligen Effekt und führte zu einer verstärkten viralen mRNA- und Proteinexpression sowie zu einer verstärkten Replikation. Dies bestätigt die in dieser Arbeit aufgestellte Hypothese, dass YTHDF2 die Replikation von Influenzaviren positiv beeinflusst. Gleichzeitig bestätigen diese Daten den in dieser Arbeit beobachteten positiven Effekt von m⁶A auf die mRNA- und Proteinexpression der Influenzaviren. Ein Effekt der m⁶A-Reduktion in der HA-mRNA auf die Immunantwort von infizierten A549-Zellen konnte durch Courtney *et al.* nicht nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stimmen mit den Daten aus der pDC-Infektion (s. 4.4.5) überein, wobei es sich bei pDCs, anders als bei A549-Zellen, um Immunzellen handelt und die Daten daher nur bedingt vergleichbar sind.

Die reduzierte mRNA-Expression der Viren mit der Mutation im 2. GGACT-Motiv der HA-mRNA (s. Abbildung 4.4) und die Daten von Courtney *et al.* implizieren, dass sich die m⁶A-Modifikationen vermutlich auf die Stabilität der Influenza-mRNAs auswirken. Denkbar ist einerseits, dass m⁶A indirekt durch die Bindung von *reader*-Proteinen, die den Abbau von RNAs regulieren, die Stabilität der RNA beeinflusst, andererseits könnten m⁶A-Modifikationen auch Konformationsänderungen der RNA induzieren und durch die Veränderung der RNA-Struktur und -Faltung Einfluss auf die Stabilität der RNA nehmen (Kierzek und Kierzek 2003). Die aus dem Verlust der m⁶A-Modifikation resultierende verringerte Expression der HA-mRNA ist eine Erklärung für die reduzierte Proteinexpression des HA-Proteins. Gleichzeitig kann diese jedoch auch durch eine (zusätzliche) Reduktion der Translationsrate hervorgerufen sein, ähnlich wie es für HIV beschrieben wurde (Kennedy *et al.* 2016).

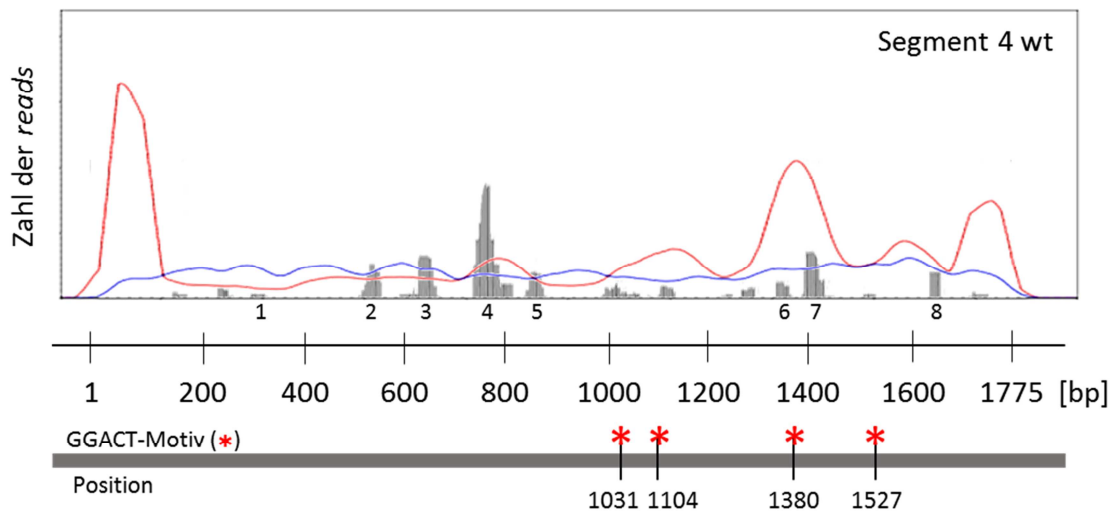


Abbildung 5.1: Vergleich der m⁶A-Positionen in der HA-mRNA des wt-Virus mit der m⁶A-Kartierung von Courtney *et al.* (2017). Die Grafik zeigt die Überlagerung der Sequenziertracks der HA-mRNA von der IP-Probe (rot) und der Input-Kontrolle (blau) des wt-Virus. Als grau ausgefüllte Peaks sind die m⁶A-Peaks aus der Publikation von Courtney *et al.* dargestellt, welche durch PA-m⁶A-Seq identifiziert wurden. Die Zahlen darunter markieren die Peaks, welche von Courtney *et al.* als eindeutige m⁶A-Peaks identifiziert wurden. Die Skala der x-Achse bezieht sich hierbei auf die Basenpaarpositionen innerhalb der HA-mRNA. GGACT-Motive sind als rote Sternchen dargestellt, die Zahl darunter bezieht sich auf die Position des Motivs.

5.6 Ausblick

In dieser Arbeit wurden die m⁶A-Modifikationen in der mRNA von Influenzaviren während einer Infektion von CaCo2-Zellen kartiert. Insbesondere die mRNAs des M-, NP und HA-Segments wiesen dabei mehrere m⁶A-Positionen auf. Auch die 3'- und 5'-Region der mRNAs zeigten deutliche Methylierungen. Der Vergleich der m⁶A-Positionen zwischen dem wt-Virus und dem Virus mit Mutationen in den m⁶A-Konsensusmotiven ergab, dass das wt-Virus eine Methylierung in der Region des 2. GGACT-Motivs in der HA mRNA aufwies, welche in der mRNA des mutierten Virus fehlte. Diese Mutation führte zu einer reduzierten HA-mRNA-Expression und HA-Proteinexpression sowie zu einer verringerten Replikation des Virus im Vergleich zum wt-Virus.

Welche Rolle die anderen m⁶A-Modifikationen, insbesondere in der 5'- und 3'-Region der Influenza mRNA spielen, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Da ein kompletter *knockout* von METTL3 in HeLa-Zellen als letal beschrieben wurde (Bokar 2005; Liu und Pan 2016), wäre die Infektion von Zellen mit einem induzierten METTL3/14 *knockdown* eine Möglichkeit, den Einfluss der Gesamtheit der m⁶A-Modifikationen auf die Influenzareplikation zu untersuchen. Dies birgt jedoch die Gefahr, dass sekundäre Effekte durch den *knockdown* den Zellstoffwechsel negativ beeinflussen, was sich auch auf die Virusinfektion auswirken und so zu einer Fehlinterpretation der Ergebnisse führen kann.

Zudem müssen die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche nun auch mit rekombinanten Viren durchgeführt werden, welche stille Mutationen an den anderen, durch das MeRIP-Seq identifizierten m⁶A-Positionen tragen und so keine Methylierung an diesen Positionen mehr aufweisen. Aufgrund der zum Teil widersprüchlichen Studienlage hinsichtlich des Einflusses von m⁶A auf die virale Replikation (Courtney *et al.* 2017; Gokhale *et al.* 2016; Kennedy *et al.* 2016; Lichinchi *et al.* 2016a; Lichinchi *et al.* 2016b; Tirumuru *et al.* 2016), müssen auch zelltypspezifische Unterschiede oder Unterschiede zwischen verschiedenen Virusstämmen und Virusfamilien als Ursache für diese Diskrepanzen in Betracht gezogen werden. Wichtig ist daher, neben der Wiederholung des MeRIP-Seq, die Untersuchung des Einflusses von m⁶A in weiteren Zelltypen und mit verschiedenen Virusstämmen. Ein interessanter Aspekt ist hier die Frage, inwieweit sich beispielsweise pandemische Influenzaviren hinsichtlich ihrer m⁶A-Modifikationen von saisonalen Influenzaviren unterscheiden.

Weiterer Forschungsbedarf besteht zudem hinsichtlich der Fragestellung, inwieweit sich m⁶A-Modifikationen *in vivo* auf die Pathogenität von Influenzaviren auswirken. Zwar geben Untersuchungen in Zellkulturmodellen erste Hinweise auf Veränderungen der Pathogenität, dies muss jedoch anhand eines Tiermodells in späteren Versuchen verifiziert werden. Zwar konnten Courtney *et al.* (2017) bereits zeigen, dass die Reduktion von m⁶A in der HA-mRNA von Influenza zu einer reduzierten Pathogenität in Mäusen führt, jedoch muss weiter untersucht werden, welchen Einfluss ein kompletter Verlust von m⁶A auf die Pathogenität von Influenzaviren hat. Zu dem Einfluss von m⁶A auf die Pathogenität anderer Viren *in vivo* ist bislang noch nichts bekannt.

Des Weiteren muss untersucht werden, inwieweit die identifizierten m⁶A-Positionen mit den Bindungsstellen der Methylasen, Demethylasen oder *reader*-Proteinen übereinstimmen. Analog zu Courtney *et al.* (2017) muss für die Untersuchung dieser Fragestellung die Methode des PAR-CLIP angewendet werden, bei dem durch Immunpräzipitation Komplexe aus RNA und einem RNA-bindenden Protein gereinigt werden und die gebundene RNA-Sequenz sequenziert wird (Chen *et al.* 2014; Hafner *et al.* 2012).

In neueren Publikationen wurde m⁶A vor allem in positivsträngiger RNA nachgewiesen, beispielsweise in der mRNA von HIV (Kennedy *et al.* 2016; Lichinchi *et al.* 2016a; Tirumuru *et al.* 2016) und in der genomischen, positivsträngigen RNA von HCV, Dengue-Viren, Gelbfieberviren, West-Nil-Viren und Zika-Viren (Gokhale *et al.* 2016; Lichinchi *et al.* 2016b). Courtney *et al.* (2017) konnten m⁶A nun auch in der negativsträngigen, genomischen Influenza-RNA nachweisen. Die Untersuchung der m⁶A-Modifikationen in der genomischen RNA der Influenzaviren ist besonders hinsichtlich der Immunerkennung interessant, da m⁶A sich negativ auf das

immunstimulatorische Potential von RNA auswirken kann (Kariko *et al.* 2005) und die genomische RNA, anders als die virale mRNA, bereits zu Beginn der Infektion vorliegt und in endosomalen Vesikeln zu einer TLR7-Stimulation führt (Diebold *et al.* 2004). Damit hat eine m⁶A-modifizierte genomische Influenza-RNA das Potential, einer Erkennung durch das angeborene Immunsystem zu entgehen. Nachfolgende Experimente sollen daher zeigen, wie sich ein kompletter Verlust von m⁶A in der genomischen Influenza-RNA auf die Immunerkennung auswirkt.

6 Zusammenfassung

RNA-Moleküle verschiedener Organismen enthalten zahlreiche chemisch modifizierte Nukleoside, deren Funktionen bisher nur zum Teil verstanden sind. In eukaryotischer mRNA ist N6-Methyladenosin (m^6A) die am häufigsten vorkommende Modifikation und entsteht durch die Methylierung der Aminogruppe an Position 6 des Ringsystems. Diese wird durch einen Enzymkomplex aus METTL3, METTL14 und WTAP innerhalb der Konsensussequenz $[G/A/T][G>A]m^6AC[T>A>C]$ vermittelt. Die Sequenzabfolge GGACT ist dabei das am häufigsten methylierte Motiv. Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass m^6A verschiedene Schritte des RNA-Metabolismus beeinflusst und damit zahlreiche zelluläre Prozesse regulieren kann. Hierbei wird insbesondere ein Einfluss von m^6A auf die Translation, das Spleißen und die Stabilität von RNA diskutiert. Die Effekte von m^6A werden in der Zelle durch Bindung verschiedener *reader*-Proteine aus der hnRNP- und YTH-Proteinfamilie vermittelt.

Interessanterweise enthält auch die mRNA verschiedener Viren m^6A , aber die Funktion dieser Modifikation für die Virusreplikation und Pathogenese sind noch zu einem großen Teil unverstanden. Ältere Studien deuten darauf hin, dass auch die mRNA von Influenzaviren m^6A enthält, wobei die genauen Positionen der Methylierungen nicht bekannt sind.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von m^6A auf die Replikation des Influenzastammes A/Puerto Rico/8/1934 H1N1 untersucht. Dafür wurden rekombinanten Viren hergestellt, die Mutationen in den m^6A -Konsensusmotiven GGACT der viralen NS-, NA- oder HA-mRNA enthielten, sodass an diesen Positionen keine Methylierung mehr stattfinden konnte, gleichzeitig jedoch keine Veränderung der Aminosäuresequenz induziert wurde. Durch Replikationsversuche und Untersuchung der Protein- sowie mRNA-Expression in humanen Zelllinien wurden die Viren charakterisiert und mit Wildtyp(wt)-Viren verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Viren mit den mutierten GGACT-Motiven in der HA-mRNA deutlich schlechter replizierten als die wt-Viren und zudem eine reduzierte Expression der HA-mRNA- sowie des HA-Proteins zeigten. Die Mutationen in den GGACT-Motiven der NS- und NA-mRNA hatten hingegen keinen Einfluss auf die Virusreplikation.

Um die Beobachtungen aus den Replikationsversuchen auf den Methylierungsstatus der Viren zurückführen zu können, wurden die m^6A -Positionen in der mRNA des wt-Virus und des Virus mit den Mutationen in der HA-mRNA mithilfe der Methode des *methylated RNA immunoprecipitation with next generation sequencing* (MeRIP-Seq) identifiziert. So konnte gezeigt werden, dass die GGACT-Motive der NS- und NA-mRNA des wt-Virus nicht methyliert vorlagen, was die normale Replikationsfähigkeit

der entsprechenden Virusmutanten erklärte. Von den GGACT-Motiven in der HA-mRNA des wt-Virus enthielt nur ein einziges eine m⁶A-Modifikation. Hierbei handelte es sich um das 2. GGACT-Motiv in der HA-mRNA. Diese Methylierung konnte in der mRNA des Virus, bei dem die GGACT-Motive in der HA-mRNA durch Mutationen verändert wurden, nicht mehr identifiziert werden.

Replikationsversuche mit Viren, bei denen die GGACT-Motive der HA-mRNA nicht gleichzeitig, sondern einzeln mutiert vorlagen, konnten zeigen, dass die Mutation des 2. GGACT-Motivs zu einer reduzierten Replikationsfähigkeit und zu einer verringerten Expression der HA-mRNA- sowie des HA-Proteins führte. Die reduzierte Replikationsfähigkeit des Virus, welches Mutationen an allen GGACT-Motiven in der HA-mRNA aufwies, konnte damit allein auf die Mutation des 2. GGACT-Motivs und dem damit einhergehenden Verlust der m⁶A-Modifikation an dieser Position zurückgeführt werden. Durch das MeRIP-Seq konnten weitere m⁶A-Modifikationen in den mRNAs des NS-, M-, NA-, NP- und HA-Segments nachgewiesen werden, insbesondere in den 5'- und 3'-Regionen, deren Funktionen in weiteren Versuchen untersucht werden muss.

Der Nachweis einer Influenza-vermittelten Regulation der m⁶A-assozierten Proteine sollte Hinweise liefern, durch welche Mechanismen m⁶A die virale RNA- und Proteinexpression während einer Infektion beeinflusst. Eine Influenza-vermittelte Veränderung der mRNA-Expression von Demethylasen, Methyltransferasen und *reader*-Proteinen konnte in den verwendeten Zelllinien jedoch nicht gezeigt werden. Aufgrund bisheriger Studien, die auf eine YTHDF2-vermittelte Verstärkung der Proteintranslation von methylierter mRNA hindeuten, wurde auch die Proteinexpression von YTHDF2 in humanen Zellen während einer Influenzainfektion untersucht. Auch hier zeigte sich jedoch keine Veränderung in der Expression. Weitere Versuche werden daher klären müssen, durch welche Mechanismen m⁶A in der Influenza-mRNA die Proteinexpression und Replikation beeinflusst.

Zusammenfassend konnte damit in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Verlust einer m⁶A-Modifikation in der viralen mRNA zu einer reduzierten Replikationsfähigkeit der Influenzaviren führte. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Hemmung der m⁶A-Modifikation in der Zelle die Replikation der Influenzaviren einschränken könnte und damit das Potential für einen neuen Therapieansatz gegen die Influenzagrippe bietet.

7 Summary

RNA from different organisms contains more than 100 different chemically modified nucleosides, but their functions are largely unknown. N6-methyladenosine (m^6A) is the most abundant modification in eukaryotic mRNA and is post-transcriptionally installed by a methyltransferase complex consisting of METTL3, METTL14 and WTAP within the consensus motif [G/A/T][G>A] m^6AC [T>A>C]. Therefore, the sequence motif GGACT is the most common m^6A motif. M^6A is bound by proteins from the YTH and hnRNP protein family, which function as *reader* proteins and regulate cellular processes like translation, splicing and RNA decay.

Interestingly, viral mRNA has also been reported to contain m^6A but the role for virus replication and pathogenicity still has to be elucidated. Studies from the 1970s indicate that influenza virus mRNA also contains m^6A but the exact positions of m^6A have not yet been determined.

In this thesis, the influence of m^6A on the replication of the influenza strain A/Puerto Rico/8/1934 H1N1 was analyzed. For this purpose, recombinant viruses were generated which contain mutations in the m^6A consensus motifs GGACT of the viral NS, NA or HA mRNAs. These mutations will abrogate the N6-methylation at the respective position without inducing a change in the amino acid sequence of the protein. The viruses were characterized by replication experiments and analysis of the viral RNA and protein expression, and then compared to the wt virus. It could be shown that the virus with the mutated GGACT motifs in the HA mRNA (HA_{mut1-4}) replicated less efficient when compared to the wt virus and showed a reduced HA mRNA and HA protein expression. In contrast, the mutations in the GGACT motifs of the NS and NA mRNA did not affect viral replication.

To link the observations from the replication studies to the methylation status of the viruses, the m^6A positions in the mRNA from the wt virus and from the virus HA_{mut1-4} were determined by the method of *methylated RNA immunoprecipitation with next generation sequencing* (MeRIP-Seq). This analysis showed that the GGACT motifs in the NS and NA mRNA of the wt virus were not methylated and therefore confirmed the results from the replication studies, in which the viruses with mutations at these sites replicated normally. In the HA mRNA, only one of the four GGACT sites was methylated. The mRNA from the wt virus contained a methylation at the second GGACT motif, which was abrogated in the mRNA from the virus HA_{mut1-4} with the mutated GGACT motifs.

In further experiments recombinant influenza viruses were generated in which the GGACT motifs in the HA mRNA were mutated individually. Replication studies with

these viruses could show that the mutation of the second GGACT motif lead to a reduced replication efficiency and to a decreased expression of HA mRNA and HA protein. Therefore, the reduced replication efficiency of the virus HA_{mut1-4} with four mutated GGACT motifs in the HA-mRNA could be linked solely to the single mutation at the second GGACT motif and to a resulting loss of m⁶A at this position.

The MeRIP-Seq could determine further m⁶A modifications in the NA, M, NA, NP and HA mRNA, especially in the 5' and 3' regions. Further studies have to elucidate the functions of these m⁶A modifications.

The detection of an influenza-mediated regulation of the m⁶A-associated enzymes should reveal how m⁶A regulates viral mRNA and protein expression during an influenza infection. In this thesis, however, an influenza-mediated change in the mRNA expression of different methyltransferases, demethylases and reader proteins could not be shown. With regard to different studies, which indicate a role of YTHDF2 in the m⁶A-mediated increase of protein translation, the YTHDF2 protein expression was also analyzed during an influenza infection in human cell lines. However, the virus infection did not induce any visible change in the YTHDF2 protein expression. Therefore, further studies have to reveal how m⁶A influences the replication and protein expression of influenza viruses.

In summary, this thesis could show that the loss of an m⁶A modification in the viral mRNA lead to a reduced replication efficiency of influenza virus. These data suggest that the inhibition of m⁶A modifications could have the potential to inhibit influenza replication and could therefore be used as a therapy against influenza infection.

IV Literaturverzeichnis

Alarcon, C.R., Goodarzi, H., Lee, H., Liu, X., Tavazoie, S., and Tavazoie, S.F. (2015). HNRNPA2B1 Is a Mediator of m(6)A-Dependent Nuclear RNA Processing Events. *Cell* *162*, 1299-1308.

Amorim, M.J., Bruce, E.A., Read, E.K., Foeglein, A., Mahen, R., Stuart, A.D., and Digard, P. (2011). A Rab11- and microtubule-dependent mechanism for cytoplasmic transport of influenza A virus viral RNA. *J Virol* *85*, 4143-4156.

Antanaviciute, A., Baquero-Perez, B., Watson, C.M., Harrison, S.M., Lascelles, C., Crinnion, L., Markham, A.F., Bonthron, D.T., Whitehouse, A., and Carr, I.M. (2017). m6aViewer: software for the detection, analysis and visualization of N6-methyladenosine peaks from m6A-seq/ME-RIP sequencing data. *RNA (New York, NY)*.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology* *18*, 767-811.

Barchet, W., Cella, M., Odermatt, B., Asselin-Paturel, C., Colonna, M., and Kalinke, U. (2002). Virus-induced interferon alpha production by a dendritic cell subset in the absence of feedback signaling in vivo. *The Journal of experimental medicine* *195*, 507-516.

Barton, G.M., Kagan, J.C., and Medzhitov, R. (2006). Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol* *7*, 49-56.

Bauer, S., Kirschning, C.J., Hacker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H., and Lipford, G.B. (2001). Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 9237-9242.

Baum, A., Sachidanandam, R., and Garcia-Sastre, A. (2010). Preference of RIG-I for short viral RNA molecules in infected cells revealed by next-generation sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 16303-16308.

Benitez, A.A., Panis, M., Xue, J., Varble, A., Shim, J.V., Frick, A.L., Lopez, C.B., Sachs, D., and tenOever, B.R. (2015). In Vivo RNAi Screening Identifies MDA5 as a Significant Contributor to the Cellular Defense against Influenza A Virus. *Cell reports* *11*, 1714-1726.

Beutler, B. (2009). Microbe sensing, positive feedback loops, and the pathogenesis of inflammatory diseases. *Immunological reviews* *227*, 248-263.

Bianchi, M.E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger.

Bodi, Z., Button, J.D., Grierson, D., and Fray, R.G. (2010). Yeast targets for mRNA methylation. *Nucleic acids research* *38*, 5327-5335.

Bokar, J.A. (2005). In *Fine-Tuning of RNA Functions by Modification and Editing* (Springer), pp. 141–177.

Bokar, J.A., Rath-Shambaugh, M.E., Ludwiczak, R., Narayan, P., and Rottman, F. (1994). Characterization and partial purification of mRNA N6-adenosine methyltransferase from HeLa cell nuclei. Internal mRNA methylation requires a multisubunit complex. *J Biol Chem* *269*, 17697-17704.

Bokar, J.A., Shambaugh, M.E., Polayes, D., Matera, A.G., and Rottman, F.M. (1997). Purification and cDNA cloning of the AdoMet-binding subunit of the human mRNA (N6-adenosine)-methyltransferase. *RNA* (New York, NY) *3*, 1233-1247.

Bosch, F.X., Orlich, M., Klenk, H.D., and Rott, R. (1979). The structure of the hemagglutinin, a determinant for the pathogenicity of influenza viruses. *Virology* *95*, 197-207.

Böttcher-Friebertshäuser, E., Garten, W., Matrosovich, M., and Klenk, H.D. (2014). The hemagglutinin: a determinant of pathogenicity. *Current topics in microbiology and immunology* *385*, 3-34.

Böttcher, E., Matrosovich, T., Beyerle, M., Klenk, H.D., Garten, W., and Matrosovich, M. (2006). Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium. *J Virol* *80*, 9896-9898.

Bowie, A.G., and Unterholzner, L. (2008). Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nat Rev Immunol* *8*, 911-922.

Brubaker, S.W., Bonham, K.S., Zanoni, I., and Kagan, J.C. (2015). Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annual review of immunology* *33*, 257-290.

Cardenas, W.B., Loo, Y.M., Gale, M., Jr., Hartman, A.L., Kimberlin, C.R., Martinez-Sobrido, L., Saphire, E.O., and Basler, C.F. (2006). Ebola virus VP35 protein binds double-stranded RNA and inhibits alpha/beta interferon production induced by RIG-I signaling. *J Virol* *80*, 5168-5178.

Chen, K., Lu, Z., Wang, X., Fu, Y., Luo, G.Z., Liu, N., Han, D., Dominissini, D., Dai, Q., Pan, T., *et al.* (2014). High-resolution N(6) -methyladenosine (m(6) A) map using photo-crosslinking-assisted m(6) A sequencing. *Angewandte Chemie (International ed in English)* *54*, 1587-1590.

Chen, T., Hao, Y.J., Zhang, Y., Li, M.M., Wang, M., Han, W., Wu, Y., Lv, Y., Hao, J., Wang, L., *et al.* (2015). m(6)A RNA methylation is regulated by microRNAs and promotes reprogramming to pluripotency. *Cell stem cell* *16*, 289-301.

Chen, W., Calvo, P.A., Malide, D., Gibbs, J., Schubert, U., Bacik, I., Basta, S., O'Neill, R., Schickli, J., Palese, P., *et al.* (2001). A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nature medicine* *7*, 1306-1312.

Cheung, C.Y., Poon, L.L., Lau, A.S., Luk, W., Lau, Y.L., Shortridge, K.F., Gordon, S., Guan, Y., and Peiris, J.S. (2002). Induction of proinflammatory cytokines in human

macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease? *Lancet* (London, England) *360*, 1831-1837.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* *162*, 156-159.

Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., *et al.* (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* *339*, 819-823.

Couceiro, J.N., Paulson, J.C., and Baum, L.G. (1993). Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. *Virus Res* *29*, 155-165.

Courtney, D.G., Kennedy, E.M., Dumm, R.E., Bogerd, H.P., Tsai, K., Heaton, N.S., and Cullen, B.R. (2017). Epitranscriptomic Enhancement of Influenza A Virus Gene Expression and Replication. *Cell host & microbe* *22*, 377-386 e375.

Creagh, E.M., and O'Neill, L.A. (2006). TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends in immunology* *27*, 352-357.

Csepany, T., Lin, A., Baldick, C.J., Jr., and Beemon, K. (1990). Sequence specificity of mRNA N6-adenosine methyltransferase. *J Biol Chem* *265*, 20117-20122.

Czudai-Matwich, V., Schnare, M., and Pinkenburg, O. (2013). A simple and fast system for cloning influenza A virus gene segments into pHW2000- and pCAGGS-based vectors. *Arch Virol* *158*, 2049-2058.

Daffis, S., Szretter, K.J., Schriewer, J., Li, J., Youn, S., Errett, J., Lin, T.Y., Schneller, S., Züst, R., Dong, H., *et al.* (2010). 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature* *468*, 452-456.

Dalpke, A., and Helm, M. (2012). RNA mediated Toll-like receptor stimulation in health and disease. *RNA biology* *9*, 828-842.

Davey, J., Dimmock, N.J., and Colman, A. (1985). Identification of the sequence responsible for the nuclear accumulation of the influenza virus nucleoprotein in *Xenopus* oocytes. *Cell* *40*, 667-675.

Davis, W.G., Bowzard, J.B., Sharma, S.D., Wiens, M.E., Ranjan, P., Gangappa, S., Stuchlik, O., Pohl, J., Donis, R.O., Katz, J.M., *et al.* (2012). The 3' untranslated regions of influenza genomic sequences are 5'PPP-independent ligands for RIG-I. *PloS one* *7*, e32661.

Deng, T., Vreede, F.T., and Brownlee, G.G. (2006). Different de novo initiation strategies are used by influenza virus RNA polymerase on its cRNA and viral RNA promoters during viral RNA replication. *J Virol* *80*, 2337-2348.

Deng, X., Chen, K., Luo, G.Z., Weng, X., Ji, Q., Zhou, T., and He, C. (2015). Widespread occurrence of N6-methyladenosine in bacterial mRNA. *Nucleic acids research* 43, 6557-6567.

Desrosiers, R., Friderici, K., and Rottman, F. (1974). Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from Novikoff hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 3971-3975.

Desselberger, U., Racaniello, V.R., Zazra, J.J., and Palese, P. (1980). The 3' and 5'-terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity. *Gene* 8, 315-328.

Diebold, S.S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., and Reis e Sousa, C. (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303, 1529-1531.

Dina, C., Meyre, D., Gallina, S., Durand, E., Korner, A., Jacobson, P., Carlsson, L.M., Kiess, W., Vatin, V., Lecoecur, C., *et al.* (2007). Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nature genetics* 39, 724-726.

Dominissini, D., Moshitch-Moshkovitz, S., Schwartz, S., Salmon-Divon, M., Ungar, L., Osenberg, S., Cesarkas, K., Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., Kupiec, M., *et al.* (2012). Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature* 485, 201-206.

Drake, J.W. (1993). Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 4171-4175.

Dubin, D.T., and Taylor, R.H. (1975). The methylation state of poly A-containing messenger RNA from cultured hamster cells. *Nucleic acids research* 2, 1653-1668.

Dudek, S.E., Wixler, L., Nordhoff, C., Nordmann, A., Anhlan, D., Wixler, V., and Ludwig, S. (2011). The influenza virus PB1-F2 protein has interferon antagonistic activity. *Biological chemistry* 392, 1135-1144.

Flick, R., Neumann, G., Hoffmann, E., Neumeier, E., and Hobom, G. (1996). Promoter elements in the influenza vRNA terminal structure. *RNA (New York, NY)* 2, 1046-1057.

Fouchier, R.A., Munster, V., Wallensten, A., Bestebroer, T.M., Herfst, S., Smith, D., Rimmelzwaan, G.F., Olsen, B., and Osterhaus, A.D. (2005). Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* 79, 2814-2822.

Frayling, T.M., Timpson, N.J., Weedon, M.N., Zeggini, E., Freathy, R.M., Lindgren, C.M., Perry, J.R., Elliott, K.S., Lango, H., Rayner, N.W., *et al.* (2007). A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 316, 889-894.

Fujisawa, H., Tsuru, S., Taniguchi, M., Zinnaka, Y., and Nomoto, K. (1987). Protective mechanisms against pulmonary infection with influenza virus. I. Relative contribution of

polymorphonuclear leukocytes and of alveolar macrophages to protection during the early phase of intranasal infection. *J Gen Virol* 68 (Pt 2), 425-432.

Fustin, J.M., Doi, M., Yamaguchi, Y., Hida, H., Nishimura, S., Yoshida, M., Isagawa, T., Morioka, M.S., Takeya, H., Manabe, I., *et al.* (2013). RNA-methylation-dependent RNA processing controls the speed of the circadian clock. *Cell* 155, 793-806.

Gack, M.U., Albrecht, R.A., Urano, T., Inn, K.S., Huang, I.C., Carnero, E., Farzan, M., Inoue, S., Jung, J.U., and Garcia-Sastre, A. (2009). Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I. *Cell host & microbe* 5, 439-449.

Gehrig, S., Eberle, M.E., Botschen, F., Rimbach, K., Eberle, F., Eigenbrod, T., Kaiser, S., Holmes, W.M., Erdmann, V.A., Sprinzl, M., *et al.* (2012). Identification of modifications in microbial, native tRNA that suppress immunostimulatory activity. *The Journal of experimental medicine* 209, 225-233.

Gerken, T., Girard, C.A., Tung, Y.C., Webby, C.J., Saudek, V., Hewitson, K.S., Yeo, G.S., McDonough, M.A., Cunliffe, S., McNeill, L.A., *et al.* (2007). The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science* 318, 1469-1472.

Geula, S., Moshitch-Moshkovitz, S., Dominissini, D., Mansour, A.A., Kol, N., Salmon-Divon, M., Hershkovitz, V., Peer, E., Mor, N., Manor, Y.S., *et al.* (2015). Stem cells. m6A mRNA methylation facilitates resolution of naive pluripotency toward differentiation. *Science* 347, 1002-1006.

GeurtsvanKessel, C.H., Willart, M.A., van Rijt, L.S., Muskens, F., Kool, M., Baas, C., Thielemans, K., Bennett, C., Clausen, B.E., Hoogsteden, H.C., *et al.* (2008). Clearance of influenza virus from the lung depends on migratory langerin⁺CD11b⁻ but not plasmacytoid dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 205, 1621-1634.

Gilliet, M., Cao, W., and Liu, Y.J. (2008). Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 8, 594-606.

Gokhale, N.S., McIntyre, A.B., McFadden, M.J., Roder, A.E., Kennedy, E.M., Gandara, J.A., Hopcraft, S.E., Quicke, K.M., Vazquez, C., Willer, J., *et al.* (2016). N6-Methyladenosine in Flaviviridae Viral RNA Genomes Regulates Infection. *Cell host & microbe* 20, 654-665.

Gonzales-van Horn, S.R., and Sarnow, P. (2017). Making the Mark: The Role of Adenosine Modifications in the Life Cycle of RNA Viruses. *Cell host & microbe* 21, 661-669.

Graef, K.M., Vreede, F.T., Lau, Y.F., McCall, A.W., Carr, S.M., Subbarao, K., and Fodor, E. (2010). The PB2 subunit of the influenza virus RNA polymerase affects virulence by interacting with the mitochondrial antiviral signaling protein and inhibiting expression of beta interferon. *J Virol* 84, 8433-8445.

Greenspan, D., Palese, P., and Krystal, M. (1988). Two nuclear location signals in the influenza virus NS1 nonstructural protein. *J Virol* 62, 3020-3026.

Gu, W., Gallagher, G.R., Dai, W., Liu, P., Li, R., Trombly, M.I., Gammon, D.B., Mello, C.C., Wang, J.P., and Finberg, R.W. (2015). Influenza A virus preferentially snatches noncoding RNA caps. *RNA (New York, NY)* 21, 2067-2075.

Guarda, G., Zenger, M., Yazdi, A.S., Schroder, K., Ferrero, I., Menu, P., Tardivel, A., Mattmann, C., and Tschopp, J. (2011). Differential expression of NLRP3 among hematopoietic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 186, 2529-2534.

Guillot, L., Le Goffic, R., Bloch, S., Escriou, N., Akira, S., Chignard, M., and Si-Tahar, M. (2005). Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus. *J Biol Chem* 280, 5571-5580.

Hafner, M., Lianoglou, S., Tuschl, T., and Betel, D. (2012). Genome-wide identification of miRNA targets by PAR-CLIP. *Methods* 58, 94-105.

Halder, U.C., Bagchi, P., Chattopadhyay, S., Dutta, D., and Chawla-Sarkar, M. (2011). Cell death regulation during influenza A virus infection by matrix (M1) protein: a model of viral control over the cellular survival pathway. *Cell death & disease* 2, e197.

Harper, J.E., Miceli, S.M., Roberts, R.J., and Manley, J.L. (1990). Sequence specificity of the human mRNA N6-adenosine methylase in vitro. *Nucleic Acids Res* 18, 5735-5741.

Hashimoto, Y., Moki, T., Takizawa, T., Shiratsuchi, A., and Nakanishi, Y. (2007). Evidence for phagocytosis of influenza virus-infected, apoptotic cells by neutrophils and macrophages in mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 178, 2448-2457.

Head, S.R., Komori, H.K., LaMere, S.A., Whisenant, T., Van Nieuwerburgh, F., Salomon, D.R., and Ordoukhanian, P. (2014). Library construction for next-generation sequencing: overviews and challenges. *Biotechniques* 56, 61-64, 66, 68, passim.

Heckman, K.L., and Pease, L.R. (2007). Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nature Protocols* 2, 924-932.

Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., and Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303, 1526-1529.

Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., *et al.* (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740-745.

Herrler, G., and Klenk, H.D. (1991). Structure and function of the HEF glycoprotein of influenza C virus. *Adv Virus Res* 40, 213-234.

Hoffmann, E., Neumann, G., Kawaoka, Y., Hobom, G., and Webster, R.G. (2000). A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids.

Hoffmann, E., Stech, J., Guan, Y., Webster, R.G., and Perez, D.R. (2001). Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol* *146*, 2275-2289.

Hoffmann, J., and Akira, S. (2013). Innate immunity. *Current opinion in immunology* *25*, 1-3.

Hofmann, P., Sprenger, H., Kaufmann, A., Bender, A., Hasse, C., Nain, M., and Gemsa, D. (1997). Susceptibility of mononuclear phagocytes to influenza A virus infection and possible role in the antiviral response. *Journal of leukocyte biology* *61*, 408-414.

Holcik, M., and Sonenberg, N. (2005). Translational control in stress and apoptosis. *Nature reviews Molecular cell biology* *6*, 318-327.

Hornung, V., Ablasser, A., Charrel-Dennis, M., Bauernfeind, F., Horvath, G., Caffrey, D.R., Latz, E., and Fitzgerald, K.A. (2009). AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* *458*, 514-518.

Hutchinson, E.C., and Fodor, E. (2013). Transport of the influenza virus genome from nucleus to nucleus. *Viruses* *5*, 2424-2446.

Ichinohe, T., Pang, I.K., and Iwasaki, A. (2010). Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. *Nature immunology* *11*, 404-410.

Illumina (2016). An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology [online].

Imhof, B.A., and Aurrand-Lions, M. (2004). Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nature Reviews Immunology* *4*, 432-444.

Ishii, K.J., Koyama, S., Nakagawa, A., Coban, C., and Akira, S. (2008). Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. *Cell host & microbe* *3*, 352-363.

Ito, T., Couceiro, J.N., Kelm, S., Baum, L.G., Krauss, S., Castrucci, M.R., Donatelli, I., Kida, H., Paulson, J.C., Webster, R.G., *et al.* (1998). Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol* *72*, 7367-7373.

Ivashkiv, L.B., and Donlin, L.T. (2013). Regulation of type I interferon responses. *Nature Reviews Immunology* *14*, 36-49.

Iwai, A., Shiozaki, T., Kawai, T., Akira, S., Kawaoka, Y., Takada, A., Kida, H., and Miyazaki, T. (2010). Influenza A virus polymerase inhibits type I interferon induction by binding to interferon beta promoter stimulator 1. *J Biol Chem* *285*, 32064-32074.

Iwasaki, A., and Pillai, P.S. (2014). Innate immunity to influenza virus infection. *Nat Rev Immunol* *14*, 315-328.

Jagger, B.W., Wise, H.M., Kash, J.C., Walters, K.A., Wills, N.M., Xiao, Y.L., Dunfee, R.L., Schwartzman, L.M., Ozinsky, A., Bell, G.L., *et al.* (2012). An overlapping protein-

coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science* 337, 199-204.

Jeisy-Scott, V., Kim, J.H., Davis, W.G., Cao, W., Katz, J.M., and Sambhara, S. (2012). TLR7 recognition is dispensable for influenza virus A infection but important for the induction of hemagglutinin-specific antibodies in response to the 2009 pandemic split vaccine in mice. *J Virol* 86, 10988-10998.

Jia, G., Fu, Y., Zhao, X., Dai, Q., Zheng, G., Yang, Y., Yi, C., Lindahl, T., Pan, T., Yang, Y.G., *et al.* (2011). N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nature chemical biology* 7, 885-887.

Jia, G., Yang, C.G., Yang, S., Jian, X., Yi, C., Zhou, Z., and He, C. (2008). Oxidative demethylation of 3-methylthymine and 3-methyluracil in single-stranded DNA and RNA by mouse and human FTO. *FEBS letters* 582, 3313-3319.

Jin, M.S., and Lee, J.O. (2008). Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity* 29, 182-191.

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816-821.

Jöckel, S., Nees, G., Sommer, R., Zhao, Y., Cherkasov, D., Hori, H., Ehm, G., Schnare, M., Nain, M., Kaufmann, A., *et al.* (2012). The 2'-O-methylation status of a single guanosine controls transfer RNA-mediated Toll-like receptor 7 activation or inhibition. *The Journal of experimental medicine* 209, 235-241.

Kaminski, M.M., Ohnemus, A., Cornitescu, M., and Staeheli, P. (2012). Plasmacytoid dendritic cells and Toll-like receptor 7-dependent signalling promote efficient protection of mice against highly virulent influenza A virus. *J Gen Virol* 93, 555-559.

Kanaya, S., Yamada, Y., Kinouchi, M., Kudo, Y., and Ikemura, T. (2001). Codon usage and tRNA genes in eukaryotes: correlation of codon usage diversity with translation efficiency and with CG-dinucleotide usage as assessed by multivariate analysis. *J Mol Evol* 53, 290-298.

Kane, S.E., and Beemon, K. (1985). Precise localization of m6A in Rous sarcoma virus RNA reveals clustering of methylation sites: implications for RNA processing. *Mol Cell Biol* 5, 2298-2306.

Kariko, K., Buckstein, M., Ni, H., and Weissman, D. (2005). Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity* 23, 165-175.

Kariko, K., Ni, H., Capodici, J., Lamphier, M., and Weissman, D. (2004). mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem* 279, 12542-12550.

Karupiah, G., Chen, J.H., Mahalingam, S., Nathan, C.F., and MacMicking, J.D. (1998). Rapid interferon gamma-dependent clearance of influenza A virus and protection from

consolidating pneumonitis in nitric oxide synthase 2-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* *188*, 1541-1546.

Kash, J.C., Tumpey, T.M., Proll, S.C., Carter, V., Perwitasari, O., Thomas, M.J., Basler, C.F., Palese, P., Taubenberger, J.K., Garcia-Sastre, A., *et al.* (2006). Genomic analysis of increased host immune and cell death responses induced by 1918 influenza virus. *Nature* *443*, 578-581.

Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K.J., *et al.* (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* *441*, 101-105.

Kawai, T., and Akira, S. (2008). Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences* *1143*, 1-20.

Kennedy, E.M., Bogerd, H.P., Kornepati, A.V., Kang, D., Ghoshal, D., Marshall, J.B., Poling, B.C., Tsai, K., Gokhale, N.S., Horner, S.M., *et al.* (2016). Posttranscriptional m(6)A Editing of HIV-1 mRNAs Enhances Viral Gene Expression. *Cell host & microbe* *19*, 675-685.

Kierzek, E., and Kierzek, R. (2003). The thermodynamic stability of RNA duplexes and hairpins containing N6-alkyladenosines and 2-methylthio-N6-alkyladenosines. *Nucleic acids research* *31*, 4472-4480.

Klenk, H.D., Rott, R., and Orlich, M. (1977). Further studies on the activation of influenza virus by proteolytic cleavage of the haemagglutinin. *J Gen Virol* *36*, 151-161.

Koblansky, A.A., Jankovic, D., Oh, H., Hieny, S., Sungnak, W., Mathur, R., Hayden, M.S., Akira, S., Sher, A., and Ghosh, S. (2013). Recognition of Profilin by Toll-like Receptor 12 Is Critical for Host Resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunity* *38*, 119-130.

Kowalinski, E., Lunardi, T., McCarthy, A.A., Luber, J., Brunel, J., Grigorov, B., Gerlier, D., and Cusack, S. (2011). Structural basis for the activation of innate immune pattern-recognition receptor RIG-I by viral RNA. *Cell* *147*, 423-435.

Krug, R.M., Morgan, M.A., and Shatkin, A.J. (1976). Influenza viral mRNA contains internal N6-methyladenosine and 5'-terminal 7-methylguanosine in cap structures. *J Virol* *20*, 45-53.

Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2009). Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and biophysical research communications* *388*, 621-625.

La Gruta, N.L., Kedzierska, K., Stambas, J., and Doherty, P.C. (2007). A question of self-preservation: immunopathology in influenza virus infection. *Immunol Cell Biol* *85*, 85-92.

Lamb, R.A., and Krug, R.M. (2001). Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In *Fields Virology*, H.P. Knipe DM, Fields BN, ed. (Philadelphia, USA: Lippincott, Williams & Wilkins), pp. 1487–1532.

Lamblin, G., Aubert, J.P., Perini, J.M., Klein, A., Porchet, N., Degand, P., and Roussel, P. (1992). Human respiratory mucins. *Eur Respir J* 5, 247-256.

Lau, C.M., Broughton, C., Tabor, A.S., Akira, S., Flavell, R.A., Mamula, M.J., Christensen, S.R., Shlomchik, M.J., Viglianti, G.A., Rifkin, I.R., *et al.* (2005). RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement. *The Journal of experimental medicine* 202, 1171-1177.

Lavi, S., and Shatkin, A.J. (1975). Methylated simian virus 40-specific RNA from nuclei and cytoplasm of infected BSC-1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 2012-2016.

Le Goffic, R., Balloy, V., Lagranderie, M., Alexopoulou, L., Escriou, N., Flavell, R., Chignard, M., and Si-Tahar, M. (2006). Detrimental contribution of the Toll-like receptor (TLR)3 to influenza A virus-induced acute pneumonia. *PLoS pathogens* 2, e53.

Lee, H.K., Lund, J.M., Ramanathan, B., Mizushima, N., and Iwasaki, A. (2007). Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science* 315, 1398-1401.

Lee, M.S., and Kim, Y.J. (2007). Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annual review of biochemistry* 76, 447-480.

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

Levin, D., and London, I.M. (1978). Regulation of protein synthesis: Activation by double-stranded RNA of a protein kinase that phosphorylates eukaryotic initiation factor 2.

Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology* 7, 678-689.

Li, F., Zhao, D., Wu, J., and Shi, Y. (2014). Structure of the YTH domain of human YTHDF2 in complex with an m(6)A mononucleotide reveals an aromatic cage for m(6)A recognition. In *Cell research (England)*, pp. 1490-1492.

Li, M.M., MacDonald, M.R., and Rice, C.M. (2015). To translate, or not to translate: viral and host mRNA regulation by interferon-stimulated genes. *Trends Cell Biol* 25, 320-329.

Li, S., Min, J.Y., Krug, R.M., and Sen, G.C. (2006). Binding of the influenza A virus NS1 protein to PKR mediates the inhibition of its activation by either PACT or double-stranded RNA. *Virology* 349, 13-21.

Lichinchi, G., Gao, S., Saletore, Y., Gonzalez, G.M., Bansal, V., Wang, Y., Mason, C.E., and Rana, T.M. (2016a). Dynamics of the human and viral m(6)A RNA methylomes during HIV-1 infection of T cells. *Nature microbiology* 1, 16011.

Lichinchi, G., Zhao, B.S., Wu, Y., Lu, Z., Qin, Y., He, C., and Rana, T.M. (2016b). Dynamics of Human and Viral RNA Methylation during Zika Virus Infection. *Cell host & microbe* *20*, 666-673.

Liddicoat, B.J., Piskol, R., Chalk, A.M., Ramaswami, G., Higuchi, M., Hartner, J.C., Li, J.B., Seeburg, P.H., and Walkley, C.R. (2015). RNA editing by ADAR1 prevents MDA5 sensing of endogenous dsRNA as nonself. *Science* *349*, 1115-1120.

Lin, S., Choe, J., Du, P., Triboulet, R., and Gregory, R.I. (2016). The m(6)A Methyltransferase METTL3 Promotes Translation in Human Cancer Cells. *Molecular cell* *62*, 335-345.

Liu, G., Park, H.S., Pyo, H.M., Liu, Q., and Zhou, Y. (2015a). Influenza A Virus Panhandle Structure Is Directly Involved in RIG-I Activation and Interferon Induction. *J Virol* *89*, 6067-6079.

Liu, J., Yue, Y., Han, D., Wang, X., Fu, Y., Zhang, L., Jia, G., Yu, M., Lu, Z., Deng, X., *et al.* (2014). A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation. *Nat Chem Biol* *10*, 93-95.

Liu, N., Dai, Q., Zheng, G., He, C., Parisien, M., and Pan, T. (2015b). N(6)-methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA-protein interactions. *Nature* *518*, 560-564.

Liu, N., and Pan, T. (2016). N6-methyladenosine-encoded epitranscriptomics. *Nature structural & molecular biology* *23*, 98-102.

Liu, N., Parisien, M., Dai, Q., Zheng, G., He, C., and Pan, T. (2013). Probing N6-methyladenosine RNA modification status at single nucleotide resolution in mRNA and long noncoding RNA. *RNA (New York, NY)* *19*, 1848-1856.

Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R., and Iwasaki, A. (2003). Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* *198*, 513-520.

Lund, J.M., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N.C., Gale, N.W., Iwasaki, A., and Flavell, R.A. (2004). Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 5598-5603.

Machnicka, M.A., Milanowska, K., Osman Oglou, O., Purta, E., Kurkowska, M., Olchowik, A., Januszewski, W., Kalinowski, S., Dunin-Horkawicz, S., Rother, K.M., *et al.* (2013). MODOMICS: a database of RNA modification pathways--2013 update. *Nucleic Acids Res* *41*, D262-267.

Malathi, K., Dong, B., Gale, M., Jr., and Silverman, R.H. (2007). Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature* *448*, 816-819.

Manicassamy, B., Manicassamy, S., Belicha-Villanueva, A., Pisanelli, G., Pulendran, B., and Garcia-Sastre, A. (2010). Analysis of in vivo dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 11531-11536.

Martin, K., and Helenius, A. (1991). Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell* *67*, 117-130.

Matrosovich, M.N., Matrosovich, T.Y., Gray, T., Roberts, N.A., and Klenk, H.-D. (2004a). Neuraminidase Is Important for the Initiation of Influenza Virus Infection in Human Airway Epithelium.

Matrosovich, M.N., Matrosovich, T.Y., Gray, T., Roberts, N.A., and Klenk, H.D. (2004b). Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 4620-4624.

Mauer, J., Luo, X., Blanjoie, A., Jiao, X., Grozhik, A.V., Patil, D.P., Linder, B., Pickering, B.F., Vasseur, J.J., Chen, Q., *et al.* (2016). Reversible methylation of m6Am in the 5' cap controls mRNA stability. *Nature* *541*, 371-375.

McAuley, J.L., Kedzierska, K., Brown, L.E., and Shanks, G.D. (2015). Host Immunological Factors Enhancing Mortality of Young Adults during the 1918 Influenza Pandemic. *Frontiers in immunology* *6*, 419.

McAuley, J.L., Tate, M.D., MacKenzie-Kludas, C.J., Pinar, A., Zeng, W., Stutz, A., Latz, E., Brown, L.E., and Mansell, A. (2013). Activation of the NLRP3 inflammasome by IAV virulence protein PB1-F2 contributes to severe pathophysiology and disease. *PLoS pathogens* *9*, e1003392.

McCartney, S.A., Thackray, L.B., Gitlin, L., Gilfillan, S., Virgin, H.W., and Colonna, M. (2008). MDA-5 recognition of a murine norovirus. *PLoS pathogens* *4*, e1000108.

McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A., and O'Garra, A. (2015). Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol* *15*, 87-103.

Means, T.K., Latz, E., Hayashi, F., Murali, M.R., Golenbock, D.T., and Luster, A.D. (2005). Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *The Journal of clinical investigation* *115*, 407-417.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A., Jr. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* *388*, 394-397.

Meyer, K.D., and Jaffrey, S.R. (2014). The dynamic epitranscriptome: N6-methyladenosine and gene expression control. *Nat Rev Mol Cell Biol* *15*, 313-326.

Meyer, K.D., Patil, D.P., Zhou, J., Zinoviev, A., Skabkin, M.A., Elemento, O., Pestova, T.V., Qian, S.B., and Jaffrey, S.R. (2015). 5' UTR m(6)A Promotes Cap-Independent Translation. *Cell* *163*, 999-1010.

Meyer, K.D., Saletore, Y., Zumbo, P., Elemento, O., Mason, C.E., and Jaffrey, S.R. (2012). Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell* *149*, 1635-1646.

Mibayashi, M., Martínez-Sobrido, L., Loo, Y.-M., Cárdenas, W.B., Jr., M.G., and García-Sastre, A. (2007). Inhibition of Retinoic Acid-Inducible Gene I-Mediated Induction of Beta Interferon by the NS1 Protein of Influenza A Virus.

Min, J.Y., and Krug, R.M. (2006). The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 7100-7105.

Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., and Schätzl, H. (2010). *Molekulare Virologie*, 3. Auflage edn (Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag).

Moss, W.N., Priore, S.F., and Turner, D.H. (2011). Identification of potential conserved RNA secondary structure throughout influenza A coding regions. *RNA (New York, NY)* *17*, 991-1011.

Motz, C., Schuhmann, K.M., Kirchhofer, A., Moldt, M., Witte, G., Conzelmann, K.K., and Hopfner, K.P. (2013). Paramyxovirus V proteins disrupt the fold of the RNA sensor MDA5 to inhibit antiviral signaling. *Science* *339*, 690-693.

Muramoto, Y., Noda, T., Kawakami, E., Akkina, R., and Kawaoka, Y. (2013). Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA. *J Virol* *87*, 2455-2462.

Murphy, K. (2012). *Janeway's Immunobiology*, 7th edn (New York: Garland Science).

Nallagatla, S.R., Toroney, R., and Bevilacqua, P.C. (2008). A brilliant disguise for self RNA: 5'-end and internal modifications of primary transcripts suppress elements of innate immunity. *RNA biology* *5*, 140-144.

Narayan, P., Ayers, D.F., Rottman, F.M., Maroney, P.A., and Nilsen, T.W. (1987). Unequal distribution of N6-methyladenosine in influenza virus mRNAs. *Molecular and cellular biology* *7*, 1572-1575.

Nemeroff, M.E., Utans, U., Kramer, A., and Krug, R.M. (1992). Identification of cis-acting intron and exon regions in influenza virus NS1 mRNA that inhibit splicing and cause the formation of aberrantly sedimenting pre-splicing complexes. *Molecular and cellular biology* *12*, 962-970.

Nichols, J.L. (1979). N6-methyladenosine in maize poly(A)-containing RNA. *Plant Sci Lett* *15*, 357-367.

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

Ohuchi, M., Asaoka, N., Sakai, T., and Ohuchi, R. (2006). Roles of neuraminidase in the initial stage of influenza virus infection. *Microbes and infection* *8*, 1287-1293.

Onomoto, K., Jogi, M., Yoo, J.S., Narita, R., Morimoto, S., Takemura, A., Sambhara, S., Kawaguchi, A., Osari, S., Nagata, K., *et al.* (2012). Critical role of an antiviral stress

granule containing RIG-I and PKR in viral detection and innate immunity. *PLoS one* 7, e43031.

Palese, P., Tobita, K., Ueda, M., and Compans, R.W. (1974). Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology* 61, 397-410.

Pan, T. (2013). N6-methyl-adenosine modification in messenger and long non-coding RNA. *Trends in biochemical sciences* 38, 204-209.

Perrone, L.A., Plowden, J.K., Garcia-Sastre, A., Katz, J.M., and Tumpey, T.M. (2008). H5N1 and 1918 pandemic influenza virus infection results in early and excessive infiltration of macrophages and neutrophils in the lungs of mice. *PLoS pathogens* 4, e1000115.

Perry, R.P., Kelley, D.E., Friderici, K., and Rottman, F. (1975). The methylated constituents of L cell messenger RNA: evidence for an unusual cluster at the 5' terminus. *Cell* 4, 387-394.

Pestal, K., Funk, C.C., Snyder, J.M., Price, N.D., Treuting, P.M., and Stetson, D.B. (2015). Isoforms of RNA-Editing Enzyme ADAR1 Independently Control Nucleic Acid Sensor MDA5-Driven Autoimmunity and Multi-organ Development. *Immunity* 43, 933-944.

Pichlmair, A., Lassnig, C., Eberle, C.A., Gorna, M.W., Baumann, C.L., Burkard, T.R., Burckstummer, T., Stefanovic, A., Krieger, S., Bennett, K.L., *et al.* (2011). IFIT1 is an antiviral protein that recognizes 5'-triphosphate RNA. *Nature immunology* 12, 624-630.

Pifer, R., Benson, A., Sturge, C.R., and Yarovinsky, F. (2011). UNC93B1 is essential for TLR11 activation and IL-12-dependent host resistance to *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* 286, 3307-3314.

Ping, X.L., Sun, B.F., Wang, L., Xiao, W., Yang, X., Wang, W.J., Adhikari, S., Shi, Y., Lv, Y., Chen, Y.S., *et al.* (2014). Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase. *Cell research* 24, 177-189.

Plotch, S.J., Bouloy, M., Ulmanen, I., and Krug, R.M. (1981). A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell* 23, 847-858.

Poon, L.L., Pritlove, D.C., Fodor, E., and Brownlee, G.G. (1999). Direct evidence that the poly(A) tail of influenza A virus mRNA is synthesized by reiterative copying of a U track in the virion RNA template. *J Virol* 73, 3473-3476.

Pothlichet, J., Meunier, I., Davis, B.K., Ting, J.P., Skamene, E., von Messling, V., and Vidal, S.M. (2013). Type I IFN triggers RIG-I/TLR3/NLRP3-dependent inflammasome activation in influenza A virus infected cells. *PLoS pathogens* 9, e1003256.

Rao, P., Yuan, W., and Krug, R.M. (2003). Crucial role of CA cleavage sites in the cap-snatching mechanism for initiating viral mRNA synthesis. *EMBO J* 22, 1188-1198.

Rehwinkel, J., Tan, C.P., Goubau, D., Schulz, O., Pichlmair, A., Bier, K., Robb, N., Vreede, F., Barclay, W., Fodor, E., *et al.* (2010). RIG-I detects viral genomic RNA during negative-strand RNA virus infection. *Cell* *140*, 397-408.

Robbins, M., Judge, A., Liang, L., McClintock, K., Yaworski, E., and MacLachlan, I. (2007). 2'-O-methyl-modified RNAs act as TLR7 antagonists. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* *15*, 1663-1669.

Robertson, J.S., Schubert, M., and Lazzarini, R.A. (1981). Polyadenylation sites for influenza virus mRNA. *J Virol* *38*, 157-163.

Rogers, G.N., Paulson, J.C., Daniels, R.S., Skehel, J.J., Wilson, I.A., and Wiley, D.C. (1983a). Single amino acid substitutions in influenza haemagglutinin change receptor binding specificity. *Nature* *304*, 76-78.

Rogers, G.N., Pritchett, T.J., Lane, J.L., and Paulson, J.C. (1983b). Differential sensitivity of human, avian, and equine influenza A viruses to a glycoprotein inhibitor of infection: selection of receptor specific variants. *Virology* *131*, 394-408.

Roost, C., Lynch, S.R., Batista, P.J., Qu, K., Chang, H.Y., and Kool, E.T. (2015). Structure and thermodynamics of N6-methyladenosine in RNA: a spring-loaded base modification. *J Am Chem Soc* *137*, 2107-2115.

Sandbulte, M.R., Boon, A.C., Webby, R.J., and Riberdy, J.M. (2008). Analysis of cytokine secretion from human plasmacytoid dendritic cells infected with H5N1 or low-pathogenicity influenza viruses. *Virology* *381*, 22-28.

Satoh, T., Kato, H., Kumagai, Y., Yoneyama, M., Sato, S., Matsushita, K., Tsujimura, T., Fujita, T., Akira, S., and Takeuchi, O. (2010). LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 1512-1517.

Schlee, M., and Hartmann, G. (2016). Discriminating self from non-self in nucleic acid sensing. *Nat Rev Immunol* *16*, 566-580.

Schlee, M., Roth, A., Hornung, V., Hagmann, C.A., Wimmenauer, V., Barchet, W., Coch, C., Janke, M., Mihailovic, A., Wardle, G., *et al.* (2009). Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity* *31*, 25-34.

Scholtissek, C., Rohde, W., Von Hoyningen, V., and Rott, R. (1978). On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. *Virology* *87*, 13-20.

Schütt, C., and Bröker, B. (2011). *Grundwissen Immunologie* (Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag).

Schwartz, S., Mumbach, M.R., Jovanovic, M., Wang, T., Maciag, K., Bushkin, G.G., Mertins, P., Ter-Ovanesyan, D., Habib, N., Cacchiarelli, D., *et al.* (2014). Perturbation of m6A writers reveals two distinct classes of mRNA methylation at internal and 5' sites. *Cell reports* *8*, 284-296.

Schwarz, K.B. (1996). Oxidative stress during viral infection: a review. *Free radical biology & medicine* 21, 641-649.

Selman, M., Dankar, S.K., Forbes, N.E., Jia, J.J., and Brown, E.G. (2012). Adaptive mutation in influenza A virus non-structural gene is linked to host switching and induces a novel protein by alternative splicing. *Emerging microbes & infections* 1, e42.

Shi, H., Wang, X., Lu, Z., Zhao, B.S., Ma, H., Hsu, P.J., Liu, C., and He, C. (2017). YTHDF3 facilitates translation and decay of N6-methyladenosine-modified RNA. *Cell research* 27, 315-328.

Siegal, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y.J. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284, 1835-1837.

Silverman, R.H. (2007). Viral Encounters with 2',5'-Oligoadenylate Synthetase and RNase L during the Interferon Antiviral Response^v. In *J Virol*, pp. 12720-12729.

Smith, G.J., Vijaykrishna, D., Bahl, J., Lycett, S.J., Worobey, M., Pybus, O.G., Ma, S.K., Cheung, C.L., Raghvani, J., Bhatt, S., *et al.* (2009). Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* 459, 1122-1125.

Sommer, S., Salditt-Georgieff, M., Bachenheimer, S., Darnell, J.E., Furuichi, Y., Morgan, M., and Shatkin, A.J. (1976). The methylation of adenovirus-specific nuclear and cytoplasmic RNA. *Nucleic acids research* 3, 749-765.

Song, W., Wang, J., Han, Z., Zhang, Y., Zhang, H., Wang, W., Chang, J., Xia, B., Fan, S., Zhang, D., *et al.* (2015). Structural basis for specific recognition of single-stranded RNA by Toll-like receptor 13. *Nature structural & molecular biology* 22, 782-787.

Staeheli, P., Grob, R., Meier, E., Sutcliffe, J.G., and Haller, O. (1988). Influenza virus-susceptible mice carry Mx genes with a large deletion or a nonsense mutation. *Molecular and cellular biology* 8, 4518-4523.

Stieneke-Gröber, A., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E., Thomas, G., Roberts, C., Klenk, H.D., and Garten, W. (1992). Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *Embo j* 11, 2407-2414.

Subbarao, K., and Joseph, T. (2007). Scientific barriers to developing vaccines against avian influenza viruses. *Nat Rev Immunol* 7, 267-278.

Swiecki, M., and Colonna, M. (2015). The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 15, 471-485.

Takahasi, K., Yoneyama, M., Nishihori, T., Hirai, R., Kumeta, H., Narita, R., Gale, M., Jr., Inagaki, F., and Fujita, T. (2008). Nonself RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses. *Molecular cell* 29, 428-440.

Taubenberger, J.K., and Morens, D.M. (2008). The pathology of influenza virus infections. *Annu Rev Pathol* 3, 499-522.

Theiler, D., and Allain, F.H. (2015). Molecular biology: RNA modification does a regulatory two-step. *Nature* *518*, 492-493.

Tirumuru, N., Zhao, B.S., Lu, W., Lu, Z., He, C., and Wu, L. (2016). N(6)-methyladenosine of HIV-1 RNA regulates viral infection and HIV-1 Gag protein expression. *eLife* *5*.

Tong, S., Li, Y., Rivaller, P., Conrardy, C., Castillo, D.A., Chen, L.M., Recuenco, S., Ellison, J.A., Davis, C.T., York, I.A., *et al.* (2012). A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 4269-4274.

Tong, S., Zhu, X., Li, Y., Shi, M., Zhang, J., Bourgeois, M., Yang, H., Chen, X., Recuenco, S., Gomez, J., *et al.* (2013). New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS pathogens* *9*, e1003657.

Venkataraman, T., Valdes, M., Elsbey, R., Kakuta, S., Caceres, G., Saijo, S., Iwakura, Y., and Barber, G.N. (2007). Loss of DExD/H box RNA helicase LGP2 manifests disparate antiviral responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* *178*, 6444-6455.

Vreede, F.T., Jung, T.E., and Brownlee, G.G. (2004). Model suggesting that replication of influenza virus is regulated by stabilization of replicative intermediates. *J Virol* *78*, 9568-9572.

Wang, S., Chi, X., Wei, H., Chen, Y., Chen, Z., Huang, S., and Chen, J.L. (2014a). Influenza A virus-induced degradation of eukaryotic translation initiation factor 4B contributes to viral replication by suppressing IFITM3 protein expression. *J Virol* *88*, 8375-8385.

Wang, X., Lu, Z., Gomez, A., Hon, G.C., Yue, Y., Han, D., Fu, Y., Parisien, M., Dai, Q., Jia, G., *et al.* (2013). N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature* *505*, 117-120.

Wang, X., Lu, Z., Gomez, A., Hon, G.C., Yue, Y., Han, D., Fu, Y., Parisien, M., Dai, Q., Jia, G., *et al.* (2014b). N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature* *505*, 117-120.

Wang, X., Zhao, B.S., Roundtree, I.A., Lu, Z., Han, D., Ma, H., Weng, X., Chen, K., Shi, H., and He, C. (2015). N(6)-methyladenosine Modulates Messenger RNA Translation Efficiency. *Cell* *161*, 1388-1399.

Wang, Y., Li, Y., Toth, J.I., Petroski, M.D., Zhang, Z., and Zhao, J.C. (2014c). N6-methyladenosine modification destabilizes developmental regulators in embryonic stem cells. *Nature cell biology* *16*, 191-198.

Weber-Gerlach, M., and Weber, F. (2016). Standing on three legs: antiviral activities of RIG-I against influenza viruses. *Curr Opin Immunol* *42*, 71-75.

Weber, M., Gawanbacht, A., Habjan, M., Rang, A., Borner, C., Schmidt, A.M., Veitinger, S., Jacob, R., Devignot, S., Kochs, G., *et al.* (2013). Incoming RNA virus

nucleocapsids containing a 5'-triphosphorylated genome activate RIG-I and antiviral signaling. *Cell Host Microbe* *13*, 336-346.

Weber, M., Sediri, H., Felgenhauer, U., Binzen, I., Banfer, S., Jacob, R., Brunotte, L., Garcia-Sastre, A., Schmid-Burgk, J.L., Schmidt, T., *et al.* (2015). Influenza virus adaptation PB2-627K modulates nucleocapsid inhibition by the pathogen sensor RIG-I. *Cell host & microbe* *17*, 309-319.

Webster, R.G., Air, G.M., Metzger, D.W., Colman, P.M., Varghese, J.N., Baker, A.T., and Laver, W.G. (1987). Antigenic structure and variation in an influenza virus N9 neuraminidase. *J Virol* *61*, 2910-2916.

Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T., Chambers, T.M., and Kawaoka, Y. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* *56*, 152-179.

Wei, C., Gershowitz, A., and Moss, B. (1975). N6, O2'-dimethyladenosine a novel methylated ribonucleoside next to the 5' terminal of animal cell and virus mRNAs. *Nature* *257*, 251-253.

WHO (2014). Influenza (Seasonal) Fact sheet N°211 (World Health Organisation [online]).

Wise, H.M., Foeglein, A., Sun, J., Dalton, R.M., Patel, S., Howard, W., Anderson, E.C., Barclay, W.S., and Digard, P. (2009). A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *J Virol* *83*, 8021-8031.

Wise, H.M., Hutchinson, E.C., Jagger, B.W., Stuart, A.D., Kang, Z.H., Robb, N., Schwartzman, L.M., Kash, J.C., Fodor, E., Firth, A.E., *et al.* (2012). Identification of a novel splice variant form of the influenza A virus M2 ion channel with an antigenically distinct ectodomain. *PLoS pathogens* *8*, e1002998.

Wisskirchen, C., Ludersdorfer, T.H., Muller, D.A., Moritz, E., and Pavlovic, J. (2011). The cellular RNA helicase UAP56 is required for prevention of double-stranded RNA formation during influenza A virus infection. *J Virol* *85*, 8646-8655.

Wolf, A.I., Buehler, D., Hensley, S.E., Cavanagh, L.L., Wherry, E.J., Kastner, P., Chan, S., and Weninger, W. (2009). Plasmacytoid dendritic cells are dispensable during primary influenza virus infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* *182*, 871-879.

Yanguéz, E., Castello, A., Welnowska, E., Carrasco, L., Goodfellow, I., and Nieto, A. (2011). Functional impairment of eIF4A and eIF4G factors correlates with inhibition of influenza virus mRNA translation. *Virology* *413*, 93-102.

Yanguéz, E., Rodríguez, P., Goodfellow, I., and Nieto, A. (2012). Influenza virus polymerase confers independence of the cellular cap-binding factor eIF4E for viral mRNA translation. *Virology* *422*, 297-307.

Yasutomo, K., Horiuchi, T., Kagami, S., Tsukamoto, H., Hashimura, C., Urushihara, M., and Kuroda, Y. (2001). Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus. *Nature genetics* *28*, 313-314.

Yi, C., and Pan, T. (2011). Cellular dynamics of RNA modification. *Accounts of chemical research* *44*, 1380-1388.

Zhang, Z., Theler, D., Kaminska, K.H., Hiller, M., de la Grange, P., Pudimat, R., Rafalska, I., Heinrich, B., Bujnicki, J.M., Allain, F.H., *et al.* (2010). The YTH domain is a novel RNA binding domain. *J Biol Chem* *285*, 14701-14710.

Zhao, B.S., Roundtree, I.A., and He, C. (2017). Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications. In *Nature reviews Molecular cell biology* (England), pp. 31-42.

Zhao, X., Yang, Y., Sun, B.F., Shi, Y., Yang, X., Xiao, W., Hao, Y.J., Ping, X.L., Chen, Y.S., Wang, W.J., *et al.* (2014). FTO-dependent demethylation of N6-methyladenosine regulates mRNA splicing and is required for adipogenesis. *Cell research* *24*, 1403-1419.

Zheng, G., Dahl, J.A., Niu, Y., Fedorcsak, P., Huang, C.M., Li, C.J., Vagbo, C.B., Shi, Y., Wang, W.L., Song, S.H., *et al.* (2013). ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Mol Cell* *49*, 18-29.

Zhou, J., Wan, J., Gao, X., Zhang, X., Jaffrey, S.R., and Qian, S.B. (2015). Dynamic m(6)A mRNA methylation directs translational control of heat shock response. *Nature* *526*, 591-594.

Zhou, Y., Zeng, P., Li, Y.H., Zhang, Z., and Cui, Q. (2016). SRAMP: prediction of mammalian N6-methyladenosine (m6A) sites based on sequence-derived features. *Nucleic acids research* *44*, e91.

Zinzula, L., and Tramontano, E. (2013). Strategies of highly pathogenic RNA viruses to block dsRNA detection by RIG-I-like receptors: hide, mask, hit. *Antiviral research* *100*, 615-635.

Züst, R., Cervantes-Barragan, L., Habjan, M., Maier, R., Neuman, B.W., Ziebuhr, J., Szretter, K.J., Baker, S.C., Barchet, W., Diamond, M.S., *et al.* (2011). Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5. *Nature immunology* *12*, 137-143.

V Anhang

Sequenz des verwendeten rekombianten Influenzastammes A/Puerto Rico/8/1934
H1N1 (PR8):

Segment 8 (NS)

AGCAAAGCAGGGTGACAAAAACATAATGGATCCAAACACTGTGTCAAGCTTTCAGGTAGATTG
CTTTCTTTGGCATGTCCGCAAACGAGTTGCAGACCAAGAACTAGGCGATGCCCCATTCCTTGAT
CGGCTTCGCCGAGATCAGAAATCCCTAAGAGGAAGGGGCAGTACTCTCGGTCTGGACATCAAGA
CAGCCACACGTGCTGGAAAGCAGATAGTGGAGCGGATTCTGAAAGAAGAATCCGATGAGGCACT
TAAATGACCATGGCCTCTGTACCTGCGTCGCGTTACCTAACTGACATGACTCTTGAGGAAATG
TCAAGGGACTGGTCCATGCTCATAACCAAGCAGAAAGTGGCAGGCCCTCTTTGTATCAGAATGG
ACCAGGCGATCATGGATAAGAACATCATACTGAAAGCGAACTTCAGTGTGATTTTTGACCGGCT
GGAGACTCTAATATTGCTAAGGGCTTTCACCGAAGAGGGAGCAATTGTTGGCGAAATTCACCA
TTGCCTTCTCTCCAGGACATACTGCTGAGGATGTCAAAAATGCAGTTGGAGTCTCATCGGAG
GACTTGAATGGAATGATAACACAGTTCGAGTCTCTGAAACTCTACAGAGATTCGCTTGAGAAG
CAGTAATGAGAATGGGAGACCTCCACTCACTCCAAAACAGAAACGAGAAATGGCGGGAACAATT
AGGTCAGAAGTTTGAAGAAAATAAGATGGTTGATTGAAGAAGTGAGACACAACTGAAGATAACA
GAGAATAGTTTTGAGCAAATAACATTTATGCAAGCCTTACATCTATTGCTTGAAGTGGAGCAAG
AGATAAGAACTTTCTCGTTTTAGCTTATTTAGTACTAAAAAACACCCCTTGTTTTCTACT

Segment 7 (M)

AGCAAAGCAGGTAGATATTGAAAGATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGTACGTACTCTCT
ATCATCCCGTCAGGCCCCCTCAAAGCCGAGATCGCACAGAGACTTGAAGATGTCTTGCAGGGA
AGAACACCGATCTTGAGGTTCTCATGGAATGGCTAAAGACAAGACCAATCCTGTACCTCTGAC
TAAGGGGATTTTAGGATTTGTGTTACGCTCACCGTGCCAGTGAGCGAGGACTGCAGCGTAGA
CGCTTTGTCCAAAATGCCCTTAATGGGAACGGGGATCCAAATAACATGGACAAAGCAGTTAAAC
TGTATAGGAAGCTCAAGAGGGAGATAACATTCATGGGGCCAAAGAAATCTCACTCAGTTATTC
TGCTGGTGCACCTGCCAGTTGTATGGGCTCATATACAACAGGATGGGGGCTGTGACCACTGAA
GTGGCATTGCGCTGGTATGTGCAACCTGTGAACAGATTGCTGACTCCCAGCATCGGTCTCATA
GGCAAATGGTGACAACAACCAATCCACTAATCAGACATGAGAACAGAATGGTTTTAGCCAGCAC
TACAGCTAAGGCTATGGAGCAAATGGCTGGATCGAGTGAGCAAGCAGCAGAGGCCATGGAGGTT
GCTAGTCAGGCTAGACAAATGGTGCAAGCGATGAGAACCATTGGGACTCATCCTAGCTCCAGTG
CTGGTCTGAAAAATGATCTTCTTAAAAATTTGCAGGCCATCAGAAACGAATGGGGGTGCAGAT
GCAACGGTTCAAGTGATCCTCTCACTATTGCCGCAAATATCATTGGGATCTTGCACTTGACATT
GTGGATTCTTGATCGTCTTTTTTTCAAATGCATTTACCGTCGCTTTAAATACGGACTGAAAGGA
GGGCCTTCTACGGAAGGAGTGCCAAAGTCTATGAGGGAAGAATATCGAAAGGAACAGCAGAGTG

CTGTGGATGCTGACGATGGTCATTTTGTCTCAGCATAGAGCTGGAGTAAAAAACTACCTTGTCTTCT
ACT

Segment 6 (NA)

AGCAAAAGCAGGAGTTTAAAATGAATCCAAATCAGAAAATAATAACCATTGGATCAATCTGTCT
GGTAGTCGGACTAATTAGCCTAATATTGCAAATAGGGAATATAATCTCAATATGGATTAGCCAT
TCAATTCAAACTGGAAGTCAAACCATACTGGAATATGCAACCAAAACATCATTACCTATAAAA
ATAGCACCTGGGTAAAGGACACAACCTTCAGTGATATTAACCGGCAATTCATCTCTTTGTCCCAT
CCGTGGGTGGGCTATATACAGCAAAGACAATAGCATAAGAATTGGTTCCAAAGGAGACGTTTTT
GTCATAAGAGAGCCCTTTATTTTCATGTTCTCACTTGGAAATGCAGGACCTTTTTTCTGACCCAAG
GTGCCTTACTGAATGACAAGCATTCAAGTGGGACTGTTAAGGACAGAAGCCCTTATAGGGCCTT
AATGAGCTGCCCTGTCGGTGAAGCTCCGTCCCCGTACAATTCAAGATTTGAATCGGTTGCTTGG
TCAGCAAGTGCATGTCATGATGGCATGGGCTGGCTAACCAATCGGAATTCAGGTCCAGATAATG
GAGCAGTGGCTGTATTAATAACAACGGCATAATAACTGAAACCATAAAAAGTTGGAGGAAGAA
AATATTGAGGACACAAGAGTCTGAATGTGCCTGTGTAAATGGTTCATGTTTTACTATAATGACT
GATGGCCCGAGTGATGGGCTGGCCTCGTACAAAATTTTCAAGATCGAAAAGGGGAAGGTTACTA
AATCAATAGAGTTGAATGCACCTAATTCTCACTATGAGGAATGTTCCCTGTTACCCTGATACCGG
CAAAGTGATGTGTGTGTGCAGAGACAATTGGCATGGTTCGAACCGGCCATGGGTGTCTTTCGAT
CAAACCTGGATTATCAAATAGGATACATCTGCAGTGGGGTTTTTCGGTGACAACCCGCGTCCCC
AAGATGGAACAGGCAGCTGTGGTCCAGTGTATGTTGATGGAGCAAACGGAGTAAAGGGATTTTC
ATATAGGTATGGTAATGGTGTGGATAGGAAGGACCAAAAGTCACAGTTCAGACATGGGTTT
GAGATGATTTGGGATCCTAATGGATGGACAGAGACTGATAGTAAGTTCTCTGTGAGGCAAGATG
TTGTGGCAATGACTGATTGGTCAGGGTATAGCGGAAGTTTCGTTCAACATCCTGAGCTGACAGG
GCTAGACTGTATGAGGCCGTGCTTCTGGGTTGAATTAATCAGGGGACGACCTAAAGAAAAACA
ATCTGGACTAGTGCAGCAGCATTCTTTTTGTGGCGTGAATAGTGATACTGTAGATTGGTCTT
GGCCAGACGGTGCTGAGTTGCCATTTCAGCATTGACAAGTAGTCTGTTCAAAAACCTCCTTGTTT
CTACT

Segment 5 (NP)

AGCAAAAGCAGGGTAGATAATCACTCACTGAGTGACATCAAATCATGGCGTCTCAAGGCACCA
AACGATCTTACGAACAGATGGAGACTGATGGAGAACGCCAGAATGCCACTGAAATCAGAGCATC
CGTCGGAAAAATGATTGGTGAATTGGACGATTCTACATCCAAATGTGCACCCGAACTCAAACCTC
AGTGATTATGAGGGACGGTTGATCCAAAACAGCTTAACAATAGAGAGAATGGTGCTCTCTGCTT
TTGACGAAAGGAGAAATAAATACCTTGAAGAACATCCCAGTGCGGGGAAAGATCCTAAGAAAAC
TGGAGGACCTATATACAGGAGAGTAAACGGAAAGTGGATGAGAGAACTCATCCTTTATGACAAA
GAAGAAATAAGGCGAATCTGGCGCCAAGCTAATAATGGTGACGATGCAACGGCTGGTCTGACTC
ACATGATGATCTGGCATTCCAATTTGAATGATGCAACTTATCAGAGGACAAGAGCTCTTGTTCCG
CACCGBAATGGATCCCAGGATGTGCTCTCTGATGCAAGGTTCAACTCTCCCTAGGAGGTCTGGA

GCCGCAGGTGCTGCAGTCAAAGGAGTTGGAACAATGGTGATGGAATTGGTCAGAATGATCAAAC
GTGGGATCAATGATCGGAACTTCTGGAGGGGTGAGAATGGACGAAAAACAAGAATTGCTTATGA
AGAATGTGCAACATTCTCAAAGGGAAATTTCAAAGTCTGCACAAAAAGCAATGATGGATCAA
GTGAGAGAGAGCCGGAACCCAGGGAATGCTGAGTTTGAAGATCTCACTTTTCTAGCACGGTCTG
CACTCATATTGAGAGGGTTCGGTTGCTCACAAGTCCTGCCTGCCTGCCTGTGTGTATGGACCTGC
CGTAGCCAGTGGGTACGACTTTGAAAGGGAGGGATACTCTCTAGTCGGAATAGACCCTTTCAGA
CTGCTTCAAAACAGCCAAGTGTACAGCCTAATCAGACCAAATGAGAATCCAGCACACAAGAGTC
AACTGGTGTGGATGGCATGCCATTCTGCCGATTTGAAGATCTAAGAGTATTAAGCTTCATCAA
AGGGACGAAGGTGCTCCCAAGAGGGAAGCTTTCCACTAGAGGAGTTCAAATTGCTTCCAATGAA
AATATGGAGACTATGGAATCAAGTACACTTGAAGTGAAGCAGGACTGGGCCATAAGGACCA
GAAGTGGAGGAAACACCAATCAACAGAGGGCATCTGCGGGCCAAATCAGCATAACAACCTACGTT
CTCAGTACAGAGAAATCTCCCTTTTGACAGAACAACCATTTATGGCAGCATTCAATGGGAATACA
GAGGGGAGAACATCTGACATGAGGACCGAAATCATAAGGATGATGGAAAGTGCAAGACCAGAAG
ATGTGTCTTTCCAGGGGCGGGGAGTCTTCGAGCTCTCGGACGAAAAGGCAGCGAGCCCGATCGT
GCCTTCCTTTGACATGAGTAATGAAGGATCTTATTTCTTCGGAGACAATGCAGAGGAGTACGAC
AATTAAGAAAAATACCCTTGTTTCTACT

Segment 4 (HA)

AGCAAAAGCAGGGGAAAATAAAAACAACCAAATGAAGGCAAACCTACTGGTCCTGTTATGTGC
ACTTGCAGCTGCAGATGCAGACACAATATGTATAGGCTACCATGCGAACAATTCAACCGACT
GTTGACACAGTACTCGAGAAGAATGTGACAGTGACACACTCTGTAACTGCTCGAAGACAGCC
ACAACGGAAAACATGTAGATTTAAAAGGAATAGCCCCACTACAATTGGGGAAATGTAACATCGC
CGGATGGCTCTTGGGAAACCCAGAATGCGACCCACTGCTTCCAGTGAGATCATGGTCCTACATT
GTAGAAACACCAAACCTCTGAGAATGGAATATGTTATCCAGGAGATTTTCATCGACTATGAGGAGC
TGAGGGAGCAATTGAGCTCAGTGTTCATTCGAAAGATTGAAATATTTCCCAAAGAAAGCTC
ATGGCCCAACCACAACACAACCGGAGTAACGGCAGCATGCTCCCATGAGGGGAAAAGCAGTTTT
TACAGAAATTTGCTATGGCTGACGGAGAAGGAGGGCTCATACCCAAAGCTGAAAAATCTTATG
TGAACAAAAAGGGAAAGAAGTCCTTGTACTGTGGGGTATTCATCACCCGCTAACAGTAAGGA
ACAACAGAATCTCTATCAGAATGAAAATGCTTATGTCTCTGTAGTGAATCAAATTATAACAGG
AGATTTACCCCGAAATAGCAGAAAGACCCAAAGTAAGAGATCAAGCTGGGAGGATGAACTATT
ACTGGACCTTGCTAAAACCCGGAGACACAATAATTTGAGGCAAATGGAAATCTAATAGCACC
AATGTATGCTTTCGCACTGAGTAGAGGCTTTGGGTCCGGCATCATCACCTCAAACGCATCAATG
CATGAGTGTAACACGAAGTGTCAAACACCCCTGGGAGCTATAAACAGCAGTCTCCCTTACCAGA
ATATACACCCAGTCACAATAGGAGAGTGCCCAAATACGTCAGGAGTGCCAAATTGAGGATGGT
TACAGGACTAAGGAACATTCCGTCCATTCAATCCAGAGGTCTATTTGGAGCCATTGCCGGTTTT
ATTGAAGGGGATGGACTGGAATGATAGATGGATGGTATGGTTATCATCATCAGAATGAACAGG
GATCAGGCTATGCAGCGGATCAAAAAGCACACAAAATGCCATTAACGGGATTACAAACAAGGT
GAACACTGTTATCGAGAAAATGAACATTCAATTCACAGCTGTGGGTAAAGAATTCAACAAATTA

GAAAAAAGGATGGAAAATTTAAATAAAAAAGTTGATGATGGATTTCTGGACATTTGGACATATA
ATGCAGAATTGTTAGTTCTACTGGAAAATGAAAGGACTCTGGATTTCCATGACTCAAATGTGAA
GAATCTGTATGAGAAAGTAAAAAGCCAATTAAGAATAATGCCAAAGAAATCGGAAATGGATGT
TTTGAGTTCTACCACAAGTGTGACAATGAATGCATGGAAAGTGTAAGAAATGGGACTTATGATT
ATCCCAAATATTCAGAAGAGTCAAAGTTGAACAGGGAAAAGGTAGATGGAGTGAAATGGGAATC
AATGGGGATCTATCAGATTCTGGCGATCTACTCAACTGTCGCCAGTTCCTGGTGCTTTTGGTC
TCCCTGGGGCAATCAGTTTCTGGATGTGTTCTAATGGATCTTTGCAGTGCAGAATATGCATCT
GAGATTAGAATTTAGAGATATGAGGAAAAACACCCTTGTTTCTACT

Segment 3 (PA)

AGCGAAAGCAGGTAAGTACTGATCCAAAATGGAAGATTTTGTGCGACAATGCTTCAATCCGATGATTG
TCGAGCTTTCGGAAAAACAATGAAAGAGTATGGGGAGGACCTGAAAATCGAAACAAACAAATT
TGCAGCAATATGCACTCACTTGAAGTATGCTTCATGTATTTCAGATTTTCACTTCATCAATGAG
CAAGGCGAGTCAATAATCGTAGAACTTGGTGATCCAAATGCACTTTTGAAGCACAGATTTGAAA
TAATCGAGGGAAGAGATCGCACAATGGCCTGGACAGTAGTAAACAGTATTTGCAACACTACAGG
GGCTGAGAAACCAAAGTTTCTACCAGATTTGTATGATTACAAGGAGAATAGATTCATCGAAATT
GGAGTAACAAGGAGAGAAGTTCACATATACTATCTGGAAAAGGCCAATAAAATTAATCTGAGA
AAACACACATCCACATTTTCTCGTTCACTGGGGAAGAAATGGCCACAAAGGCAGACTACACTCT
CGATGAAGAAAGCAGGGCTAGGATCAAAACCAGACTATTCACCATAAGACAAGAAATGGCCAGC
AGAGGCCTCTGGGATTCTTTCTCGTCAGTCCGAGAGAGGAGAAGAGACAATTGAAGAAAGTTTG
AAATCACAGGAACAATGCGTAAGCTTGCCGACCAAAGTCTCCCGCCGAACCTTCTCCAGCCTTGA
AAATTTTAGAGCCTATGTGGATGGATTGCAACCGAACGGCTACATTGAGGGCAAGCTGTCTCAA
ATGTCCAAAGAAGTAAATGCTAGAATTGAACCTTTTTTGAAAAACAACACCACGACCCTTAGAC
TTCCGAATGGGCCTCCCTGTTCTCAGCGGTCCAAATTCCTGCTGATGGATGCCTTAAAATTAAG
CATTGAGGACCCAAGTCATGAAGGAGAGGGAATACCGCTATATGATGCAATCAAATGCATGAGA
ACATTCTTTGGATGGAAGGAACCCAATGTTGTTAAACCACACGAAAAGGGAATAAATCCAAATT
ATCTTCTGTATGGAAGCAAGTACTGGCAGAAGTGCAGGACATTGAGAATGAGGAGAAAATTCC
AAAGACTAAAAATATGAAGAAAACAAGTCAAGTAAAGTGGGCACCTTGGTGAGAACATGGCACCA
GAAAAGGTAGACTTTGACGACTGTAAAGATGTAGGTGATTTGAAGCAATATGATAGTGATGAAC
CAGAATTGAGGTCGCTTGCAAGTTGGATTCAGAATGAGTTTAAACAAGGCATGCGAACTGACAGA
TTCAAGCTGGATAGAGCTCGATGAGATTGGAGAAGATGTGGCTCCAATGAACACATTGCAAGC
ATGAGAAGGAATTAATTCACATCAGAGGTGTCTCACTGCAGAGCCACAGAATACATAATGAAGG
GAGTGTACATCAATACTGCCTTGCTTAATGCATCTTGTGCAGCAATGGATGATTTCCAATTAAT
TCCAATGATAAGCAAGTGTAGAATAAGGAGGGAAAGGCCGAAAGACCAACTTGATGGTTTTCATC
ATAAAAGGAAGATCCCACTTAAGGAATGACACCGACGTGGTAAACTTTGTGAGCATGGAGTTTT
CTCTCACTGACCCAAGACTTGAACCACATAAATGGGAGAAGTACTGTGTTCTTGAGATAGGAGA
TATGCTTATAAGAAGTGCCATAGGCCAGGTTTCAAGGCCATGTTCTTGTATGTGAGAACAAAT
GGAACCTCAAAAATTAATGAAATGGGGAATGGAGATGAGGCGTTGCCTCCTCCAGTCACTTC

AACAAATTGAGAGTATGATTGAAGCTGAGTCCTCTGTCAAAGAGAAAGACATGACCAAAGAGTT
CTTTGAGAACAAATCAGAAACATGGCCCATTTGGAGAGTCCCCAAAGGAGTGGAGGAAAGTTCC
ATTGGGAAGGTCTGCAGGACTTTATTAGCAAAGTCGGTATTCAACAGCTTGTATGCATCTCCAC
AACTAGAAGGATTTTCAGCTGAATCAAGAAAAGTCTTCTTATCGTTCAGGCTCTTAGGGACAA
CCTGGAACCTGGGACCTTTGATCTTGGGGGGCTATATGAAGCAATTGAGGAGTGCCTGATTAAT
GATCCCTGGGTTTTGCTTAATGCTTCTTGGTTCAACTCCTTCCTTACACATGCATTGAGTTAGT
TGTGGCAGTGCTACTATTTGCTATCCATACTGTCCAAAAAAGTACCTTGTCTTACT

Segment 2 (PB1)

AGCGAAAGCAGGCAAACCATTTGAATGGATGTCAATCCGACCTTACTTTTCTTAAAAGTGCCAG
CACAAAATGCTATAAGCACAACTTTCCCTTATACTGGAGACCCTCCTTACAGCCATGGGACAGG
AACAGGATACACCATGGATACTGTCAACAGGACACATCAGTACTCAGAAAAGGGAAGATGGACA
ACAAACACCGAAACTGGAGCACCGCAACTCAACCCGATTGATGGGCCACTGCCAGAAGACAATG
AACCAAGTGGTTATGCCCAAACAGATTGTGTATTGGAGGCGATGGCTTTCCTTGAGGAATCCCA
TCCTGGTATTTTTGAAAAGTCTGTGTATTGAAACGATGGAGGTTGTTTTCAGCAAACACGAGTAGAC
AAGCTGACACAAGGCCGACAGACCTATGACTGGACTCTAAATAGAAACCAACCTGCTGCAACAG
CATTGGCCAACACAATAGAAGTGTTCAGATCAAATGGCCTCACGGCCAATGAGTCTGGAAGGCT
CATAGACTTCCTTAAGGATGTAATGGAGTCAATGAACAAAGAAGAAATGGGGATCACAACTCAT
TTTCAGAGAAAAGAGACGGGTGAGAGACAATATGACTAAGAAAATGATAACACAGAGAACAATGG
GTAAAAAGAAGCAGAGATTGAACAAAAGGAGTTATCTAATTAGAGCATTGACCCTGAACACAAT
GACCAAAGATGCTGAGAGAGGGAAGCTAAAACGGAGAGCAATTGCAACCCAGGGATGCAAATA
AGGGGGTTTTGTATACTTTGTTGAGACACTGGCAAGGAGTATATGTGAGAACTTGAACAATCAG
GGTTGCCAGTTGGAGGCAATGAGAAGAAAAGCAAAGTTGGCAAATGTTGTAAGGAAGATGATGAC
CAATTCTCAGGACACCGAACTTTCTTTTACCATCACTGGAGATAACACCAAATGGAACGAAAAT
CAGAATCCTCGGATGTTTTTGGCCATGATCACATATATGACCAGAAAATCAGCCCGAATGGTTCA
GAAATGTTCTAAGTATTGCTCCAATAATGTTCTCAAACAAAATGGCGAGACTGGGAAAAGGGTA
TATGTTTGAGAGCAAGAGTATGAAACTTAGAACTCAAATACCTGCAGAAATGCTAGCAAGCATC
GATTTGAAATATTTCAATGATTCAACAAGAAAGAAGATTGAAAAAATCCGACCGCTCTTAATAG
AGGGGACTGCATCATTGAGCCCTGGAATGATGATGGGCATGTTCAATATGTTAAGCACTGTATT
AGGCGTCTCCATCCTGAATCTTGGACAAAAGAGATACACCAAGACTACTTACTGGTGGGATGGT
CTTCAATCCTCTGACGATTTTGTCTGATTGTGAATGCACCCAATCATGAAGGGATTCAAGCCG
GAGTCGACAGGTTTTATCGAACCTGTAAGCTACTTGGAAATCAATATGAGCAAGAAAAAGTCTTA
CATAAACAGAACAGGTACATTTGAATTCACAAGTTTTTTCTATCGTTATGGGTTTTGTTGCCAAT
TTCAGCATGGAGCTTCCCAGTTTTGGGGTGTCTGGGATCAACGAGTCAGCGGACATGAGTATTG
GAGTTACTGTCATCAAAAACAATATGATAACAATGATCTTGGTCCAGCAACAGCTCAAATGGC
CCTTCAGTTGTTTCAATCAAGATTACAGGTACACGTACCGATGCCATATAGGTGACACACAAATA
CAAACCCGAAGATCATTGAAATAAAGAACTGTGGGAGCAAACCCGTTCCAAAGCTGGACTGC
TGGTCTCCGACGGAGGCCCAAATTTATAACAATTAGAAATCTCCACATTCCTGAAGTCTGCCT

AAAATGGGAATTGATGGATGAGGATTACCAGGGGCGTTTATGCAACCCACTGAACCCATTTGTC
AGCCATAAAGAAATTGAATCAATGAACAATGCAGTGATGATGCCAGCACATGGTCCAGCCAAAA
ACATGGAGTATGATGCTGTTGCAACAACACACTCCTGGATCCCCAAAAGAAATCGATCCATCTT
GAATACAAGTCAAAGAGGAGTACTTGAGGATGAACAAATGTACCAAAGGTGCTGCAATTTATTT
GAAAAATTCTTCCCCAGCAGTTCATACAGAAGACCAGTCGGGATATCCAGTATGGTGGAGGCTA
TGGTTTCCAGAGCCCGAATTGATGCACGGATTGATTTTGAATCTGGAAGGATAAAGAAAGAAGA
GTTCACTGAGATCATGAAGATCTGTTCCACCATTGAAGAGCTCAGACGGCAAAAATAGTGAATT
TAGCTTGTCTTCATGAAAAAATGCCTTGTCTACT

Segment 1 (PB2)

AGCGAAAGCAGGTCAATTATATTCAATATGGAAAGAATAAAAGAACTACGAAATCTAATGTCGC
AGTCTCGCACCCGCGAGATACTCACAAAACCACCGTGGACCATATGGCCATAATCAAGAAGTA
CACATCAGGAAGACAGGAGAAGAACCAGCACTTAGGATGAAATGGATGATGGCAATGAAATAT
CCAATTACAGCAGACAAGAGGATAACGGAAATGATTCTGAGAGAAAATGAGCAAGGACAAACTT
TATGGAGTAAAATGAATGATGCCGGATCAGACCGAGTGATGGTATCACCTCTGGCTGTGACATG
GTGGAATAGGAATGGACCAATAACAAATACAGTTTATTATCCAAAAATCTACAAAACCTATTTTT
GAAAGAGTCGAAAGGCTAAAGCATGGAACCTTTGGCCCTGTCCATTTTAGAAACCAAGTCAAAA
TACGTCGGAGAGTTGACATAAATCCTGGTCATGCAGATCTCAGTGCCAAGGAGGCACAGGATGT
AATCATGGAAGTTGTTTTCCCTAACGAAGTGGGAGCCAGGATACTAACATCGGAATCGCAACTA
ACGATAACCAAAGAGAAGAAAGAAGAACTCCAGGATTGCAAAATTTCTCCTTTGATGGTTGCAT
ACATGTTGGAGAGAGAACTGGTCCGCAAAACGAGATTCCTCCCAGTGGCTGGTGGAAACAAGCAG
TGTGTACATTGAAGTGTTCATTTGACTCAAGGAACATGCTGGGAACAGATGTATACTCCAGGA
GGGGAAGTGAGGAATGATGATGTTGATCAAAGCTTGATTATTGCTGCTAGGAACATAGTGAGAA
GAGCTGCAGTATCAGCAGATCCACTAGCATCTTTATTGGAGATGTGCCACAGCACACAGATTGG
TGGAATTAGGATGGTAGACATCCTTAGGCAGAACCCAACAGAAGAGCAAGCCGTGGATATATGC
AAGGCTGCAATGGGACTGAGAATTAGCTCATCCTTCAGTTTTGGTGGATTACATTTAAGAGAA
CAAGCGGATCATCAGTCAAGAGAGAGGAAGAGGTGCTTACGGGCAATCTTCAAACATTGAAGAT
AAGAGTGCATGAGGGATATGAAGAGTTCACAATGGTTGGGAGAAGAGCAACAGCCATACTCAGA
AAAGCAACCAGGAGATTGATTCAGCTGATAGTGAGTGGGAGAGACGAACAGTCGATTGCCGAAG
CAATAATTGTGGCCATGGTATTTTACAAGAGGATTGTATGATAAAAAGCAGTCAGAGGTGATCT
GAATTTTCGTCAATAGGGCGAATCAACGATTGAATCCTATGCATCAACTTTTAAGACATTTTCAG
AAGGATGCGAAAGTGCTTTTTTCAAATTTGGGAGTTGAACCTATCGACAATGTGATGGGAATGA
TTGGGATATTGCCCGACATGACTCCAAGCATCGAGATGTCAATGAGAGGAGTGAGAATCAGCAA
AATGGGTGTAGATGAGTACTCCAGCACGGAGAGGGTAGTGGTGAGCATTGACCGTTTTTTGAGA
ATCCGGGACCAACGAGGAAATGTACTACTGTCTCCCGAGGAGGTGAGTAAACACAGGGAACAG
AGAACTGACAATAACTTACTCATCGTCAATGATGTGGGAGATTAATGGTCCTGAATCAGTGTT
GGTCAATACCTATCAATGGATCATCAGAACTGGGAACTGTTAAAATTCAGTGGTCCCAGAAC
CCTACAATGCTATAACAATAAAATGGAATTTGAACCATTTAGTCTTTAGTACCTAAGGCCATTA

GAGGCCAATACAGTGGGTTTGTAAGAACTCTGTTCCAACAAATGAGGGATGTGCTTGGGACATT
TGATACCGCACAGATAATAAACTTCTTCCCTTCGCAGCCGCTCCACCAAAGCAAAGTAGAATG
CAGTTCTCCTCATTTACTGTGAATGTGAGGGGATCAGGAATGAGAATACTTGTAAGGGGCAATT
CTCCTGTATTCAACTATAACAAGGCCACGAAGAGACTCACAGTTCTCGGAAAGGATGCTGGCAC
TTTAACTGAAGACCCAGATGAAGGCACAGCTGGAGTGGAGTCCGCTGTTCTGAGGGGATTCCTC
ATTCTGGGCAAAGAAGACAAGAGATATGGGCCAGCACTAAGCATCAATGAACTGAGCAACCTTG
CGAAAGGAGAGAAGGCTAATGTGCTAATTGGGCAAGGAGACGTGGTGTGGTAATGAAACGGAA
ACGGGACTCTAGCATACTTACTGACAGCCAGACAGCGACCAAAGAATTCCGGATGGCCATCAAT
TAGTGTCGAATAGTTTAAAAACGACCTTGTTTCTACT

VI Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren der Philipps-Universität Marburg:

Aigner, Bauer S., Bauer U., Becker, Brehm, Bremmer, Buchholz, Cherkasov, Daut, Dehnen, Elsässer, Feuser, Garten, Greiner, Grzeschik, Hertl, Hoyer, Huber, Jacob, Kaufmann, Käuser, Koolmann, Lill, Lingelbach, Lohoff, Milani, Maisner, Matrosovich, Müller, Müller-Brüsselbach, Oeffner, Pfefferle, Plant, Preisig-Müller, Röhm, Schäfer, Schnare, Steinhoff, Suske, Vollmer, Weber, Westermann, Wrocklage, Yu, Zemlin

VII Danksagung

Zunächst danke ich Herrn Prof. Bauer für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit im Institut für Immunologie durchführen zu können, für die Bereitstellung des interessanten Themas, durch das ich ein breites Methodenspektrum lernen konnte und für die wissenschaftliche Begleitung während meiner Promotion.

Ein besonderer Dank gilt auch Dr. Andreas Kaufmann für die fachliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft, mit der er mir stets zur Seite stand, für die vielen Ideen und für das Korrekturlesen der Arbeit. Ich werde die Zeit meiner Promotion auch dank der tollen Atmosphäre in der Arbeitsgruppe immer in bester Erinnerung behalten.

Vielen Dank auch an Hannah und Stephi: ihr habt mich immer unterstützt, hattet stets ein offenes Ohr und wir haben einiges zusammen erlebt. Insbesondere an die Zeit in Wien werde ich mich immer gerne erinnern.

Danke auch an alle anderen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, die mir so manches Mal geholfen haben, insbesondere Jens, Sandra, Jenny, Gernot und Steffi. Gundi möchte ich ganz herzlich für die Organisation der Bestellungen und die netten Gespräche zwischendurch danken, ebenso Marion, die so manche Formalitäten für mich erledigt hat. Allen anderen Mitgliedern des Instituts danke ich für die nette und familiäre Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und das kollegiale Miteinander: ich hatte eine schöne Zeit mit euch und werde euch vermissen!

Herrn Dr. Mikhail Matrosovich danke ich für die Bereitstellung der Influenza-Plasmide und für die fachliche Unterstützung während meiner Promotion, ebenso auch den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe, insbesondere Thomas, Jan und Johanna, die mir Tipps zu Methoden gegeben haben und zeitweise das Labor mit mir geteilt haben.

Desweiteren danke ich Herrn Oliver Rupp für die Hilfe bei der bioinformatischen Auswertung der NGS-Daten. Christina und Anna-Lena aus dem Institut für Lungenforschung möchte ich außerdem ganz herzlich für die Hilfe mit dem Bioanalyzer danken, der mir meine Arbeit so manches mal erleichtert hat.

Danke auch an alle, die mich im Rahmen von Praktika unterstützt haben: Anke, Mareike, Ulrike, Meike und Gloria.

Zuletzt möchte ich meine Eltern, meine Schwester Gloria und Benjamin erwähnen: danke, dass ihr mir immer zur Seite steht, danke für eure Unterstützung und für das Zuhause, was ich bei euch habe.