

# Die Bedeutung der Serinprotease TMPRSS2 im Kontext von Influenza-A-Virus-Infektionen im Haushuhn

Sabrina Teresa Schleibinger

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Life Sciences der Technischen  
Universität München zur Erlangung einer  
Doktorin der Naturwissenschaft (Dr. rer. nat.)  
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Harald Luksch

Prüfer\*innen der Dissertation:

1. Prof. Dr. Benjamin Schusser
2. Prof. Dr. Friederike Ebner

Die Dissertation wurde am 10.03.2023 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die TUM School of Life Sciences am 26.06.2023 angenommen.

Meinen Liebsten.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	V
<b>Summary</b> .....	VI
<b>1. Einleitung</b> .....	7
1.1. Influenza-A-Virus .....	9
1.1.1. Aufbau des Influenza-A-Virus .....	9
1.1.2. Klassifizierung der verschiedenen Influenza A Subtypen .....	11
1.1.3. Die Influenza-Infektion .....	13
1.1.4. Der Einfluss des Hämagglutinins .....	15
1.2. TMPRSS2 .....	17
1.2.1. Aktueller Wissensstand und struktureller Aufbau des TMPRSS2 im Menschen und in der Maus .....	17
1.2.2. Struktureller Aufbau des TMPRSS2 im Huhn .....	18
1.2.3. Erstellung von <i>TMPRSS2</i> <sup>-/-</sup> Tieren .....	18
1.2.3.1. Erstellung von <i>TMPRSS2</i> <sup>-/-</sup> Mäusen .....	18
1.2.3.2. Erstellung von <i>TMPRSS2</i> <sup>-/-</sup> Schweinen.....	19
1.2.4. Anfälligkeit von <i>TMPRSS2</i> <sup>-/-</sup> Mäusen gegenüber Influenza-A-Virus-Infektionen	20
1.3. Targeting der Serinproteasen mit Inhibitoren als Alternative zum Gene-Editing	21
1.3.1. Aprotinin .....	21
1.3.2. Camostatmesilat .....	22
1.3.3. Verwendung von Aprotinin und Camostatmesilat im Huhn.....	23
1.4. Erstellung genetisch veränderter Hühner .....	24
1.4.1. Erstellung genetisch veränderter Hühner mithilfe von Primordialen Keimzellen (PGC) .....	24
1.4.2. CRISPR/Cas9 .....	26
1.5. Zielsetzung der Arbeit .....	28
<b>2. Material</b> .....	29
2.1. Geräte und Ausrüstung .....	29
2.2. Verbrauchsmaterialien .....	31
2.3. Tiere, Zellen, Bakterien, Viren .....	32
2.4. Chemikalien .....	33
2.4.1. Zellkulturmedien und Zusätze .....	33
2.4.2. Zusätze für die molekularbiologische Methoden.....	34
2.4.3. Histologie .....	35
2.4.4. Protein-Produktion .....	35
2.5. Medien, Zusammensetzungen und Zusätze .....	36
2.5.1. Zellkultur .....	36
2.5.2. Molekularbiologische Methoden .....	38
2.5.3. Bakterien und Klonierung.....	40
2.5.4. Histologie .....	40
2.5.5. Proteinproduktion und -analyse .....	41

2.6. Enzyme, Puffer und Chemikalien.....	43
2.6.1. Restriktionsenzyme.....	43
2.6.2. Weitere Enzyme und damit verbundene Puffer und Chemikalien .....	43
2.7. Antikörper.....	44
2.8. Kits .....	44
2.9. Primer und Oligonukleotide.....	46
2.9.1. Primer .....	46
2.9.2. Oligonukleotide .....	47
2.10. DNA-Vektoren und generierte Konstrukte .....	48
2.11. Software und verwendete Online-Dienste .....	54
<b>3. Methoden .....</b>	<b>56</b>
3.1. Zellkultur .....	56
3.1.1. Auftauen der Zellen.....	56
3.1.2. Kultivierung von Suspensionszellen .....	56
3.1.3. Kultivierung von adhärennten Zellen .....	57
3.1.4. Zählen der Zellen .....	58
3.1.5. Transfektion von Suspensionszellen .....	58
3.1.5.1. Transfektion der DT40 Zellen .....	58
3.1.5.2. Transfektion der PGCs .....	58
3.1.6. Transfektion von adhärennten Zellen .....	59
3.1.7. Selektion der transfizierten Zellen mit Antibiotikum .....	59
3.1.8. Kryokonservierung .....	60
3.2. Tiere und Tierhaltung.....	60
3.2.1. Erstellung von Keimbahn-Chimären .....	60
3.2.2. Sammeln von Sperma-Proben.....	61
3.2.3. Blutabnahme.....	62
3.3. Molekularbiologische Methoden .....	62
3.3.1. Isolierung genomischer DNA .....	62
3.3.2. Isolierung von RNA .....	63
3.3.3. cDNA-Synthese .....	65
3.3.4. Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	65
3.3.4.1. PCR zur Geschlechtsbestimmung.....	68
3.3.4.2. PCR für den Nachweis des KOs der TMPRSS2 Serinprotease-Domäne	69
3.3.4.3. PCR zum Nachweis von Cas9.....	69
3.3.4.4. PCRs für Klonierungen.....	70
3.3.4.5. Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR).....	70
3.3.5. Agarose-Gelelektrophorese .....	70
3.3.6. DNA-Aufreinigung .....	71
3.3.6.1. DNA-Aufreinigung aus einem PCR-Produkt.....	71
3.3.6.2. DNA-Aufreinigung aus einem Gel-Stück .....	71
3.3.7. Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration mit dem NanoDrop™ Lite.....	72

3.4. Klonierung .....	72
3.4.1. Ligation in den pGEM-T <sup>®</sup> Easy Backbone .....	72
3.4.2. Gibson Assembly .....	73
3.4.3. CRISPR Klonierung .....	73
3.4.4. Transformation in kompetente Bakterien .....	75
3.4.5. Kultivierung der Bakterien .....	76
3.4.6. Erstellen eines Glycerolstocks .....	76
3.4.7. Plasmid-Isolierung .....	76
3.4.8. Konzentrieren der DNA .....	77
3.4.9. Restriktionsverdau .....	78
3.4.10. Sanger-Sequenzierung .....	78
3.5. <i>In vitro</i> Influenza-A-Virus-Infektionen .....	79
3.5.1. Erstellen von Virenstämmen mit ungespaltenem HA0 .....	79
3.5.2. Lösen und Verdünnen der Inhibitoren Aprotinin und Camostatmesilat .....	79
3.5.3. Bestimmung des Virus-Titers durch die Titration auf MDCK-Zellen .....	80
3.5.3.1. Titration des Virus und Infektion der MDCK-Zellen .....	80
3.5.3.2. Immunfluoreszenz-Färbung der Zellen .....	80
3.6. Trachealorgankulturen (TOCs) .....	81
3.6.1. Isolierung der Trachealorgankulturen .....	81
3.6.2. TOCs: Influenza-A-Virus-Infektion .....	81
3.7. Histologie und Immunfluoreszenz-Färbung .....	83
3.7.1. TOCs: Immunfluoreszenzfärbung .....	83
3.7.2. Organe: TMPRSS2 .....	84
3.8. Produktion eines polyklonalen Serums in Kaninchen .....	84
3.8.1. Proteinproduktion in <i>E. Coli</i> BL21(DE3) .....	85
3.8.2. Proteinaufreinigung .....	86
3.9. Proteinanalyse .....	86
3.9.1. SDS PAGE .....	86
3.9.2. Western Blot .....	88
3.9.3. Coomassie-Brilliant Blue R-250-Färbung .....	89
3.9.4. Massenspektroskopische Analyse .....	89
3.10. Bioinformatische Analyse .....	89
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>91</b>
4.1. Ubiquitäre Expression von <i>chTMPRSS2</i> in Organen und in DF-1 Zellen .....	91
4.2. Erstellung einer genetisch veränderter Hühnerlinie mit einem KO der Serinprotease-Domäne des TMPRSS2 .....	92
4.2.1. Targeting Strategie und Etablierung einer PCR zum Nachweis eines KOs der TMPRSS2 Serinprotease-Domäne .....	92
4.2.2. KO der TMPRSS2 Serinprotease-Domäne mittels CRISPR/Cas9 .....	93
4.2.3. KO der TMPRSS2 Serinprotease-Domäne mittels CRISPR/Cas9 in DF-1 Zellen .....	98

4.2.4. Erstellung genetisch veränderter PGCs mit einem KO der TMPRSS2-Serinprotease-Domäne .....	99
4.2.5. Erstellung der Keimbahn-Chimären mit einem KO der TMPRSS2 Serinprotease-Domäne und Nachweis der genetischen Veränderung im Sperma .....	103
4.3. Proteinproduktion von chTMPRSS2 in <i>E. Coli BL21(DE3)</i> .....	105
4.3.1. Klonierung des pET45b(+)- <i>chTMPRSS2</i> Konstrukts .....	105
4.3.2. Produktion und Aufreinigung von chTMPRSS2 aus <i>E. Coli BL21(DE3)</i> unter Verwendung eines N-terminalen His-Tags .....	106
4.3.3. Klonierung des pet45b(+)- <i>chTMPRSS2</i> -Exon8-14 Konstrukts .....	110
4.3.4. Produktion und Aufreinigung der chTMPRSS2-SCRC-Serinprotease-Domäne (Exon 8 bis 14) aus <i>E. Coli BL21(DE3)</i> unter der Verwendung eines N-terminalen His-Tags .....	111
4.4. Immunhistologische Detektion von chTMPRSS2 .....	116
4.5. Blockieren der Serinprotease-Aktivität mittels der Inhibitoren Aprotinin und Camostatmesilat .....	118
4.5.1. Herstellung von H1N1, H9N2 und H6N8-Virenstocks mit ungespaltenem HA0 .....	118
4.5.2. Kein negativer Effekt auf die Zilienaktivität in den TOCs durch die Behandlung mit den Serinprotease-Inhibitoren Aprotinin und Camostatmesilat .....	118
4.5.3. Camostatmesilat schützt die TOCs effektiver als Aprotinin während einer H9N2-Infektion mit ungespaltenem HA0 .....	120
4.5.4. Camostatmesilat schützt die TOCs auch während einer H9N2 Infektionen mit gespaltenem HA .....	125
4.5.5. H1N1 mit ungespaltenem HA0 kann die TOCs nicht so effektiv infizieren wie H9N2 .....	127
4.5.6. Camostatmesilat schützt die TOCs während einer H6N8 Infektion mit ungespaltenem HA0 .....	130
4.5.7. Camostatmesilat schützt die TOCs auch während einer H6N8 Infektion mit gespaltenem HA .....	133
<b>5. Diskussion</b> .....	136
5.1. Erfolgreiche Detektion eines <i>TMPRSS2<sup>+/-</sup></i> Genotypen in den Sperma-Proben der Chimären .....	136
5.2. <i>In vitro</i> Produktion und Aufreinigung des chTMPRSS2 bietet viele Möglichkeiten zur Optimierung der Proteinausbeute .....	138
5.3. Organkulturen als Tool zum Testen von Virus-Wirt-Wechselwirkungen .....	140
<b>6. Zusammenfassung und Ausblick</b> .....	147
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	148
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	152
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	154
<b>Danksagung</b> .....	171

# Zusammenfassung

Hühner (*Gallus gallus domesticus*) sind als essenzielle Proteinquelle in der Ernährung des Menschen eines der wichtigsten Nutztiere weltweit. Krankheitserreger, wie beispielsweise Influenza-A-Viren, geben jedoch aufgrund ihres zoonotischen Potenzials und der Bedrohung des Tierwohls Anlass zu großer Sorge. Strategien zur Verbesserung des Schutzes gegenüber Influenza-A-Virus-Infektionen werden dringend benötigt. Ein Weg, die Infektion von Hühnern mit Influenza-A-Viren zu verhindern, ist die Manipulation des Infektionsweges des Virus. Die Transmembran-Protease Serin S1 Subtyp 2 (TMPRSS2) spielt eine entscheidende Rolle bei der posttranslationalen Modifikation des viralen Oberflächenproteins Hämagglutinins (HA) der niedrigpathogenen aviären Influenza-Viren. Dabei wird die inaktive Form HA0 an der monobasischen Spaltstelle in die Untereinheiten HA1 und HA2 gespalten, wodurch nachfolgend die Infektion der Zelle möglich wird. Die Untersuchung von Wirtsproteasen stellt ein vielversprechendes Ziel dar, um die Interaktion zwischen Wirt und Erreger zu unterbrechen. Eine Möglichkeit, die Aktivität von TMPRSS2 zu beeinflussen, besteht darin, genetisch veränderte Hühner mit einem Knock-out (KO) der TMPRSS2 Serinprotease-Domäne zu erzeugen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine CRISPR/Cas9-basierte Strategie für einen KO der TMPRSS2 Serinprotease-Domäne in primordialen Keimzellen (PGC) im Huhn etabliert. Weiterhin wurden zwei verschiedene Arten von Serinprotease-Inhibitoren, Aprotinin und Camostatmesilat, die für ihre Hemmung der HA-Spaltung bekannt sind, verwendet. In diesem Zusammenhang wurden das erste Mal tracheale Organkulturen (TOCs) verwendet, um den Effekt der beiden Inhibitoren im Kontext einer Influenza-A-Virus-Infektion in den oberen Atemwegen des Huhns zu untersuchen. Die TOCs wurden aus der Trachea von Hühnerembryonen isoliert, mit den Protease-Inhibitoren behandelt und anschließend mit den aviären Influenza-Viren H9N2 und H6N8 infiziert. Die Behandlung mit Camostatmesilat führte zu einer längeren Überlebensrate der *ex vivo*-Kulturen, wie die Zilienaktivität zeigte, und führte zu einer signifikanten Verringerung der Replikation von H9N2 und H6N8 im Vergleich zu den unbehandelten Proben. Darüber hinaus wurde erfolgreich ein Antikörper identifiziert, der für den Nachweis des TMPRSS2-Proteins von Hühnern (chTMPRSS2) verwendet werden kann, was die Grundlagenforschung über Hühnerproteasen in Zukunft erleichtern wird. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass TMPRSS2 ein vielversprechendes Target für die Verbesserung des Schutzes von Hühnern gegenüber niedrigpathogenen aviären Influenza-Viren darstellt und *TMRSS2*<sup>-/-</sup> Hühner weniger empfindlich für niedrigpathogene aviäre Influenza-Viren sein könnten.

## Summary

Chickens (*Gallus gallus domesticus*) as an essential source of protein in the human diet are one of the most important livestock animals worldwide. However, pathogens such as Influenza A viruses are a major concern due to their zoonotic potential and threat to animal welfare. Strategies to improve protection against Influenza A virus infections are urgently needed. One way to prevent infection of chickens with Influenza A viruses is to manipulate the viral infection pathway. The transmembrane protease serine S1 subtype 2 (TMPRSS2) plays a major role in the posttranslational modification of the viral surface protein hemagglutinin (HA) of low pathogenic avian Influenza viruses. Thereby, the inactive form HA0 is cleaved at the monobasic cleavage site into the subunits HA1 and HA2, which subsequently enables infection of the cell. The investigation of host proteases represents a promising target to interrupt the interaction between host and pathogen. One way to interfere with TMPRSS2 activity is to generate genetically modified chickens with a knock out (KO) of the TMPRSS2 serine protease domain. In this thesis, a CRISPR/Cas9-based strategy for a KO of the TMPRSS2 serine protease domain in chicken primordial germ cells (PGC) was established. Furthermore, two different types of serine protease inhibitors, aprotinin and camostat mesylate, known for their inhibition of HA cleavage, were used. In this context, tracheal organ cultures (TOCs) were used for the first time to study the effect of the two inhibitors in the context of Influenza A virus infection in the upper airway of the chicken. TOCs were isolated from the trachea of chicken embryos, treated with the protease inhibitors, and then infected with avian Influenza viruses H9N2 and H6N8. Treatment with camostat mesylate resulted in longer survival of *ex vivo* cultures, as shown by ciliary activity, and significantly decreased replication of H9N2 and H6N8 compared to the untreated samples. Furthermore, an antibody was successfully identified that can be used for the detection of chicken TMPRSS2 protein (chTMPRSS2), which will help basic research on chicken proteases in the future. In conclusion, TMPRSS2 was shown to be a promising target for improving the protection of chickens against low pathogenic avian Influenza viruses and *TMPRSS2*<sup>-/-</sup> chickens may be less susceptible to low pathogenic avian Influenza viruses.



# 1. Einleitung

Das Huhn zählt zu den wichtigsten Lieferanten für Eier und Fleisch und stellt eine essenzielle tierische Proteinquelle dar, um die Ernährung der wachsenden Weltbevölkerung zu sichern [1-4]. Im Durchschnitt bedingt jeder Mensch weltweit jährlich die Produktion von acht Hühnern [3]. Der Vorteil der Hühner im Vergleich zu anderen Nutztieren, wie beispielsweise den Rindern, besteht in der, vergleichsweise, nachhaltigen Haltung [5], sowie in der sehr guten Futterumwandlungsrate der Tiere [6]. Zusätzlich dazu, dass das Huhn ein bedeutendes Nutztier ist [1, 2], hat es aber ebenso eine wichtige Rolle in der biologischen Forschung, einerseits um therapeutische Proteine im Ei herzustellen [1, 7], aber auch als Modellorganismus zum Beispiel für die Entwicklungsbiologie [8]. Darüber hinaus beschäftigt sich die Wissenschaft auch damit, Krankheitsresistenzen im Huhn zu entwickeln [1].

Daher stellen Erkrankungen im Allgemeinen, welche beispielsweise durch Influenza-A-Viren [9], Herpes-Viren, wie die Marek's Disease Viren (MDVs) [10], oder auch durch infektiöse Bronchitis-Viren (IBVs) [11] ausgelöst werden, eine große Bedrohung dar. Das Influenza-A-Virus hat ein sehr breites Wirtsspektrum und kann zum Beispiel Pferde, Schweine, Hühner, Katzen, Hunde und auch – aufgrund dessen zoonotischen Potentials – Menschen infizieren [9, 12-16]. Das natürliche Reservoir des Erregers sind die Wasservögel, wie zum Beispiel die Enten [12, 14, 17].

Neben den gesundheitlichen Aspekten und dem Wohlergehen von Mensch und Tier kann der Erreger auch große finanzielle Einbußen verursachen [9, 18, 19]. Ein weiteres großes Problem ist die Gefahr einer pandemischen Ausbreitung der Influenza-Viren [9, 18, 20, 21]. Pandemien stellen allgemein ein großes Problem für die Menschheit dar [22-24]. Das aktuelle Beispiel ist SARS-CoV 2, welches Covid19 auslöste [23, 25]. Ebenso bekannt ist die Spanische Grippe, welche durch den Influenza-Stamm H1N1 ausgelöst wurde und 1918 und 1919 ein großes Problem weltweit darstellte. Die Pandemie forderte bis zu 50 Mio. Todesopfer weltweit, darunter waren besonders viele gesunde Erwachsene zwischen 15 und 34 Jahre [26]. Ein weiteres Beispiel ist die Schweinegrippe, welche ebenfalls durch H1N1 ausgelöst wurde und woran im Jahr 2009 weltweit schätzungsweise zwischen ca. 150.000 und 550.000 Menschen starben [27].

Eine mögliche Strategie im Kampf gegen Influenza-A-Viren kann das Targeting von Serinproteasen des Wirts sein [28, 29]. Diese werden benötigt, um das Virus durch die posttranslationale Spaltung des Hämagglutinins (HA) zu aktivieren und die Infektion so erst zu ermöglichen [28, 30]. Im Fall von niedrigpathogenen aviären Influenza-Viren ist die Transmembran-Protease Serin S1 Subtyp S2 (TMPRSS2) ein essenzielles Protein

für diese Modifikation des viralen Oberflächenproteins, weshalb diese Protease ein vielversprechendes Target im Kampf gegen Influenza-A-Viren darstellt [28, 30, 31]. Ein entscheidendes Problem bei Therapieansätzen, welche virale Mechanismen adressieren, ist die Entwicklung von Resistenzen [32-34], welche wiederum durch Strategien, welche bei Wirtsproteinen ansetzen, umgangen werden kann.

Eine Möglichkeit, um eine Influenza-A-Virus-Infektion zu verhindern, besteht darin, einen TMPRSS2 Knock-out (KO) im Organismus – in diesem Fall im Huhn – zu generieren. Das ist mithilfe von CRISPR (clustered regularly interspaced palindromic repeat)/ Cas9 (CRISPR-associated protein 9) [35] möglich, indem die Serinprotease-Domäne entfernt wird, welche für die enzymatische Funktion des Proteins codiert [36]. Dieselbe Strategie wurde bereits verwendet, um *TMPRSS2*<sup>-/-</sup> Mäuse über homologe Rekombination zu generieren [36], welche aufgrund dieser Modifikation einen Schutz bei einer Influenza-A-Virus-Infektion haben [37-39].

Eine andere Möglichkeit beschreibt die Verwendung von Serinprotease-Inhibitoren. Ein Beispiel dafür ist Aprotinin [34] oder Camostatmesilat [22]. Der Effekt beider Wirkstoffe wurden bereits erfolgreich im Zusammenhang einer Influenza-A-Virus-Infektion in *in vitro*-, *in ovo*- und *in vivo*-Experimenten bestätigt [29, 40-42]. Auch hierbei wird die Spaltung des HAs des Erregers und damit die Infektion verhindert [34].

Zum jetzigen Zeitpunkt ist das Wissen über die Wirtsproteasen im Huhn und deren Einfluss während einer Virus-Infektion noch sehr eingeschränkt. Da Influenza-Virus-Infektionen allerdings eine permanente Gefahr für die Geflügelindustrie darstellen [43-45], ist die Entwicklung neuer Tools in der Wissenschaft, die ein noch genaueres Verständnis der Interaktion zwischen Wirt und Erreger ermöglichen, unerlässlich. Dazu gehören das Gene-Editing [46], die Verwendung von Organkulturen als Alternative zu *in vivo*-Studien [14, 47] und die Untersuchung verschiedener Strategien für das gezielte Adressieren von Wirtsproteasen [22, 36, 37].

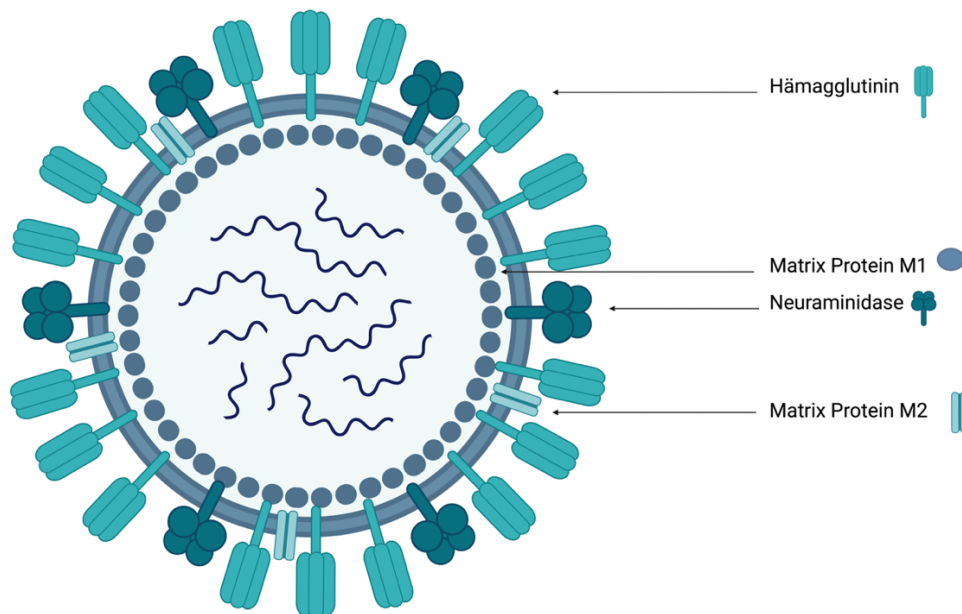
## 1.1. Influenza-A-Virus

Das Influenza-Virus gehört neben dem Thogotovirus, Isavirus und Quaranjavirus zur Familie der *Orthomyxoviridae* [48-51]. Außerdem unterscheidet man die Influenza-Viren basierend auf deren Matrixprotein 1 (M1) sowie dem Nukleoprotein (NP) zwischen Influenza-A, Influenza-B, Influenza-C und Influenza-D-Viren [48]. Die Influenza-Viren gehören zu den behüllten RNA-Viren, deren Genom einzelsträngig, in der anti-sense Orientierung ((-)ssRNA) in Segmenten organisiert ist. Dabei haben Influenza-A-Viren und Influenza-B-Viren acht, wohingegen die anderen beiden Gruppen sieben Segmente besitzen [52-56]. Pandemien können vor allem durch Influenza-A-Viren ausgelöst werden [57], da diese Subfamilie ein breites Wirtsspektrum und eine hohe genetische Fitness aufweisen [34, 58]. Influenza-B und Influenza-C-Viren befallen fast ausschließlich den Menschen, wobei letztere vor allem in Kindern bis zum Vorschulalter nachgewiesen werden [48, 59]. Influenza-D-Viren werden typischerweise im Rind und im Schwein beschrieben [48, 55].

Allgemein kann das Influenza-A-Virus auf verschiedenen Wegen übertragen werden. Bei Vögeln erfolgt die Verbreitung typischerweise über die fäkal-orale Transmission [17, 60]. Bei den Menschen wird der Erreger über den direkten Kontakt, zum Beispiel durch die Hände, über Tröpfchen, zum Beispiel durch Niesen oder Husten, oder über die Aerosole verbreitet [61, 62].

### 1.1.1. Aufbau des Influenza-A-Virus

Die virale RNA (vRNA) codiert für die zwei Glykoproteine HA und Neuraminidase (NA), das M1 und den Ionenkanal Matrixprotein 2 (M2), sowie für die beiden Proteine Nichtstrukturprotein 1 (NS1) und Nichtstrukturprotein 2 (NS2), das NP und für die Polymerase-Untereinheiten PB1, PB2 und PA. Dabei bilden die RNA-Segmente zusammen mit PB1, PB2, PA und NP den Ribonukleoprotein-Komplex (RNP) (siehe Abbildung 1) [63]. Die acht Segmente können aber Informationen für bis zu 17 Proteine enthalten [9]. Die zusätzlichen Proteine können aufgrund von abweichenden Leserahmen (ORF) abgelesen werden, dazu zählen PB1-N40 [64], PB1-F2 [65], PA-X [66], PA-N155 [67], PA-N182 [67], M42 [68], NS3 [69] und möglicherweise das vermutete NEG8 [70].



**Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Influenza-A-Virus**

Das Genom des Influenza-A-Virus ist in acht Segmente unterteilt. Die Virushülle besteht aus den Oberflächenproteinen HA und NA, sowie dem Ionenkanal M2. Das M1 Protein ist eng mit der Virusmembran assoziiert. Außerdem ist das NS1 bzw. NS2 mit dem M1 Protein verbunden, diese Proteine sind nicht in der Abbildung eingezeichnet. (angepasst von [71], Abbildung basierend auf einer BioRender-Vorlage erstellt). Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu.

Das **Glykoprotein HA** gehört zu den Oberflächen-Proteinen des Influenza-A-Virus und ist in Trimeren organisiert [72]. Das Protein kann in zwei Bereiche eingeteilt werden, es gibt die membran-ständige Region, welche durch die  $\alpha$ -Helices gebildet werden, und eine kugelförmige Region, die aus einem  $\beta$ -Sheet besteht. Letztere ist für die Interaktion mit dem Rezeptor verantwortlich und bestimmt außerdem die Subtyp-spezifische Antigen-Variante des HAs [73]. Durchschnittlich macht das HA im Vergleich zur NA 80 % der Oberflächenproteine der Virushülle aus, wobei dieses Verhältnis auch subtyp-spezifisch variieren kann [74, 75]. Das HA ist für die Wechselwirkung mit der Sialinsäure verantwortlich, welche entweder eine N-Acetyl-Neuraminsäure- $\alpha$ 2,6-Galaktose(NeuAc  $\alpha$ 2,6Gal)-Bindung oder eine N-Acetyl-Neuraminsäure- $\alpha$ 2,3-Galaktose(NeuAc  $\alpha$ 2,3Gal)-Bindung eingehen. Letztere ist typisch für aviäre und equine Subtypen, wohingegen erstere spezifisch für humane Virusvarianten ist [76]. Das Schwein wird als „mixing vessel“ bezeichnet, da es die zwei verschiedenen Glykosylierungen besitzt [76, 77], und daher von den aviären und humanen Stämmen infiziert werden kann [78]. Wachteln und Fledermäuse besitzen ebenfalls beide Glykosylierungen [79, 80]. Das HA ist für die Bindung mit dem Rezeptor [81] und den Eintritt in die Wirtszelle verantwortlich [72]. Um

seine Funktionalität zu erreichen, muss das Vorläufer-Protein HA0 über eine posttranslationale Modifikation in die Untereinheiten HA1 und HA2 gespalten werden [28].

Die **NA** als zweites Oberflächenprotein besteht aus vier Untereinheiten, nämlich aus der zytoplasmatischen Region, der Transmembran-Region, einer variablen und einer kugelförmigen Domäne mit enzymatischer Funktion [82]. Dieses Glykoprotein ermöglicht es, die endständige Sialinsäure von der Zelloberfläche zu entfernen und ist für die Freisetzung der Viruspartikel verantwortlich [83].

Das **M1 Protein** ist an die Virushülle geknüpft [84] und für das Zusammenfügen des Viruspartikels sowie für dessen Abschnürung von der Wirtszellmembran essenziell [85].

Das **M2 Protein** ist ein Ionenkanal und für den Protonen-Fluss während Vermehrung des Virus verantwortlich [86].

Der Transport der messenger RNA (mRNA) des Virus aus dem Zellkern ist über das **NS1 Protein** gesteuert. Außerdem ist dieses für die Kontrolle der Protein-Synthese verantwortlich und unterdrückt parallel das angeborene Immunsystem der Wirtszelle [87].

Das **NS2 Protein** ist unter anderem für den Transport der viralen RNP (vRNPs) aus dem Zellkern verantwortlich. Zusätzlich dazu ist das Protein dafür verantwortlich, die (-)ssRNA in virale mRNA und komplementäre RNA (cRNA) umzuschreiben sowie die (-)ssRNA-Kopienzahl zu erhöhen [88].

Viele **NPs** und je ein **PB1**, **PB2** und **PA** bilden vRNPs, welche ebenfalls essenziell sind, um die vRNA umzuschreiben und die Kopie des viralen Genoms zu garantieren [17, 89].

#### 1.1.2. Klassifizierung der verschiedenen Influenza A Subtypen

Die verschiedenen Influenza-Subtypen werden anhand der Glykoproteine HA und NA unterschieden. Zum jetzigen Zeitpunkt wurden 16 HA und neun NA Varianten in Vögeln beschrieben [90, 91], die Subtypen H17N10 und H18N11 wurden allerdings ausschließlich in Fledermäusen nachgewiesen [92, 93].

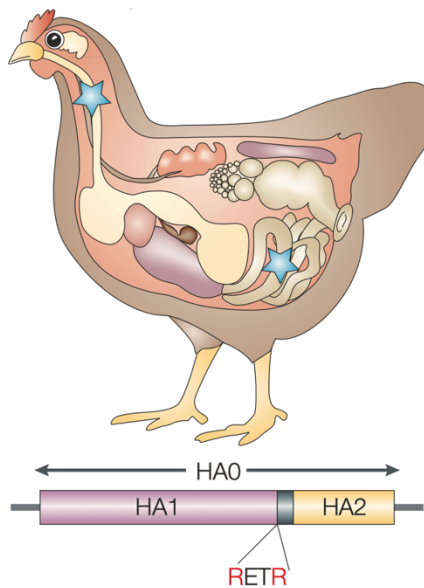
Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal der verschiedenen Subtypen ist die Pathogenität in Hühnern. Dabei unterscheidet man zwischen hoch- und niedrigpathogenen Stämmen (siehe Abbildung 2) [90].

Die **niedrigpathogenen aviären Influenza-Viren** können sogar nur eine stumme Infektion auslösen, führen aber ansonsten nur zu milden Symptomen im Huhn und induzieren dann nur eine lokale Infektion im Atmungs- und/ oder Verdauungsapparat [94, 95]. Außerdem kann eine niedrigpathogene aviäre Influenza-Infektion dazu führen, dass

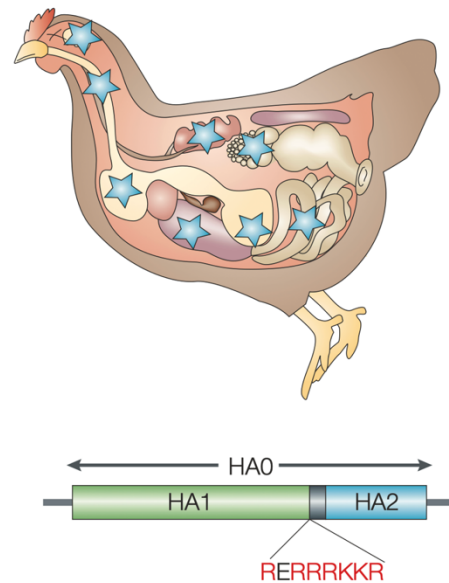
die Henne weniger Eier legt [95]. Ein Merkmal der niedrigpathogenen aviären Influenza-Viren ist die monobasische Spaltstelle des HAs mit einem einzigen Arginin [37, 38].

Im Gegensatz dazu befallen die **hochpathogenen aviären Influenza-Viren** den kompletten Organismus und sind typischerweise innerhalb von 48 Stunden nach der Infektion tödlich [96, 97]. Diese Subtypen haben eine multibasische Spaltstelle mit dem Motif R-X-K/R-R [98].

### niedrigpathogene aviäre Influenza Viren



### hochpathogene aviäre Influenza Viren



**Abbildung 2: Unterscheidung von niedrig- und hochpathogenen aviären Influenza-Viren**

Niedrigpathogene aviäre Influenza-Viren haben eine monobasische Spaltstelle im HA und induzieren dabei eine lokale Infektion im Atmungs- und Verdauungstrakt. Diese Subtypen lösen entweder eine stumme Erkrankung oder nur milde Symptome aus. Im Gegensatz dazu haben hochpathogene aviäre Influenza-Viren ein HA mit multi-basischer Spaltstelle, lösen eine Infektion im ganzen Organismus aus und führen in Hühnern nach ca. 48 h zum Tod (modifiziert von [99]).

Die Oberflächenproteine HA und NA können sich aufgrund von Mutationen verändern. In diesem Zusammenhang unterscheidet man zwischen dem Antigen-Shift und dem Antigen-Drift [53]. Davon kann entweder nur das HA, ausschließlich das NA oder beide Glykoproteine betroffen sein. Dass sich beide Oberflächenproteine verändern, passiert aber wenn überhaupt nur im Zusammenhang eines Antigen-Drifts [100]. In den meisten Fällen sind jedoch die Mutationen am HA zu finden, da dieses Protein fünf hypervariable Regionen besitzt und die Interaktion mit der Wirtszelle vermittelt [101].

### 1.1.3. Die Influenza-Infektion

Im ersten Schritt einer Infektion (siehe Abbildung 3) knüpft das Oberflächen-Glykoprotein HA des Influenza-A-Virus an die Sialinsäure, welche wiederum an die Glykolipide und Glykoproteine der Wirtszelle gebunden ist [72]. Dabei wird das HA von der Protease HAT gespalten (nicht in Abbildung 3 dargestellt) [102]. Die HA1 Domäne ist für diese Interaktion verantwortlich, wohingegen die HA2 Domäne für die Fusion mit der Membran der Wirtszelle ermöglicht [72, 81, 103].

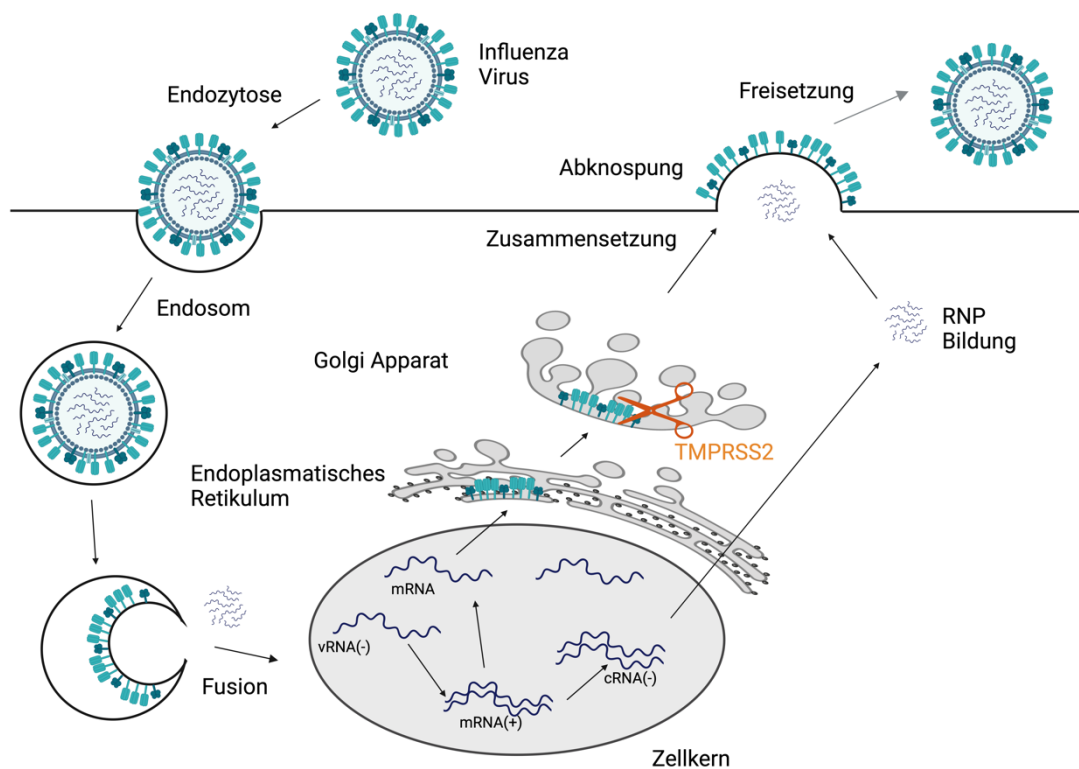
Dann folgt die Endozytose, sodass sich die Membranen von Virus und Wirtszelle miteinander verbinden können. Dafür ist jedoch ein pH-Wert zwischen fünf und sechs in den Endosomen essenziell. Durch den niedrigen pH-Wert wird eine Konformationsänderung des HAs ausgelöst, bei dem die HA1-Domäne unverändert bleibt, wohingegen die HA2-Domäne freigelegt wird. Dieser Prozess ist unumkehrbar [72]. Der niedrige pH-Wert wird außerdem benötigt, damit der M2 Ionenkanal Protonen transportiert und schließlich im nächsten Schritt die vRNA in das Cytoplasma frei gesetzt werden kann [104].

Dann wird der vRNP in den Zellkern transportiert, welcher aus dem NP, PB1, PB2 und PA besteht [105, 106], von denen jedes dieser Proteine ein unterschiedliches Kernlokalisierungssignal hat [106].

Im Nukleus wird dann von der viralen RNA – der (-)ssRNA – die cRNA, nämlich die (+)ssRNA, und die mRNA abgeleitet. Dabei dient die cRNA wiederum als Vorlage, um die Kopienzahl der vRNA zu erhöhen. Die acht viralen Segmente haben an beiden Enden neben den zwei oder drei segment-spezifischen Basen konservierte, 12 bis 13 Nukleotide lange Sequenzen, welche die Promoter-Region bilden. Für die Transkription müssen die ersten neun bis 17 Basen von der pre-mRNA durch die virale Endonuklease abgespalten werden, welche wiederum als Primer für den RNP dienen. Die Polymerase bindet an die beiden Enden und induziert so das Entfernen dieser Sequenzen. Um die Transkription zu stoppen, gibt es am 5' Ende der Template RNA eine polyA-Sequenz [105]. Anders als bei der Transkription werden für die Replikation der vRNA keine Primer benötigt [105, 107]. Die Einheit aus PB1, PB2 und PA ermöglicht die RNA-Synthese von vRNA, mRNA und cRNA. Die PB2 Einheit ist außerdem für den Wechsel zwischen pre-mRNA und mRNA verantwortlich [108]. In der frühen Phase der Infektion wird die Synthese der viralen Proteine durch das mRNA-Level kontrolliert und die Generierung von vRNA, mRNA und viralen Proteinen ist voneinander abhängig. Das ändert sich allerdings in der späten Phase der Infektion, bei der der Fokus auf der Synthese der vRNA und der der Proteine liegt [109].

Die mRNA und die vRNA, jedoch nicht die cRNA, gelangen dann aus dem Nukleus in das Cytoplasma [109]. Das M1 Protein ermöglicht den Transport der RNPs aus dem Zellkern ins Cytoplasma [110]. Dort erfolgt dann die Translation der viralen Proteine [111]. TMPRSS2 aktiviert das HA im Golgi-Apparat [102].

Abschließend folgt das Zusammensetzen der viralen Partikel und final das Abknospen dieser. Dafür müssen die vRNPs in Virions umschlossen werden – dieser Prozess wird durch die C-terminalen Domäne des M2 ermöglicht. Die beiden Glykoproteine HA und NA werden zusammen mit M1, M2, den vRNPs und NS2 zur Stelle der Abknospung transportiert, welche vorzugsweise die „lipid rafts“ sind. Das M1 Protein vermittelt eine Verbindung mit den vRNPs und mit dem cytoplasmatischen und Transmembran-Regionen der beiden Oberflächenproteine [112]. Die Neuraminsäure von der Virushülle wird dann von der NA abgespalten, sodass sich keine Aggregate bilden können, da ansonsten wiederum das HA die Neuraminsäure binden würde [113]. Auch während dem Zusammensetzen und kurz vor der Freisetzung der neuen Viruspartikeln wird deren HA0 durch die HAT (nicht in Abbildung 3 dargestellt) modifiziert [102].



**Abbildung 3: Replikationszyklus des Influenza-A-Virus**

Im ersten Schritt des Influenza-A-Virus-Replikationszyklus wird das Virus-Partikel durch Endozytose in die Wirtszelle aufgenommen. Das Endosom setzt dann die vRNA frei, welche in den Zellkern gelangt. Dort wird das Genom in mRNA und cRNA umgeschrieben. Die mRNA wird wieder in das Cytoplasma freigesetzt, sodass die Proteinsynthese stattfinden kann. Im Golgi-Apparat spaltet TMPRSS2 (als Schere, in orange dargestellt) das virale HA. Im letzten Schritt erfolgt die Zusammensetzung der Virus-Partikel und final die

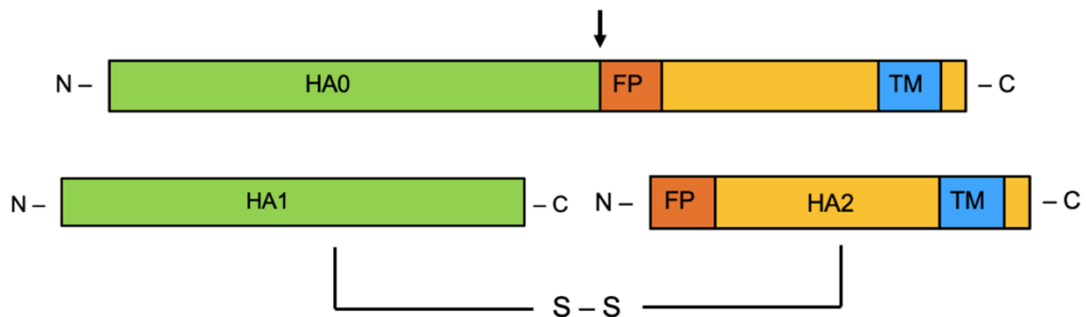


Abknospung dieser. (angepasst von [114-117], Abbildung mit BioRender erstellt, Darstellung des Influenza-Virus von einer BioRender Vorlage).

#### 1.1.4. Der Einfluss des Hämagglutinins

Das HA hat eine entscheidende Bedeutung für die Influenza-Infektion. Es ermöglicht auf der einen Seite die Interaktion mit der Wirtszelle und die Fusion mit dieser [72, 81], bestimmt aber auf der anderen Seite auch aufgrund der Spaltstelle, ob der Subtyp zu den niedrigpathogenen oder zu den hochpathogenen aviären Influenza-Viren zählt [28, 98]. Die posttranslationale Modifikation des HAs kann entweder direkt beim Eintritt in die Wirtszelle, bei dem Abspalten der Partikel (siehe Abbildung 3) oder im Atmungstrakt außerhalb der Zelle erfolgen [118].

Die posttranslationale Modifikation des HAs in die Untereinheiten HA1 und HA2 wird von Serinproteasen durchgeführt (siehe Abbildung 4) [28].



**Abbildung 4: Spaltung des viralen HAs durch die Serinproteasen**

Das virale Oberflächenprotein HA wird als HA0 synthetisiert. Damit der Erreger seine Infektiosität erreicht, muss das Vorläuferprotein in die Untereinheiten HA1 (grün) und HA2 (gelb; orange = Fusionspeptid (FP), blau = Transmembran-Region (TM)), welche über eine Disulfid-Brücke miteinander verknüpft sind, gespalten werden (angepasst von [119]). Die Abbildung wurde mit PowerPoint erstellt und ist nicht maßstabsgetreu.

Die Spaltstelle der niedrigpathogenen aviären Influenza-Viren (siehe Abbildung 2) wird von Proteasen gespalten, die vor allem im Atmungs- und Verdauungstrakt zu finden sind. Dazu gehört TMPRSS2, TMPRSS4, Matriptase oder HAT [28, 31, 57]. Im Menschen und in der Maus konnte bereits gezeigt werden, dass TMPRSS2 bei einer Infektion mit einem Subtyp mit monobasischer Spaltstelle eine der wichtigsten Proteasen darstellt [37, 120].

Im Gegensatz dazu wird das HA der hochpathogenen aviären Influenza-Viren z.B. von der Proprotein Convertase 5/6 (PC5/6) oder Furin posttranslational modifiziert, welche im ganzen Organismus exprimiert werden [57].

Auch die Glykosylierung des HAs kann einen bedeutenden Einfluss haben. Wie diese aufgebaut sind, wie groß diese sind und wie viele davon zu finden sind, ist durch den Subtyp und der zu infizierenden Zelle bestimmt. Die Zellen können mit den unterschiedlich großen Zuckerketten verschieden interagieren. Die individuelle Struktur des HAs schränkt ebenfalls die Glykosylierung ein [121]. Die Sialinsäure wird jedoch nicht an das HA geknüpft, da diese von der NA entfernt wird (siehe 1.1.1) [122]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine bestimmte Mutation im HA erst eine Glykosylierung ermöglicht und dadurch wiederum ein monoklonaler Antikörper nicht mehr angreifen kann [123]. Es gibt konservierte Regionen für Glykosylierungen, welche unter anderem beeinflussen, welche Auswirkungen die Temperatur während dem Transport hat, wie robust die Partikel sind und wie effektiv der Transport ablaufen kann [124].

## 1.2. TMPRSS2

### 1.2.1. Aktueller Wissensstand und struktureller Aufbau des TMPRSS2 im Menschen und in der Maus

TMPRSS2 gehört den Typ II Transmembran-Serinproteasen (TTSPs) an [57]. Die Proteine dieser Familie beeinflussen oft Wachstumsfaktoren oder Hormone, initiieren aber auch zum Beispiel den Abbau von Proteinen. Diese Proteingruppe nimmt allgemein viele Funktionen im Organismus ein [125]. Die Proteine der TTSPs weisen auch eine hohe Homologie im strukturellen Aufbau auf und werden noch in vier Gruppen unterteilt: man unterscheidet zwischen der HAT/DESC, der Hepsin/TMPRSS-, der Matriptase- und der Corin-Unterfamilie [125, 126]. Im Menschen und in der Maus ist TMPRSS2 besonders in den Epithelzellen des Urogenital-, des Verdauungs- und des Atmungsapparats zu finden [127-129].

Das humane (hTMPRSS2) und murine TMPRSS2 (mTMPRSS2) besteht aus einer kurzen zytoplasmatischen Domäne, einer Transmembran-Region, einer „low-density lipoprotein receptor class A“ (LDLRA) Region, einer „scavenger receptor cysteine-rich“ (SCRC) Domäne und einer Serinprotease-Domäne am C-terminalen Ende (siehe Abbildung 5) [28, 130]. Generell beschränkt sich das Wissen über TMPRSS2 hauptsächlich auf Informationen aus dem Menschen und der Maus.

Im Allgemeinen nutzt die LDLRA die Endozytose, welche auf der Interaktion mit einem Rezeptor basiert, um Makromoleküle in die Zelle einzubringen [131]. Die SRCR-Domäne vermittelt unter anderem die Wechselwirkung zwischen Liganden und Protein [132] und die Serinprotease-Domäne am C-terminalen Ende vermittelt die Enzymfunktion [28]. Dabei bilden die drei Aminosäuren (AS) Histidin, Asparaginsäure und Serin das aktive Zentrum des Proteins, was auch als katalytische Triade bezeichnet wird [133].

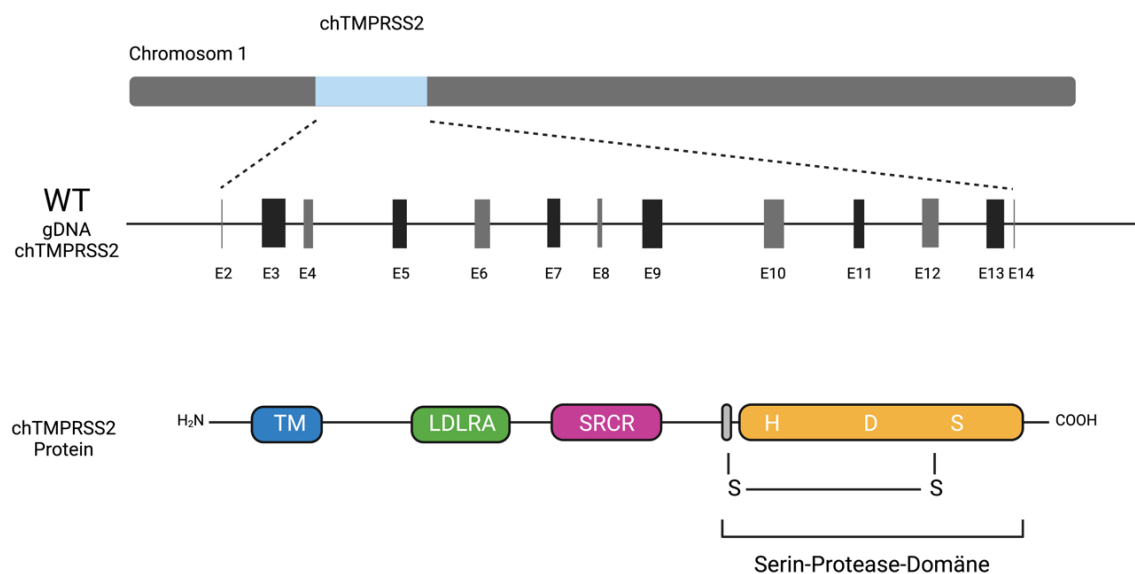
TMPRSS2 ist ein Proenzym, dessen Aktivierung autokatalytisch abläuft [28]. Aufgrund der Disulfid-Brücke, welche die beiden Untereinheiten nach der Spaltung verbindet, ist das Protein weiterhin in der Membran verankert [134]. TMPRSS2 kann jedoch auch von der Membran losgelöst sein, was jedoch einen Abfall der Enzymaktivität bedingt [28]. Die natürliche Funktion im Organismus ist noch unbekannt, wobei es Hypothesen gibt, dass das humane Protein für die Steuerung des Transportes der Ionen durch die Na<sup>+</sup>-Kanäle in den Epithelzellen verantwortlich ist [28, 128, 135].

Das hTMPRSS2 wird auch in Verbindung mit Prostatakrebs gebracht, da das Protein besonders in diesem Gewebe exprimiert wird und die TMPRSS2-Levels auch von den

Androgenen gesteuert werden [136]. Oft weisen Patienten mit einem Prostata-Tumor ein Fusionsprotein aus TMPRSS2 und dem Onkogen „EST-related gene“ (ERG) auf, deren Gene beide auf Chromosom 21 codiert werden [137, 138]. Das hTMPRSS2 hat zwei Isoformen – X2 mit einer Länge von 492 AS und X1 mit einer Länge von 529 AA [136, 139]. Die AS-Sequenz des mTMPRSS2 hat eine Übereinstimmung von 78 % zu der des hTMPRSS2 [136].

### 1.2.2. Struktureller Aufbau des TMPRSS2 im Huhn

Im Huhn wurde ebenfalls eine LDLRA- und eine SCRC-Domäne, sowie eine Serinprotease-Region identifiziert (XP\_015156666.1 [140]). Die nachfolgende Abbildung 5 fasst die Genstruktur des TMPRSS2 im Huhn (chTMPRSS2) – auch basierend auf dem Wissen von Mensch und Maus – zusammen. Die Funktion im Huhn konnte zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht genauer beschrieben werden.



**Abbildung 5: Struktureller Aufbau des chTMPRSS2**

Das *TMPRSS2* wird von 14 Exons codiert und ist auf Chromosom 1 lokalisiert. Das Protein hat eine kurze zytoplasmatische Domäne, eine Transmembran-Region (TM, blau) und in der extrazellulären Region die „low density lipoprotein receptor class A“- (LDLRA, grün), die „scavenger receptor cystein-rich“- (SCRC, pink) und die Serinprotease-Domäne (gelb). Letztere hat eine katalytische Triade, welche aus den AS Histidin, Asparaginsäure und Serin gebildet wird. (Abbildung angepasst von [36, 117, 134], Abbildung mit Bio-Render erstellt). Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu.

### 1.2.3. Erstellung von *TMPRSS2*<sup>-/-</sup> Tieren

#### 1.2.3.1. Erstellung von *TMPRSS2*<sup>-/-</sup> Mäusen

Eine typische Strategie, um die physiologische Funktion eines Gens besser zu verstehen, ist das Anwenden von reverser Genetik [141].

Kim *et al.* erstellten 2006 *TMPRSS2*<sup>-/-</sup> Mäuse, bei denen über homologe Rekombination eine Neomycin-Resistenz anstatt der Region von Exon 10 bis 13 der Serinprotease-Domäne ins Genom eingefügt wurde [36]. Die Targeting-Strategie wurde zuerst in murinen embryonalen Stammzellen etabliert, welche anschließend für die Erstellung der Tiere mithilfe der Mikroinjektion verwendet wurden. In dem deletierten Bereich waren ursprünglich zwei der konservierten AS, welche die katalytische Triade bildeten und die Enzymfunktion vermittelten. Die Chimären wurden mit den Wildtyp (WT)-Mäusen verpaart, sodass die Linie aufgrund der Keimbahntransmission erfolgreich generiert werden konnte. Im nächsten Schritt wurden die *TMPRSS2*<sup>-/-</sup> Mäuse charakterisiert. In der Entwicklung der *TMPRSS2*<sup>-/-</sup> Embryos konnte kein Unterschied zu den WT-Embryos beobachtet werden und generell zeigten die Tiere keinen Phänotyp aufgrund der genetischen Modifikation. Im Rahmen der Charakterisierung wurde unter anderem das Wachstum der Tiere sowie die Fruchtbarkeit und die Fortpflanzung dieser überprüft. Hierbei konnte kein Unterschied zur WT-Kontrollgruppe identifiziert werden. Auch wurden keine Anomalien einer Gewebestruktur festgestellt. In diesem Zusammenhang wurde zum Beispiel die Prostata, die Niere, der Dünndarm, der Magen, die Lunge oder das Pankreas untersucht [36].

Eine Alternative zum KO der *TMPRSS2* Serinprotease-Domäne ist der KO des beinahe vollständigen Proteins durch das Einfügen einer *lacZ*-Kassette und einer Neomycin-Resistenz, welche zwischen zwei loxP-Stellen orientiert war. Dabei ersetzte das Konstrukt über homologe Rekombination den Bereich zwischen Exon 2 und Exon 14. Diese Tiere unterschieden sich im Phänotyp ebenfalls nicht von den WT-Tieren [36, 37].

Eine weitere Strategie, um den Funktionsverlust von *TMPRSS2* zu induzieren, verwendet „[p]eptide-conjugated phosphorodiamidate morpholino oligomers“ (PPMO). Die PPMOs können leicht in die Zelle gelangen [120], bewirken einen Knock-down des Zielgens und werden im Zusammenhang mit Influenza-A-Virus-Infektionsstudien *in vitro* und *in vivo* genutzt [30, 120, 142, 143]. Um *TMPRSS2* zu adressieren, wurde ein PPMO gegen Exon 5 (T-ex5) des Gens designiert. Dadurch entsteht eine verkürzte Version der Serinprotease, welche keine LDLRA und somit auch keine Enzymfunktion besitzt [30, 120].

#### 1.2.3.2. Erstellung von *TMPRSS2*<sup>-/-</sup> Schweinen

Neben der Erstellung eines *TMPRSS2*<sup>-/-</sup> Mausmodells wurden auch Schweine mit dieser genetischen Veränderung erzeugt. Dabei nimmt das Schwein als „mixing vessel“ eine besondere Rolle im Kontext von Influenza-A-Viren ein. Dafür wurden in Exon 2 je drei sgRNAs in 5', sowie in 3' Orientierung vom Start-Codon aus designiert. Drei Kombinationen aus je zwei sgRNAs wurden für die Erstellung der genetisch veränderten Linie

genutzt. Auch in diesem Fall wiesen Tiere mit einem KO im TMPRSS2 auf beiden Allelen keinen Phänotypen auf [144]. Zum aktuellen Zeitpunkt wurden noch keine Infektionsexperimente mit den TMPRSS2-KO Schweinen durchgeführt.

#### 1.2.4. Anfälligkeit von *TMPRSS2*<sup>-/-</sup> Mäusen gegenüber Influenza-A-Virus-Infektionen

Das *TMPRSS2*<sup>-/-</sup> Mausmodell wurde in Infektionsstudien getestet [38, 39, 145]. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Tiere mit der genetischen Veränderung – anders als die WT-Tiere – nicht mit einem deutlichen Gewichtsverlust auf die Infektion mit verschiedenen H1N1-Stämmen reagierten. Außerdem war der Virustiter sowie die Ausbreitung des Virus in der Lunge der genetisch modifizierten Tiere niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppe. Proben aus einer Lungenspülung wurden auf die HA-Spaltung im Western Blot untersucht, wodurch der Effekt des TMPRSS2 nochmals verdeutlicht werden konnte. Die positive Wirkung eines *TMPRSS2*<sup>-/-</sup> Genotyps konnte auch bedingt für eine H3N2 Infektion nachgewiesen werden. Diese Tiere verloren kaum Gewicht und alle Tiere überlebten im Gegensatz zur WT-Kontrolle bei einer Infektionsdosis von 10<sup>1</sup> FFU eines maus-adaptiertes Stammes. Auch mit einer Inokulation einer höheren Virusmenge des gleichen H3N2 Stammes von 2 x 10<sup>3</sup> FFU zeigten der *TMPRSS2*<sup>-/-</sup>-Tiere einen positiven Effekt auf das Überleben, wobei man keinen signifikanten Unterschied beim Virus-Titer erkennen konnte. Die modifizierten Tiere und die WT-Tiere wiesen einen ähnlichen Verlauf bei dem Gewicht und der Überlebensrate nach einer H7N7 Infektion auf. Dieser Subtyp hat keine monobasische Spaltstelle im HA [38].

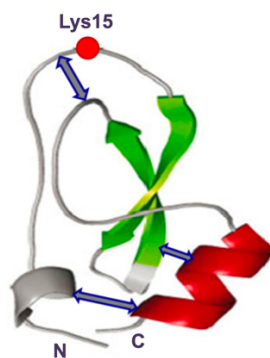
In einer weiteren Studie wurde erneut gezeigt, dass der KO des TMPRSS2 keinen positiven Effekt bezüglich der Virusreplikation und Verbreitung, auf die Mortalität oder auf den Gewichtsverlust im Zusammenhang einer H3N2 Infektion mit einem Titer von 10<sup>5</sup> PFU hatte. Die genetische Modifikation bot den Tieren Schutz vor einer H7N9 und einer H1N1 Infektion. In diesem Zusammenhang wurden im ersten Schritt *ex vivo* Kulturen aus Trachea, Lunge und Bronchien von WT und *TMPRSS2*<sup>-/-</sup> Tieren verwendet, um die Virusreplikation der einzelnen Stämme genauer zu verstehen [39].

Lambertz *et al.* untersuchten den Effekt von TMPRSS2 bezüglich einer H10N1 Infektion und konnten auch hier eine Schutzfunktion aufgrund der genetischen Modifikation zeigen. Es wurde ebenfalls der Gewichtsverlust sowie die Sterberate nach der Infektion und der Virustiter in der Lunge analysiert. Darüber hinaus wurde die Nekrose in der Lunge, das Ausmaß der Entzündung sowie die infizierten Zellen quantifiziert [145].

### 1.3. Targeting der Serinproteasen mit Inhibitoren als Alternative zum Gene-Editing

#### 1.3.1. Aprotinin

Aprotinin ist ein Inhibitor aus der Lunge von Rindern (siehe Abbildung 6), welcher viele verschiedene Serinproteasen – darunter auch TMPRSS2, Trypsin und die neutrophile Elastase – hemmt [9, 127]. Das Protein mit einem Gewicht von 6511 Da setzt sich aus 58 AS zusammen [146]. Der Wirkstoff hat eine niedrige Halbwertszeit von max. 10 min im Blutplasma [34]. Das Medikament zählt auch zu den Kunitz-Typ Inhibitoren [147]. Über das Lysin an Position 15 (siehe Abbildung 6) bindet Aprotinin im aktiven Zentrum der Serinprotease [148] und verhindert dadurch deren Enzymfunktion.



**Abbildung 6: 3D-Struktur des bovinen Aprotinin**

Das bovine Aprotinin besteht aus einer  $\alpha$ -Helix (rot) und zwei  $\beta$ -Faltblättern (grün). Das Lysin an Position 15 (roter Punkt) markiert die AS, welche im aktiven Zentrum der Protease bindet. Die Pfeile markieren Disulfidbrücken [29]. (adaptiert von [29]).

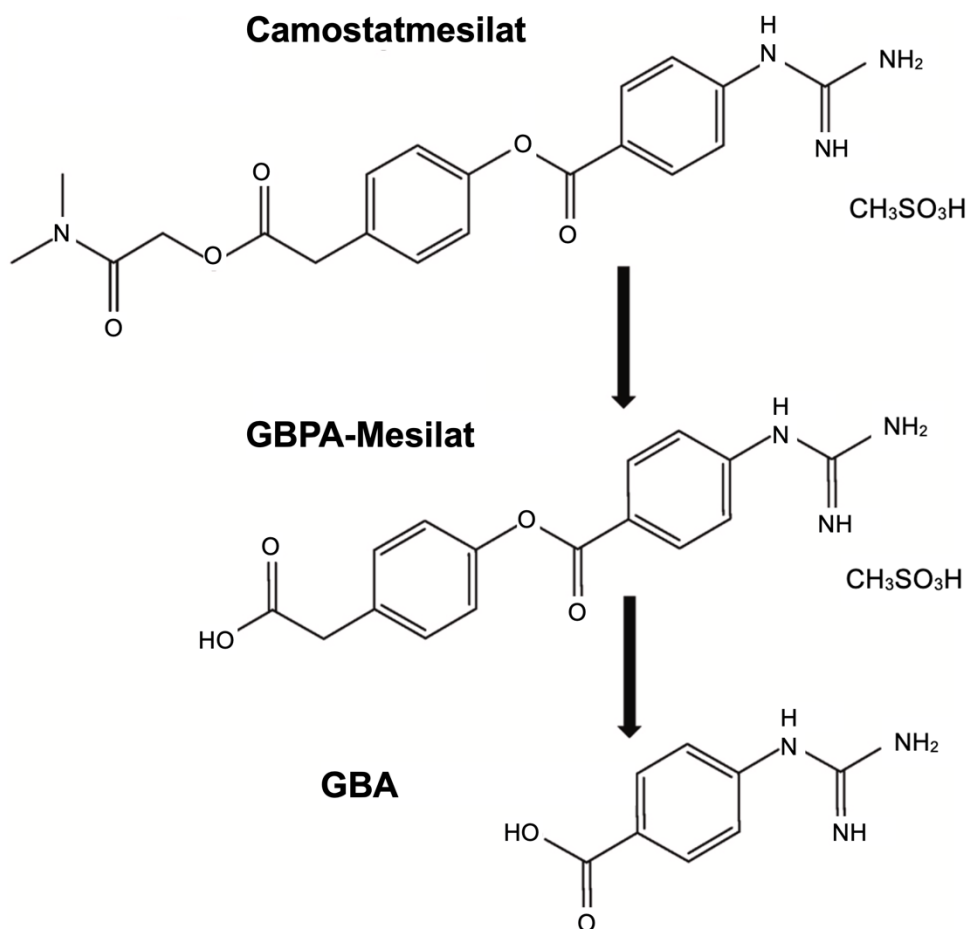
Dieser Wirkstoff wurde das erste Mal in den 1980ern von Zhirnov *et al.* verwendet, um die Spaltung des HAs im Rahmen einer Influenza-A-Virus-Infektion zu unterbinden [9]. Dabei bindet Aprotinin im aktiven Zentrum der Protease und verhindert so deren Enzymaktivität [34].

Der positive Effekt von Aprotinin im Kontext einer Influenza-A-Virus-Infektion konnte bereits im Mausmodell [40], in der humanen Zellkultur [29] und sogar in einer klinischen Studie bestätigt werden. Die infizierten Patienten zeigten dabei keine unerwünschten Begleiterscheinungen und hatten durch die Behandlung schneller keine Beeinträchtigungen mehr aufgrund der Influenza-A-Virus-Infektion [9]. In Russland kann der Wirkstoff, welcher in diesem Zusammenhang durch Einatmen aufgenommen wird, in der Therapie gegen Influenza-A-Viren genutzt werden [34, 149].

Das Medikament wird ebenfalls bei Bypass-Operationen verwendet [34] und findet Verwendung, um die Blutgerinnung vor, während und nach einer OP besser zu kontrollieren [34, 127]. Dabei hemmt Aprotinin Plasmin, welches physiologisch für den Abbau von Thromben im Organismus verantwortlich ist, verhindert aber ebenfalls die Bildung dieser im Blut [149].

### 1.3.2. Camostatmesilat

Camostatmesilat, welches auch als FOY-305 bezeichnet wird, ist ein Serinprotease-Inhibitor (siehe Abbildung 7). Dabei handelt es sich aber – anders als bei Aprotinin – um einen synthetischen Wirkstoff [127, 150]. Camostatmesilat war der erste Serinprotease-Inhibitor, für den nachgewiesen werden konnte, dass auch speziell TMPRSS2 adressiert wird [149]. Camostatmesilat wird metabolisiert, sodass die beiden Verbindungen 4-(4-Guanidinbenzyloxy)-Phenyl-Essigsäure (GBPA)-Mesilat und 4-Guanidinbenzoesäure (GBA) entstehen. Dabei besitzt letztere Verbindung nur eine sehr geringe inhibitorische Wirkung gegenüber TMPRSS2 und die von GBPA-Mesilat macht nur noch 10 % der ursprünglichen Wirkung von Camostatmesilat aus [150, 151]. Der Inhibitor hat eine Halbwertszeit von ca. 2 h 20 min [151].





### Abbildung 7: Metabolisierung des Camostatmesilats

Camostatmesilat wird im Körper in die Produkte GBPA-Mesilat und in GBA abgebaut. Die inhibitorische Wirkung von GBPA-Mesilat ist um ca. 90 % reduziert im Vergleich zu Camostatmesilat. Abbildung modifiziert von [151].

1996 konnte das erste Mal *in vivo* in der Maus der positive Effekt des Wirkstoffes bei einer Influenza-A-Virus Infektion nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang wurden WT-Mäuse mit nicht-angepassten humanen Influenza-A-Virus-Subtypen infiziert, wodurch eine noch ähnlichere Infektion zu der im Menschen simuliert werden konnte. Dabei werden die oberen Atemwege, anstatt der unteren bei den angepassten Varianten, infiziert. Die behandelten Tiere schieden weniger Virus aus als die Kontrollgruppe [118].

Für die Analyse der inhibitorischen Wirkung des Wirkstoffs wurden auch humane Epithelzellen aus der Trachea (HTE) mit niedrigpathogenen Stämmen infiziert. Camostatmesilat führte bei einer H1N1 oder H3N2 Infektion zu niedrigeren Virus-Titern im Überstand. Neben Camostatmesilat wurden auch noch die Inhibitoren Sivelestat, Gabexat und Aprotinin untersucht, wobei ersterer am vielversprechendsten die Vermehrung des Pathogens bei ähnlicher Konzentration unterdrückte [41].

#### 1.3.3. Verwendung von Aprotinin und Camostatmesilat im Huhn

Das aktuelle Wissen hinsichtlich des Effekts der beiden Serinprotease-Inhibitoren Aprotinin und Camostatmesilat beschränkt sich im Huhn auf *in ovo*-Experimente [29, 42]. Für Embryos, welche ab dem Zeitpunkt der Infektion mit zwei verschiedenen H1N1-Subtypen mit Aprotinin behandelt wurden, konnte eine große Menge an ungespaltenem HA0 in der Allantois-Flüssigkeit im Western Blot nachgewiesen werden. Außerdem zeigten die Embryos, welche mit dem Medikament behandelt wurden, um die Aktivierung des HAs und dadurch die Infektion zu blockieren, auch eine niedrigere Viruslast und dadurch eine niedrigere Replikation des Pathogens im Vergleich zur Kontrollgruppe auf, auch wenn der Virus zuvor mit Trypsin behandelt wurde [29]. Dadurch wird dann die posttranslationale Modifikation des HAs bedingt [152]. Die Inhibitor-Gabe bedingte keine negativen Effekte auf das Überleben der Embryos [29]. Die hohe inhibitorische Wirkung des Camostatmesilats wurde bereits 1992 beobachtet. Im Zusammenhang dieser Studie wurde Camostatmesilat auch in *in ovo* Infektionen getestet. Durch die Injektion des Wirkstoffes in die Allantoishöhle starben die Embryos bei einer gewissen Konzentration aufgrund der Influenza-A-Virus-Infektion nicht und die starke Virusreplikation wurde ebenfalls eingedämmt [42].

#### 1.4. Erstellung genetisch veränderter Hühner

Genetisch veränderte Hühner stellen ein wertvolles Tool in der Entwicklungsbiologie [8] und in der *in ovo* Produktion von therapeutischen Proteinen dar [7, 153]. Die genetisch veränderten Hühner finden unter anderem auch Einsatz in der immunologischen Forschung [154] und Krankheitsresistenzen im Huhn können dadurch hervorgebracht werden [155-157].

Das erste genetisch veränderte Huhn wurde 1987 von Salter *et al.* erstellt. Der Embryo besteht zum Zeitpunkt der Eiablage aus min. 30.000 Zellen [7, 158-160], weshalb sich eine Mikroinjektion, welche zum Beispiel für die Erstellung von genetisch veränderten Mäusen verwendet wird [158, 159], als schwierig herausstellte [158, 161]. Deshalb nutzten die Wissenschaftler aviäre Leukose-Viren (ALVs) und konnten so Mutationen in der Keimbahn induzieren. Die Gen-Abschnitte des Virus wurden gemäß der mendelschen Vererbung an die Nachkommen weitergegeben [160]. Durch das Einbringen des ALVs in die Nähe des Embryos, der zu diesem Zeitpunkt noch aus pluripotenten Zellen besteht, war es noch möglich, Keimzellen zu adressieren. Das war die Voraussetzung, dass die genetische Modifikation vererbt werden konnte. Die Rate der Keimbahntransmission auf die G1-Generation war bei 0,8 % bis ca. 5 % - abhängig davon, welche Virus-Variante verwendet wurde [160]. Negative Aspekte, genetische Hühner mithilfe von rekombinanten Viren zu erzeugen, sind beispielsweise, dass das Transgen eine bestimmte Größe nicht überschreiten darf oder die Skepsis der Bevölkerung [162].

Sieben Jahre später, 1994, gelang es dann Love *et al.* über die Mikroinjektion genetisch veränderte Hühner zu erstellen. Die Wissenschaftler entwickelten in diesem Zusammenhang auch eine *ex-vivo*-Kultur des Embryos und konnten Chimären erzeugen. Einer dieser Hähne wies eine Keimbahntransmission von 3,4 % auf [162].

Der nächste große Erfolg war die Erstellung genetisch veränderter Hühner mithilfe von Lentiviren, welche auch in die Gruppe der Retroviren fallen. Dabei wurden die Konstrukte in die subgerminale Höhle des frisch gelegten Eis appliziert. 27 % der erzeugten Tiere schlüpften und wiesen im Anschluss eine Keimbahntransmission zwischen 4 und 45 % auf [153].

##### 1.4.1. Erstellung genetisch veränderter Hühner mithilfe von Primordialen Keimzellen (PGC)

Die Isolierung und Kultivierung der PGCs, deren genetische Modifikation und die Verwendung dieser Zellen zum Erstellen von genetisch veränderten Hühnern stellt einen Meilenstein in der Erstellung von genetisch veränderten Hühnerlinien dar [163, 164].

PGCs sind die Vorläufer von Ei und Spermium [164, 165], weshalb diese Zellen die Grundlage für die Erstellung genetisch veränderter Hühner darstellen [163, 164]. Obwohl die Zellen kultiviert, eingefroren, aufgetaut und auch genetisch verändert werden können, verlieren die PGCs der Hühner ihre Eigenschaft als Keimzellen nicht [164]. Wichtig ist jedoch, dass sich im endogenen Kontext die männliche PGCs nur in den Gonaden der Hähne und weibliche PGCs nur in den Gonaden der Hennen differenzieren können [1, 164, 165].

Van de Lavoie *et al.* gelang es 2006, PGCs der Hühner langfristig zu kultivieren und diese Zellen dann wieder zurück in einen Embryo zu injizieren. Im Detail wurden die Zellen aus dem Blut des Donor-Embryos im Hamburger Hamilton (H&H, [166]) Stadium 14 – 17 gewonnen und im Alter zwischen 35 und 110 Tage in den Empfänger-Embryo im H&H Stadium 13 – 15 injiziert. Dabei wurde ein Barred Plymouth Rock (BPR) Embryo als Donor verwendet und der Empfänger war ein White Leghorn (WL) Embryo. Die WL haben weiße Federn, wohingegen die BPR schwarze Federn haben. Nachdem die Chimären, welche einen WL-Phänotyp aufwiesen, ihre Geschlechtsreife erreicht hatten, wurden die Tiere mit WT-Hennen (WL) verpaart. Das Spermium der injizierten BPR-PGCs wurde zwischen <1 % bis 86 % an die Nachkommen, welche schwarze anstatt weißer Federn hatten, weitervererbt [164].

In einem nächsten Experiment generierten van de Lavoie *et al.* eGFP<sup>+</sup>-PGCs, welche ebenfalls in WT-Embryos injiziert wurden. Dabei wurde gezeigt, dass diese Chimären ausschließlich in den Gonaden eGFP<sup>+</sup>-Zellen haben, wobei zusätzlich vier fluoreszierende Zellen im Gehirn nachgewiesen werden konnten. Die eGFP<sup>+</sup>-Tiere aus der Anpaarung der Chimären mit WT-Hennen exprimierten den Fluoreszenzmarker im ganzen Organismus [164].

Van de Lavoie *et al.* konnte ebenfalls zeigen, dass auch eine Keimbahntransmission der Hühner-PGCs gegeben ist, wenn diese in Perlhuhn-Embryos injiziert werden. Die eGFP<sup>+</sup>-Zellen konnten in die Gonaden wandern, sodass eGFP<sup>+</sup>-Tiere durch die künstliche Befruchtung von WT-Hennen mit dem Spermium der Chimären-Perlhühner erzeugt werden konnte [163]. Das Huhn (*Gallus gallus domesticus*) und das Perlhuhn (*Numida meleagris*) sind Tiere der gleichen Ordnung, jedoch einer anderen Familie [163].

Schusser *et al.* gelang es 2013 über die homologe Rekombination, PGCs mit einem KO des Immunglobulin J-Segments (JH) zu erzeugen und anschließend Hühner mit der gleichen genetischen Modifikation zu erstellen. Das Konstrukt hat am 5' und 3' Ende Homologie-Arme und ersetzt das JH-Segment durch eine eGFP-Kassette sowie eine Puromycin-Resistenz als weiteren Selektionsmarker. Die beiden Transgene wurden unter anderem von zwei loxP-Stellen umgeben. Das Konstrukt hatte eine Targeting-

Effizienz von 28 %, wobei die Anzahl der genetisch modifizierten Tiere in der F1 Generation niedriger als erwartet war. Die erfolgreiche Etablierung der Linie wurde durch Southern Blot und PCR zur Genotypisierung bestätigt [154].

Im Jahr 2015 optimierten Whyte *et al.* die Zusammensetzung des PGC-Mediums und ermöglichten dadurch die Kultivierung der PGCs ohne Feeder-Zellen. Die Zugabe von FGF2, Insulin und Activin A in das Medium führte dazu [167], dass auf die von van de Lavoie *et al.* verwendeten Buffalo rat liver Feeder-Zellen [163, 164] verzichtet werden konnte [167].

Ein nächster Schritt war, eine Hühnerlinie zu erzeugen, welche aufgrund einer genetischen Modifikation steril ist, sodass die Erstellung genetisch veränderter Hühner beschleunigt werden kann [3, 168]. Das Ziel von Ballantyne *et al.* bestand darin, eine Linie zu erzeugen, welche als Empfänger für männliche und weibliche PGCs verwendet werden kann [3].

#### 1.4.2. CRISPR/Cas9

Neben den Zink-Fingern [169] und den Transcription Activator-like Effector Nuclease (TALENs) [170] ist CRISPR/Cas9 ein bedeutendes Tool für das Gene-Editing [35]. Der Vorteil von CRISPR/Cas9 ist, dass die Endonukleaseaktivität mithilfe von RNAs vermittelt wird [171, 172], wohingegen die anderen beiden Technologien protein-spezifisches Targeting nutzen [46, 173]. Das Design eines CRISPR/Cas System ist unkompliziert, da nur die RNA-Sequenz für das individuelle Target ausgewechselt werden muss [174].

Archaeen und Bakterien nutzen CRISPR/Cas als adaptive Immunantwort, um gegen Viren und Plasmide vorzugehen [175]. Dabei vermitteln die CRISPR, welche aus repetitiven (CRISPR repeats) und individuellen Sequenzen (CRISPR spacers) [176] bestehen, über die crRNA das sequenz-spezifische Targeting, sodass Cas als Nuklease die DNA schneiden kann [177].

Die Cas Proteine können in drei Gruppen – Typ I, Typ II und Typ III – unterteilt werden [178]. Cas9 gehört zum Typ II [178, 179] und eine Variante, welche häufig Verwendung findet, wurde aus *Streptococcus pyogenes* isoliert [175, 180, 181]. Cas9 hat eine HNH und eine RuvC Endonuklease-Aktivität [175, 182], welche sich in der Mitte bzw. am 5'-Ende befinden [178]. Diese Domänen ermöglichen den DNA-Doppelstrang-Bruch [177]. Der komplementäre Strang interagiert mit der HNH-Domäne, wohingegen die RuvC-Domäne den anti-sense Strang scheidet [175].

Der Mechanismus von CRISPR/Cas ist in drei Schritte unterteilt [183]. Nachfolgend wird dieser mit dem Cas9 Protein näher erläutert. Im ersten Schritt werden kurze Abschnitte

der fremden DNA in das Wirts-Genom aufgenommen werden [175]. Im nächsten Schritt wird das Repeat-Spacer Element in die pre-crRNA umgeschrieben, aus der dann die crRNA hervorgeht [175]. Für die crRNA Entwicklung wird die RNase III der Wirtszelle, für die wiederum die tracrRNA entscheidend ist, und Csn1 benötigt [180]. Im letzten Schritt erkennt Cas9 zusammen mit der crRNA die Ziel-Region und schaltet die Plasmid- oder Virus-DNA aus, wofür ebenfalls die tracrRNA von großer Bedeutung ist [175].

Als Genschere wird Cas9 zusammen mit einer individuell designten sgRNA verwendet, welche die tracrRNA und die crRNA enthält [175]. Das Targeting von Cas9 erfolgt über die crRNA und die PAM Sequenz [175], welche durch das Motif NGG bei SpCas9 definiert ist und auf das 3' Ende der gRNA folgt [184]. Die PAM-Sequenz ist für das Entwinden der DNA, die Interaktion mit dem DNA-Strang und um die R-Loop Struktur zu ermöglichen, nötig [175]. Cas9 generiert einen Doppelstrangbruch [175], der entweder über das nichthomologe Endjoining (NHEJ) [185] oder über die homologe Rekombination (HDR), wieder behoben werden kann [186]. Zusätzlich können dadurch Insertionen und Deletionen (INDELS) entstehen [187].

## 1.5. Zielsetzung der Arbeit

Influenza-A-Viren stellen aufgrund des zoonotischen Potentials ein Risiko für Mensch und Tier dar [188-190]. Deshalb ist es von höchster Bedeutung, nachhaltige Lösungswege zu entwickeln, um das Wohl von Mensch und Tier zu garantieren und finanzielle Einbußen in der Geflügelindustrie zu vermeiden [9]. Eine mögliche Strategie im Kampf gegen Influenza-A-Viren sind die Impfungen für Mensch und Tier [116], wobei die Impfstoffe in Deutschland nicht bei Hühner verwendet werden dürfen [191]. Eine andere Möglichkeit, um die Influenza-A-Virus-Infektion zu blockieren, ist das Inhibieren von Serinproteasen der Wirtszelle, da diese ansonsten die posttranslationale Modifikation des viralen HAs vermitteln [37] und das Virus dadurch die Wirtszelle infizieren kann [39]. Eine bedeutende Serinprotease im Zusammenhang von niedrigpathogenen aviären Influenza-Viren ist TMPRSS2 [9, 37, 38], wodurch dieses Protein ein vielversprechendes Target darstellt.

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Effekt von Serinproteasen – speziell von TMPRSS2 – im Huhn im Kontext von niedrigpathogenen aviären Influenza-Viren genauer zu verstehen. Dafür sollte TMPRSS2 im Huhn genauer über Expressionsstudien analysiert, genetisch veränderte Hühner mit einem KO der TMPRSS2 Serinprotease-Domäne erzeugt und der Effekt von Serinprotease-Inhibitoren unter der Verwendung von TOCs untersucht werden. Um das physiologische Expressionsmuster der Protease darzustellen, sollte ein polyklonales anti-chTMPRSS2-Serum in Kaninchen hergestellt werden.

## 2. Material

Alle verwendeten Materialien sind in den folgenden Abschnitten zusammengefasst.

### 2.1. Geräte und Ausrüstung

**Tabelle 1: Verwendete Geräte mit Herstellerinformation**

<b>Instrument</b>	<b>Hersteller</b>
BD AriaFusion FACS Zellsorter	BD Biosciences, San Jose, USA
BioPhotometer	Eppendorf SE, Hamburg, GER
Blau-Licht-Screen	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, GER
BTX Elektroporator	BTX, Holliston, USA
CO <sub>2</sub> -Inkubator, Steri-Cycle CO <sub>2</sub> Inkubator für die Zellkultur	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
CoolCell® Einfrierbox, Abkühlen der Zellen auf – 1 °C/min	BioCision, San Rafael, USA
Detektionskammer Western Blot, Fusion Fx	Vilber Lourmat, Eberhardzell, GER
Digitaler Heizblock	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
Digitalkamera für das Mikroskop	Carl Zeiss Jena GmbH, Darmstadt, GER
DREMEL® 3000-15	Conrad GmbH, München, GER
Echo Discover Mikroskop	Echo Laboratories Inc., San Diego, USA
Eierinkubator HEKA Favorit Olymp	HEKA-Brustgeräte, Rietberg, GER
Eierinkubator Procon BSS	Grumbach Brutgeräte GmbH, Aßlar, GER
Eismaschine	Eurfrigor, Lainate, ITA
Feinwaage 440-33N	KERN & SOHN GmbH, Balingen-Frommern, GER
Feuchtkammer	Simport Scientific, Saint-Mathieu-de-Bevoeil, CAN
Fluoreszenz-Einheit (Mikroskop)	Leica, Wetzlar, GER
Gefrierschrank (-20 °C), GNP3056	Liebherr, Biberach, GER
Gefrierschrank (-80 °C), SN30407588	Thermo Scientific, Waltham, USA
Gel-Dokumentationskammer, QuatStudio 5	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gel-Dokumentationskammer, Quatum ST5	Viber Lourmat, Eberhardzell, GER
Gelkamm 6-12 Taschen	Peqlab GmbH, Erlangen, GER
Gelkammer	Peqlab GmbH, Erlangen, GER
Gelschlitten, Thermo EC Classis CSSU911	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gewebe-Homogenisator (Speed Mill Plus)	Analytik Jena GmbH, Darmstadt, GER
Glasflaschen	Schott AG, Mainz, GER
Glasware	Schott AG, Mainz, GER
Inkubator Series BD Classic Line	Binder GmbH, Tuttlingen, GER
Kryotom CyroStar™ NX70	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kühlschrank (4 °C), TP410 Comfort	Liebherr, Biberach, GER
Magnetischer Rührfisch	VELP Scientifica, Usmate, ITA
Magnetrührer VMS Advanced	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
Mikroplatten-Schüttel-Inkubator	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
Mikroskop DM IL LED	Carl Zeiss AG, Oberkochen, GER

Mikroskop Stemi 508	Carl Zeiss AG, Oberkochen, GER
Mikroskop, Axiovert 25	Zeiss AG, Oberkochen, GER
Mikrowelle	MDA, Rüsselsheim, GER
Mikrozentrifuge, MiniStar	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
Mini-PROTEAN <sup>®</sup> Tetra System	Bio-Rad Laboratories, München, GER
Multikanal-Pipette -P10 (P12X10L), P200 (P12x200L)	Gilson Inc, Middleton, USA
Multipette <sup>®</sup> -Mehrfachdispenser-Pipette	Eppendorf SE, Hamburg, GER
Neubauer Zählkammer (Faktor 10 <sup>5</sup> )	Laboroptik Ltd, Lancing, UK
Orbital Schüttler, Standard Analog-Schüttler	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
PCR Cycler, Multicycler PTC 220, Dyad DNA Engine	Bio-Rad Laboratories, München, GER
PCR Cycler, peqStar 2x	Peqlab GmbH, Erlangen, GER
PCR Cycler, T100 Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, München, GER
PCR-Station Pro HEPA	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
pH-Meter CyberScan 510	EUtech Scientific, Aachen, GER
Pipette P2, P10, P20, P100, P200, P1000	Gilson Inc, Middleton, USA
Pipettierhilfe, Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, München, GER
Schierlampe LED Schierlampe Powerlux	Siepmann GmbH, Herdecke, GER
Sonoplus <sup>™</sup> HD 2070 Homogenisator für den Ultraschallaufschluss	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, GER
Spektrophotometer, NanoDrop <sup>™</sup> Lite	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sterile chirurgische Instrumente (Schere, Pinzetten)	Henry Schein VET GmbH, Hamburg, GER
Sterile Werkbank, HeraSafe H12	Heraeus Holding GmbH, Hanau, GER
Stromgerät für die Gelkammer, PowerPac, Basic	Bio-Rad Laboratories, München, GER
Thermoschüttler	Eppendorf SE, Hamburg, GER
Überkopfschüttler Hei-MIX Reax 2	Heidolph, Schwabach, GER
Unabhängige Stromversorgung	GreenCell, Penn Yan, USA
Universalschüttler SM30 A control	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, GER
Vakuumpumpe CVC2000	Vacuubrand, Wertheim, GER
Vortex Mixer, ZX3 Advanced Vortex Mixer	VELP Scientifica <sup>™</sup> , Usmate, ITA
Waage	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
Wasserbad	Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach, GER
Wet Tank Blotting System	Bio-Rad Laboratories, München, GER
Wippschüttler	Lab Logistics Group GmbH, Meckenheim, GER
Zentrifuge 4-16KS	Eppendorf SE, Hamburg, GER
Zentrifuge 5424R	Eppendorf SE, Hamburg, GER
Zentrifuge 5810R	Eppendorf SE, Hamburg, GER
Zentrifuge Minispin <sup>®</sup> F-45-12-11	Eppendorf SE, Hamburg, GER
Zentrifuge SIGMA 4K15CH	SciQuip Ltd, Newtown, UK



## 2.2. Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Herstellerinformationen**

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
Acetat-Folie	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Alufolie	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
Autoklavierbare Abfalltüten	Ratiolab, Dreieich, GER
Bio-one 50 ml Falcon	Thermo Fisher Scientific, Waltham, GER
Biosphere® Filterspitzen 0,5-20 µl	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Biosphere® Filterspitzen 1250 µl	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Biosphere® Filterspitzen 2-100 µl	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Biosphere® Filterspitzen 2-20 µl	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Biosphere® Filterspitzen 2-200 µl	Sarstedt, Nümbrecht, GER
CELLSTAR™ Tubes	Greiner Bio-one International GmbH, Kremsmünster, AUT
Chromatographie Papier	Sigma Aldrich, Saint-Louis, USA
Combitips advanced® Eppendorf	Eppendorf SE, Hamburg, GER
Deckgläser	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
EDTA Mikrovetten Gefäße	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Elektroporationsküvetten	Lonza Cologne GmbH, Köln, GER
Eppendorf-Röhrchen (0,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Eppendorf-Röhrchen (1,5 ml)	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
Erlenmeyerkolben	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
FACS-Tube, Deckel mit Zellfilter-Einheit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FACS-Tube, Deckel ohne Zellfilter-Einheit	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Falcon (15 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Falcon (50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Feather® C35 Mikrotom-Klinge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Glaskugeln ± 0,3 mm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, GER
Injekt® -F Luer Solo 0,0 1-1 ml	B. Braun, Meisungen, GER
Injekt® -F Luer Solo 10 ml	B. Braun, Meisungen, GER
Injekt® -F Luer Solo 5 ml	B. Braun, Meisungen, GER
InnuSpeed Lysis Tube A	Analytik Jena GmbH, Jena, GER
Kanülen (27 – 20 G)	B. Braun Melsungen AG, Hessen, GER
Klebeband für die Gelkammer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, GER
Küvetten	Sigma Aldrich, Saint Louis, GER
MegaBlock® 96 well, 1,2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Mikrotiter-Platte (96 Well), unsteril	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Multiply®-µStrip Pro 8-Strip	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Nitril® BestGen® (puder- und latex-freie Handschuhe, Größe S	Meditrade, Kiefersfelden, GER
Nitrozellulose-Membran	GE Healthcare Life Science, Amersham, UK
Nunc™ Kryotube Vials	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nunc™ EasYFlask™ 25 cm <sup>2</sup>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nunc™ EasYFlask™ 75 cm <sup>2</sup>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nunc™ Delta Surface, 12 Well	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nunc™ Delta Surface, 24 Well	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nunc™ Delta Surface, 48 Well	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nunc™ Delta Surface, 96 Well	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Ohio, USA

PCR-Folie, optisch klar	Sarstedt, Nümbrecht, GER
PCR-Platte, 96 PCR Platte	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
PCR-Tube	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Peel-away Schälchen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Petrischalen, steril	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Petrischalen, unsteril	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Pipettenspitzen 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Pipettenspitzen 20 µl	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Pipettenspitzen 200 µl	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Reagens Reservoir (50 ml)	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
Reagenzbehälter	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
Serologische Pipette 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Serologische Pipette 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Serologische Pipette 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Serologische Pipette 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Serologische Pipette 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, GER
Sterile chirurgische Klinge	C. Bruno Bayha, Tuttlingen, GER
Sterilfilter 0,22 µm	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
Superfrost Plus Objektträger	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vakuum-Filtereinheit	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
Wägeschiffchen	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, GER
Watman 1 Filterpapier	Cytiva Europe GmbH, Freiburg, GER

### 2.3. Tiere, Zellen, Bakterien, Viren

**Tabelle 3: Verwendete und generierte Hühnerlinien**

Hühner-Linie	Ursprung	Verwendung
Lohmann's selected Leg-horn Classic (LSL)	LSL Rhein-Main GmbH & Co. KG, Dieburg, GER	Hühnerlinie für die Zucht, für die PGC-Isolierung und für die TOCs genutzt
Chimären mit WT-Sperma und Sperma mit einem <i>TMPRSS2</i> <sup>+/-</sup>	Biotechnologie der Reproduktion, Freising, GER	der Hähne zur Erstellung einer <i>TMPRSS2</i> <sup>+/-</sup> Hühnerlinie

\* Erstellung einer *TMPRSS2*<sup>+/-</sup> Hühnerlinie war nicht erfolgreich

**Tabelle 4: Verwendete Zellen in der Zellkultur**

Zelltyp	Genotyp	Bezugsquelle
Douglas Forster Zellen (DF-1)	WT, <i>TMPRSS2</i> <sup>+/-</sup> , <i>TMPRSS2</i> <sup>-/-</sup>	Friedrich-Loeffler-Institut, Riems, GER
UCDT40	WT, Pool mit einem KO der <i>TMPRSS2</i> Serinprotease-Domäne	Department of Microbiology, Immunology & Molecular Genetics, University of California, Los Angeles, USA
Madin-Darby Canine Kidney Cells (MDCK)	WT	Klinik für Geflügel, TiHo, Hannover, GER

PGC	WT, <i>TMPRSS2</i> <sup>+/+</sup> , <i>TMPRSS2</i> <sup>-/-</sup>	Biotechnologie Reproduktion, Freising, GER	der TUM,
-----	---	--	-------------

**Tabelle 5: Verwendete Bakterien**

Bakterien	Stamm	Subtyp	Bezugsquelle
<i>BL21(DE3)</i> kompetente <i>E. Coli</i> (C2527H)	B Stamm	DE3	New England Biolabs® GmbH, Ipswich, USA
DH5 $\alpha$ kompetente <i>E. Coli</i>	K12 Stamm	DH5 $\alpha$	Selbst hergestellt, Biotechnologie der Reproduktion, TUM, Freising, GER
NEB 5- $\alpha$ kompetente <i>E. Coli</i> (C2987H)	K12 Stamm	DH5 $\alpha$	New England Biolabs® GmbH, Ipswich, USA

**Tabelle 6: Verwendete Virenstämme**

Name	Virus Sub-Typ	Stamm	Pathogenität	Bezugsquelle
A/chicken/Saudi Arabia/CP7/1998	H9N2	aviär	niedrigpathogen	Klinik für Geflügel, TiHo, Hannover, GER
A/turkey/Canada/1963	H6N8	Aviär	niedrigpathogen	Klinik für Geflügel, TiHo, Hannover, GER
WSN/33	H1N1	human	niedrigpathogen	Tierphysiologie, LMU, München, GER

## 2.4. Chemikalien

### 2.4.1. Zellkulturmedien und Zusätze

**Tabelle 7: Verwendete Zusätze für die Zellkultur mit Herstellerinformationen**

Zellkulturmedien/ Zusätze	Hersteller
Activin A	PeproTech GmbH, Hamburg, GER
Aprotinin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Avian Knock-out Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
B27 Supplement (50x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Camostatmesilat	Sigma Aldrich, Saint Louis, GER
CO <sub>2</sub> independent Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DMSO [(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO] <sub>2</sub>	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) High Glucose mit 4500 mg/ml Glucose, Natriumpyruvat, Natriumbicarbonat, ohne L-Glutamin, flüssig, steril-filtriert	Sigma Aldrich, Saint Louis, GER
Fetales Kälberserum (FBS) Superior	Sigma Aldrich, Saint Louis, GER
Fibroblast-Growth-Factor (FGF)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Glutamaxx (100x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Heparin Sulfat	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
Hühner-Serum (chSerum)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Hygromycin B	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Kalziumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER
Medium 199 (1x) mit Hank's Salt, L-Glutamin, 25 mM HEPES, L-Aminosäuren	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nicht essenzielle Aminosäuren (NEAA) (100x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nukleotide (100 mM)	Sigma Aldrich, Saint Louis, GER
OptiMEM™	Gibco™, Waltham, USA
Ovalbumin	Sigma Aldrich, Saint Louis, GER
Paraformaldehyd (PFA)	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Sigma Aldrich, Saint Louis, GER
Pyruvat (100x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RPMI 1640 Medium mit Natriumbicarbonat, ohne L-Glutamin, flüssig, steril-filtriert	Sigma Aldrich, Saint Louis, GER
β-Mercaptoethanol (50 mM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Triton™ X-100	Sigma Aldrich, Saint Louis, GER
Trypsin/EDTA Lösung (10x)	Biochrom GmbH, Berlin, GER

#### 2.4.2. Zusätze für die molekularbiologische Methoden

**Tabelle 8: Verwendete Zusätze in die Molekularbiologie mit Herstellerinformationen**

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
100% EtOH für Molekularbiologie	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Agarose low EEO	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Ampicillin Salz	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Borsäure (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
DNA-Leiter 1 kb Plus	Invitrogen, Carlsbad, USA
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Glycerol	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Lysogeny Broth (LB)-Agar	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
LB Medium Pulver	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Natriumacetat (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> )	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Natriumhydroxid (NaOH)	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Orange G	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
PeqGREEN	Peqlab GmbH, Erlangen, GER
Saccharose	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Salzsäure (HCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Super Optimal Broth mit Catabolit Unterdrücklung-Medium (SOC)	New England Biolabs® GmbH, Ipswich, USA
Thioglycerol	Promega™, Madison, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris-HCl) (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> xHCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Tween20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER

X-Gal	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
-------	--------------------------------

### 2.4.3. Histologie

**Tabelle 9: Verwendete Zusätze für die Histologie mit Herstellerinformationen**

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Aceton	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Flüssiger Stickstoff	Westfalen AG, Münster, GER
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Maus-Serum	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, West Grove, USA
VECTASHIELD® Vibrance™ Antifade Mounting Medium mit DAPI	Vector Laboratories, Inc., Newark, USA

### 2.4.4. Protein-Produktion

**Tabelle 10: Verwendete Chemikalien und Zusätze für die Produktion und Aufreinigung von Proteinen mit Herstellerinformationen**

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
99% Ethanol, vergällt	CLN, Langenbach, GER
Acrylamid	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Ammoniumpersulfat (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Bromophenolblau	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Coomassie-Brilliant Blue R-250	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Dithiotreitol (DTT, C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> )	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Essigsäure (CH <sub>3</sub> COOH)	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Guanidium-HCl	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Imidazol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, GER
Invitrogen MagicMark™ XP Western Standard	Invitrogen, Carlsbad, USA
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Luminol	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Magermilchpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Methanol (CH <sub>3</sub> OH) für Molekularbiologie	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA) Agarose Beads	QIAGEN, Venlo, NLD
NP-40	Sigma Aldrich, Saint Louis, GER
Para-Hydroxycoumarinsäure	Sigma Aldrich, Saint Louis, GER
Tetramethylethylendiamin (TEMED, C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> )	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
ThermoScientific PageRuler™ Broad Range Unstained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ThermoScientific PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER

## 2.5. Medien, Zusammensetzungen und Zusätze

### 2.5.1. Zellkultur

**Tabelle 11: Zusammensetzung des Manipulation Mediums**

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen/ Konzentration</b>
CO <sub>2</sub> independet Medium	500 ml
FBS	56 ml
Glutamaxx	5,6 ml
Pen/Strep	5,6 ml

**Tabelle 12: Zusammensetzung des DT40-Mediums**

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen/ Konzentration</b>
DMEM High Glucose mit 4500 mg/ml Glucose, Natriumpyruvat, Natriumbicarbonat, ohne L-Glutamin	500 ml
FBS	50 ml
chSerum	5 ml
Glutamaxx	5 ml
$\beta$ -Mercaptoethanol	1 ml

**Tabelle 13: Zusammensetzung des PGC-Mediums**

Das PGC-Medium wurde kurz vor Gebrauch noch mit 100  $\mu$ l chSerum, 25  $\mu$ l Activin A und 20  $\mu$ l FGF gemischt. Für den Sort wurde dem PGC-Medium außerdem mit Pen/Strep (2  $\mu$ l/ml PGC-Medium) zugesetzt.

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen/ Konzentration</b>
Avian Knock-out Dulbecco's Modified Eagle's Medium	46,225 ml
B27 Supplement (50x)	1 ml
Glutamaxx (100x)	0,5 ml
NEAA (100x)	0,5 ml
Nukleotide (100 mM)	0,5 ml
Pyruvat (100x)	0,2 ml
$\beta$ -Mercaptoethanol (50 mM)	0,1 ml
Pen/Strep (100x, optional)	0,1 ml
CaCl <sub>2</sub> (20 mM)	0,375 ml
Ovalbumin (20 %)	0,5 ml
Heparin Sulfat (50 mg/ml)	0,1 ml

**Tabelle 14: Zusammensetzung des MDCK-Mediums**

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen/ Konzentration</b>
RPMI 1640 Medium mit Natriumbicarbonat, ohne L-Glutamin	500 ml
FBS	56 ml
Glutamaxx	5,6 ml

**Tabelle 15: Zusammensetzung des DF-1 Medium**

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen/ Konzentration</b>
DMEM High Glucose mit 4500 mg/ml Glucose, Natriumpyruvat, Natriumbicarbonat, ohne L-Glutamin	500 ml
FBS	56 ml
Glutamaxx	5,6 ml

**Tabelle 16: Zusammensetzung des TOC-Mediums**

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen/ Konzentration</b>
Medium 199 (1x) mit Hank's Salt, L-Glutamin, 25 mM HEPES, L-Aminosäuren	500 ml
Pen/Strep	5,1 ml
Glutamaxx	5,1 ml

**Tabelle 17: Rezept für die Herstellung von PBS**

Der pH war auf 7,4 eingestellt. PBS wird bei 4 °C gelagert und wurde zuvor autoklaviert. Für die molekularbiologische Anwendung wird der pH auf 7,2 eingestellt und die Lagerung erfolgt bei RT.

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen/ Konzentration</b>
NaCl	40 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,75 g
KCl	1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
ddH <sub>2</sub> O	Auf ein Gesamtvolumen von 5 L

**Tabelle 18: Zusammensetzung des 1x Trypsins**

0,25x Trypsin wurde 1:4 in PBS/EDTA verdünnt.

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen/ Konzentration</b>
Trypsin/EDTA Lösung (10x)	5 ml
PBS-EDTA	45 ml

**Tabelle 19: Zusammensetzung der Hygromycin-Stock Lösung**

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen/ Konzentration</b>
Hygromycin	41,2 mg
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	Auf ein Gesamtvolumen von 1 ml

**Tabelle 20: Zusammensetzung der 4 % PFA/PBS-Lösung**

PFA wurde in 60 °C warmen PBS gelöst, pH-Wert wurde auf 6,9 eingestellt.

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen/ Konzentration</b>
PFA	40 g
PBS	Auf ein Gesamtvolumen von 1 L

**Tabelle 21: Zusammensetzung von PBS/EDTA**

pH wurde auf 7,2 eingestellt.

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen/ Konzentration</b>
EDTA	200 mg
PBS	Auf ein Gesamtvolumen von 1 L

### 2.5.2. Molekularbiologische Methoden

**Tabelle 22: Rezept für die Herstellung von PBS-T**

Der pH war auf 7,2 eingestellt.

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen/ Konzentration</b>
NaCl	40 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,75 g
KCl	1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
Tween20	2,5 ml
ddH <sub>2</sub> O	Auf ein Gesamtvolumen von 5 L

**Tabelle 23: Rezept für die Herstellung des STM-Puffers**

Der Puffer wird bei 4 °C gelagert.

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen/ Konzentration</b>
Saccharose	64 mM
Tris Cl, pH 7,5	20 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
Triton™ X-100	0,5 %

**Tabelle 24: Rezept für die Herstellung des TEN-Puffers**

Der Puffer wird bei RT gelagert.

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen/ Konzentration</b>
Tris Cl, pH 8,0	10 mM
EDTA	1 mM
NaCl	10 mM

**Tabelle 25: Rezept für die Herstellung der Pronase E**

Die Pronase E wird bei -20 °C gelagert. Die Pronase E stammt aus *Streptomyces griseus*.

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen/ Konzentration</b>
Pronase E	20 mg
H <sub>2</sub> O	1 ml



**Tabelle 26: Rezept für die Herstellung des Tissue Lysis Buffers**

Der Puffer wird bei RT gelagert.

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen/ Konzentration</b>
SDS	0,2 %
EDTA	5 mM
Tris HCl pH 8,5	100 mM
NaCl	200 mM

**Tabelle 27: Rezept für die Herstellung von 10x TBE-Puffer**

Der Puffer wurde dann für die Gelelektrophorese im Verhältnis 1:10 (200 ml Stock Solution + 1,8 L H<sub>2</sub>O) verdünnt.

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen/ Konzentration</b>
Tris	242 g
0.5 M EDTA	100 ml
CH <sub>3</sub> COOH	57.1 ml
ddH <sub>2</sub> O	Auf ein Gesamtvolumen von 1 L

**Tabelle 28: Rezept für die Herstellung von 50x TAE-Puffer**

Der Puffer wurde dann für die Gelelektrophorese im Verhältnis 1:50 (20 ml Stock Solution + 980 ml H<sub>2</sub>O) verdünnt.

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen/ Konzentration</b>
Tris	108 g
Borsäure	55 g
KCl	900 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	40 ml
ddH <sub>2</sub> O	Auf ein Gesamtvolumen von 1 L

**Tabelle 29: Rezept für die Herstellung von Orange G**

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen/ Konzentration</b>
Glycerol	60ml
0.5 M EDTA	12ml
OrangeG	100mg
dH <sub>2</sub> O	Auf ein Gesamtvolumen von 100 ml

**Tabelle 30: Rezept für die Herstellung des 1kb Leiter**

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen/ Konzentration</b>
DNA Leiter 1kb Plus	4,5 µl
6x Orange G	25 µl
Nuclease-freies H <sub>2</sub> O	120,5 µl

### 2.5.3. Bakterien und Klonierung

**Tabelle 31: Rezept für die Herstellung von LB-Medium**

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen/ Konzentrationen</b>
LB-Medium Pulver	25 g
ddH <sub>2</sub> O	Auf ein Gesamtvolumen von 1 L

**Tabelle 32: Rezept für die Herstellung von LB-Agar**

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen/ Konzentrationen</b>
LB-Agar Pulver	40 g
ddH <sub>2</sub> O	Auf ein Gesamtvolumen von 1 L

**Tabelle 33: Rezept für die Herstellung von Ampicillin**

Ampicillin wurde in 10 ml ddH<sub>2</sub>O gelöst, anschließend steril-filtriert und aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen/ Konzentrationen</b>
Ampicillin Salz	1 g
ddH <sub>2</sub> O	Auf ein Gesamtvolumen von 10 ml

**Tabelle 34: Rezept für die Herstellung von IPTG**

IPTG wurde in 10 ml ddH<sub>2</sub>O gelöst, anschließend steril-filtriert und aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen/ Konzentrationen</b>
IPTG	2,4 g
ddH <sub>2</sub> O	Auf ein Gesamtvolumen von 10 ml

**Tabelle 35: Rezept für die Herstellung von X-Gal**

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen/ Konzentrationen</b>
X-Gal	20 mg
DMSO	Auf ein Gesamtvolumen von 1 ml

### 2.5.4. Histologie

**Tabelle 36: Rezept für die Herstellung von 1M PBS/Glycin**

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen/ Konzentrationen</b>
PBS	100 ml
Glycin	0,7 g

## 2.5.5. Proteinproduktion und -analyse

**Tabelle 37: Rezept für die Herstellung der SBSS Stock Solution**

<b>Bestandteile</b>	<b>Stock</b>	<b>Volumen/ Konzentrationen</b>
NaCl	5 M	100 ml
50 mM Tris-HCl, pH 8,0	1 M	50 ml
5 mM MgCl <sub>2</sub>	1 M	5 ml
10 % Glycerin	100 %	100 ml
0,1 % NP-40	100 %	1 ml
dH <sub>2</sub> O		Auf ein Gesamtvolumen von 1 L

**Tabelle 38: Rezept für die Herstellung der WBSS Stock Solution**

<b>Bestandteile</b>	<b>Stock</b>	<b>Volumen/ Konzentrationen</b>
100 mM KCl	5 M	100 ml
20 mM Tris-HCl, pH 8,0	1 M	20 ml
5 mM MgCl <sub>2</sub>	1 M	5 ml
20 % Glycerin	100 %	200 ml
20 mM Imidazol	1 M	20 ml
0,1 % NP-40	100 %	1 ml
dH <sub>2</sub> O		Auf ein Gesamtvolumen von 1 L

**Tabelle 39: Rezept für die Herstellung der EBSS Stock Lösungen**

<b>Bestandteile</b>	<b>Stock</b>	<b>Volumen/ Konzentrationen</b>
100 mM KCl	5 M	100 ml
20 mM Tris-HCl, pH 8,0	1 M	20 ml
5 mM MgCl <sub>2</sub>	1 M	5 ml
20% Glycerin	100 %	200 ml
250 mM Imidazol		17,02 g
0,1 % NP-40	100 %	1 ml
dH <sub>2</sub> O		Auf ein Gesamtvolumen von 1 L

**Tabelle 40: Rezept für die Herstellung der Puffer für die Proteinaufreinigung mit den Stock-Lösungen**

	<b>Stock Lösung</b>	<b>Imidazol [1 M]</b>	<b>β-Mercaptoethanol</b>
Ultraschallpuffer	10 ml SBSS	20 µl	6,9 µl
Equilibrierungspuffer	10 ml SBSS	20 µl	-
Washing Buffer 1	15 ml SBSS	45 µl	10,35 µl
Washing Buffer 2	15 ml WBSS	60 µl	10,35 µl
Elutionspuffer	10 ml EBSS	-	4 µl

**Tabelle 41: Rezept für die Herstellung des Puffer Fs**

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen/ Konzentrationen</b>
Guanidium-HCl	143 g
Essigsäure	2,9 ml
dH <sub>2</sub> O	Auf ein Gesamtvolumen von 250 ml

**Tabelle 42: Rezept für die Herstellung des Column Storage Puffers**

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen/ Konzentrationen</b>
NaOAc pH 6,5	5 ml
100 % EtOH	100 ml
dH <sub>2</sub> O	Auf ein Gesamtvolumen von 500 ml

**Tabelle 43: Rezept für die Herstellung von nicht reduzierendem 6x Laemmli**

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen/ Konzentrationen</b>
Tris-HCl pH 6.8	7 ml
Glycerin	3 ml
SDS	1 g
Bromphenolblau	1 mg

**Tabelle 44: Rezept für die Herstellung des 5x Gelelektrophorese-Puffers**

Der 5x Gelelektrophorese-Puffer wurde noch mit dH<sub>2</sub>O auf eine 1x Lösung verdünnt (200 ml 5x Lösung + 800 ml dH<sub>2</sub>O). Die Lagerung erfolgte bei RT.

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen/ Konzentrationen</b>
Tris	15 g
Glycin	72 g
SDS	5 g
dH <sub>2</sub> O	Auf ein Gesamtvolumen von 1 L

**Tabelle 45: Rezept für die Herstellung des Towbin Puffers**

Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen/ Konzentrationen</b>
Tris	3,03 g
Glycin	14,4 g
Methanol	100 ml
dH <sub>2</sub> O	Auf ein Gesamtvolumen von 1 L

**Tabelle 46: Rezept für die Herstellung der Entwicklerlösung ECL A**

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen/ Konzentrationen</b>
0,1 M Tris-HCl (pH 8.6)	200 ml
Luminol	50 mg

**Tabelle 47: Rezept für die Herstellung der Entwicklerlösung ECL B**

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen/ Konzentrationen</b>
Para-Hydroxycoumarinsäure	11 mg
DMSO	10 ml

**Tabelle 48: Rezept für die Herstellung von APS**

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen/ Konzentrationen</b>
Ammoniumpersulfat	1 g
ddH <sub>2</sub> O	Auf ein Gesamtvolumen von 10 ml

**Tabelle 49: Rezept für die Herstellung der Coomassie-Brilliant Blue R-250 Färbelösung**

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen/ Konzentrationen</b>
99 % Ethanol, vergällt	450 ml
Essigsäure	100 ml
Coomassie Brilliant Blue R-250	2,5 g
ddH <sub>2</sub> O	Auf ein Gesamtvolumen von 1 L

**Tabelle 50: Rezept für die Herstellung der Entfärbelösung nach einer Coomassie-Brilliant Blue R-250-Färbung**

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen/ Konzentrationen</b>
99 % Ethanol, vergällt	250 ml
Essigsäure	100 ml
ddH <sub>2</sub> O	Auf ein Gesamtvolumen von 1 L

## 2.6. Enzyme, Puffer und Chemikalien

### 2.6.1. Restriktionsenzyme

**Tabelle 51: Verwendete Restriktionsenzyme mit Herstellerinformationen**

<b>Enzym</b>	<b>Hersteller</b>
BamHI	New England Biolabs® GmbH, Ipswich, USA
BshTI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
EcoRI	New England Biolabs® GmbH, Ipswich, USA
FastDigest BbsI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FastDigest BsaI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

### 2.6.2. Weitere Enzyme und damit verbundene Puffer und Chemikalien

**Tabelle 52: Verwendete Enzyme, Puffer und Chemikalien mit Herstellerinformationen**

<b>Enzym/ Puffer</b>	<b>Hersteller</b>
10x PlasmidSafe Puffer	Lucigen Corporation, Middleton, USA
Adenosintri-phosphat (ATP) (10 mM)	New England Biolabs® GmbH, Ipswich, USA
CutSmart® Puffer	New England Biolabs® GmbH, Ipswich, USA
DNaseI	Promega™, Madison, USA
dNTPs	New England Biolabs, Ipswich, USA
FIREpol® DNA Polymerase Mastermix	Solis BioDyne, Tartu, Estland
HOT FIREpol® DNA Polymerase Mastermix	Solis BioDyne, Tartu, Estland

LongAmp® Taq DNA Polymerase	New England Biolabs® GmbH, Ipswich, USA
PlasmidSafe™ ATP dependent DNase PNK Puffer	Lucigen Corporation, Middleton, USA New England Biolabs® GmbH, Ipswich, USA
Pronase E Proteinase K	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs® GmbH, Ipswich, USA
T4 DNA Ligase	New England Biolabs® GmbH, Ipswich, USA
T4 PNK	New England Biolabs® GmbH, Ipswich, USA
T7 DNA Ligase	New England Biolabs® GmbH, Ipswich, USA
Tango-Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

## 2.7. Antikörper

**Tabelle 53: Verwendete Antikörper**

Primäre Antikörper				
Antikörper	Isotyp	Firma	Konjugat	Konzentration
Goat-anti-hTMPRSS2		Everest Biotech Lth, Bicester, UK	Nicht konjugiert	8 µg/ml
His-Antikörper HRP, Klon GG11-6F4.3.2	Maus IgG2b	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, GER	HRP	1:500
Mouse-anti-Influenza A Nucleoprotein, AA5H	Maus IgG2a	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA	Nicht konjugiert	0,5 µg/ml
Sekundäre Antikörper				
Alexa Fluor™ 568 goat-anti-mouse	IgG (H+L)	Invitrogen, Carlsbad, USA	Alexa Fluor™ 568	2,5 µg/ml
Mouse-anti-goat IgG-CFL 594	Maus IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	CFL 594	4 µg/ml

## 2.8. Kits

**Tabelle 54: Verwendete Kits**

Kit	Firma
AMAXA™ Cell Line Nucleofector™ Kit V	Lonza Cologne GmbH, Köln, GER
E.N.Z.A.® Gel Extraction Kit	Omega Bio-tek, Inc., Norcross, USA
GoScript™ Reverse Transcription Mix, Random Primers	Promega™, Madison, USA
Mix2Seq ON Kit	Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, GER
NEBuilder® HiFi DNA Assembly Mastermix	New England Biolabs, Ipswich, GER
pGEM-T® Easy Vektor System	Promega™, Madison, USA
PureYield™ Plasmid MidiPrep System	Promega™, Madison, USA

---

PureYield™ Plasmid MiniPrep System	Promega™, Madison, USA
ReliaPrep™ Blood gDNA MiniPrep System	Promega™, Madison, USA
ReliaPrep™ RNA Cell MiniPrep System	Promega™, Madison, USA
ReliaPrep™ RNA Tissue MiniPrep System	Promega™, Madison, USA
Viafect™ Transfection Reagent	Promega™, Madison, USA
Wizard® SV Gel and PCR Clean-up Systems	Promega™, Madison, USA

---

## 2.9. Primer und Oligonukleotide

Alle Primer und Oligonukleotide wurden von Eurofins oder IDT bezogen. Diese wurden in einer Stockkonzentration von 100 pmol/μl verdünnt und dann für die Arbeitslösungen im Verhältnis 1:20 auf 5 pmol/μl in nuklease-freiem H<sub>2</sub>O verdünnt.

### 2.9.1. Primer

**Tabelle 55: Primer Liste**

#	Interner Name	Sequenz	Target	nt	Verwendung	Amplikon
1	Z-Chromosom	AAGCATAGAAACAATGTGGGAC	Z-Chromosom	22	Sexing	250 bp
2	Z-Chromosom	AACTCTGTCTGGAAGGACTT	Z-Chromosom	20	Sexing	250 bp
3	W-Chromosom	CTATGCCTACCACMTTCCTATTTGC	W-Chromosom	25	Sexing	375 bp
4	W-Chromosom	AGCTGGAYTTCAGWSCATCTTCT	W-Chromosom	23	Sexing	375 bp
26	eGFP	AAGGACGACGGCAACTACAAGACC	eGFP	24	Sequenzierung	
28	T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Interner Sequenzierungs- Primer für den pGEM-T <sup>®</sup> Easy Vektor	20	Sequenzierung	
29	SP6	ATTTAGGTGACACTATAGAA	Interner Sequenzierungs- Primer für den pGEM-T <sup>®</sup> Easy Vektor	20	Sequenzierung	
277	Beta 16042	Actin TACCACAATGTACCCTGGC	Beta-Actin	19	Housekeeping Gen RT-PCR	300 bp
278	Beta 16043	Actin CTCGTCTTGTTTTATGCGC	Beta-Actin	19	Housekeeping Gen RT-PCR	300 bp
902	TMPRSS2 LO	CTGCTTTGCAGAGAGGCTGGAC	TMPRSS2 LO, In- tron 9 – Exon 13	22	Genotyping	332 bp



903	TMPRSS2 LO	GGCGTTGTCATCTGTTGGCCTG	TMPRSS2 LO, Intron 9 – Exon 13	22	Genotyping		332 bp
1001	eGFP_pX333 fwd	GCCAGGCAAAAAGAAAAGGAATTCGGCAGTG GAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTG GTGACGTCGAGGAGAATCCTGGCCCCGTGAGC AAGGGCGAGGAGCTGTT	eGFP	115	Gibson eGFP	Primer	834 bp
1002	eGFP_pX333 rev	GCTGATCAGCGAGCTCTAGGAATTCTTACTTGTA CAGCTCGTCCATGCC	eGFP	49	Gibson eGFP	Primer	834 bp
1085	1085_Cas9_fw	TAAGAACCTGCCCAACGAGAAGG	Cas9	23			685 bp
1086	1086_Cas9_rv	CAGATTGGCAATGTGCTCGTGCA	Cas9	23			685 bp
15119	CRISPR Seq	GTACCCCATTTGTCTGCAG	sgRNA	19	Sequenzierung		
15128	CRISPR Seq	CTAGAGCCATTTGTCTGCAG	sgRNA	19	Sequenzierung		
16010	Hygro_Seq	GTACACCAGCACCAAAGAG	Hygromycin	19	Sequenzierung		

### 2.9.2. Oligonukleotide

**Tabelle 56: Verwendete Oligonukleotide**

Name	Target Stelle	Target – Sequenz	Oligonukleotid-Sequenzen (5' – 3')	Quelle
sgRNA 1458	chTMPRSS2 – Exon 10	CATAAACAGACCAGATGTACGGG	CACCGGCATAAACAGACCAGATGTAC AAACGTACATCTGGTCTGTTTATGCC	Biotechnologie der Reproduktion, TUM, Freising, GER
sgRNA 1459	chTMPRSS2 – Exon 13	CTGGATTTATAAAAATATGCAGG	CACCGGCTGGATTTATAAAAATATGC AAACGCATATTTTTATAAATCCAGCC	Biotechnologie der Reproduktion, TUM, Freising, GER
sgRNA 1460	chTMPRSS2 – Exon 10	ACGGGTCAGAAAATAGCCTATGG	CACCGGACGGGTCAGAAAATAGCCTA AAACTAGGCTATTTTCTGACCCGTCC	Biotechnologie der Reproduktion, TUM, Freising, GER

sgRNA 1461	chTMPRSS2 – Exon 13	ATATGACTGTGTTTACAGACTGG	CACCGGATATGACTGTGTTTACAGAC AAACGTCTGTAAACACAGTCATATCC	Biotechnologie der Reproduktion, TUM, Freising, GER
sgRNA 1461	chTMPRSS2 – Exon 13	ATATGACTGTGTTTACAGACTGG	CACCGGATATGACTGTGTTTACAGAC AAACGTCTGTAAACACAGTCATATCC	Biotechnologie der Reproduktion, TUM, Freising, GER

## 2.10. DNA-Vektoren und generierte Konstrukte

Alle Plasmidkarten wurden mit BioRender erstellt.

**Tabelle 57: Verwendete Konstrukte in dieser Arbeit**

Konstrukt Name	Interne #	Antibiotika Resistenz	Quelle
pGEM-T <sup>®</sup> Easy		Ampicillin	Promega, Madison, USA
pet45b(+)	4	Ampicillin	Tierphysiologie, LMU, München, GER
pBS-Vasa 2.1-eGFP-attB70	21	Amilcillin, Puromycin	Tierphysiologie, LMU, München, GER
pX333-p2A-Hygro	97	Ampicillin, Hygromycin	Tierphysiologie, LMU, München, GER
pcDNA3-chTMPRSS2	278	Ampicillin, Neomycin	Biotechnologie der Reproduktion, TUM, Freising, GER

**Tabelle 58: Generierte Konstrukte in dieser Arbeit**

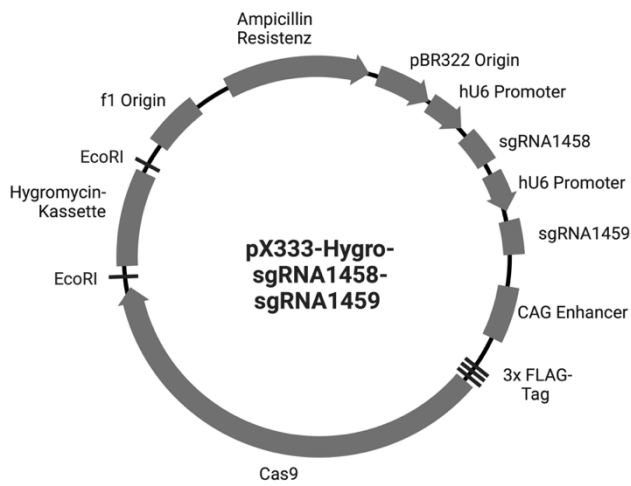
Konstrukt Name	Interne #	Insert	Restriktionsverdau/ Gibson Insert	Ursprüngliches Konstrukt	Restriktionsschnittstelle des erstellten Konstrukts	Assembly	Primer für die Sequenzierung
pX333-Hygro- sgRNA1458-	243	sgRNA1458 sgRNA1459	Für sgRNA1458: BbsI, BshTI,	pX333-p2A- Hygro	Für sgRNA – BbsI, für sgRNA – BsaI	Blunt End T4 DNA Ligase	Für sgRNA1458 15128

sgRNA1459 (siehe Abbildung 8)			für sgRNA1459: Bsal, BshTI						Für sgRNA1459 15119
pX333-Hygro- sgRNA1458- sgRNA1461(siehe Abbildung 9)	255	sgRNA1458 sgRNA1461	Für sgRNA1458: BbsI, BshTI,  für sgRNA1461: Bsal, BshTI	pX333-p2A- Hygro	Für sgRNA – BbsI, für sgRNA – Bsal		Blunt End T4 DNA Ligase		Für sgRNA1458 15128  Für gRNA1461 15119
pX333-Hygro- sgRNA1460- sgRNA1459 (siehe Abbildung 10)	256	sgRNA1458 sgRNA1459	Für sgRNA1460: BbsI, BshTI,  für sgRNA1459: Bsal, BshTI	pX333-p2A- Hygro	Für sgRNA – BbsI, für sgRNA – Bsal		Blunt End T4 DNA Ligase		Für sgRNA1460 15128  Für sgRNA1461 15119
pX333-Hygro- sgRNA1460- sgRNA1461 (siehe Abbildung 11)	257	sgRNA1460 sgRNA1461	Für sgRNA1460: BbsI, BshTI,  für sgRNA1461: Bsal, BshTI	pX333-p2A- Hygro	Für sgRNA1460 – BbsI, für sgRNA1461 – Bsal		Blunt End T4 DNA Ligase		Für sgRNA1460 15128  Für sgRNA1461 15119
pX333-eGFP- sgRNA1460- sgRNA1461 (siehe Abbildung 12)	303	eGFP	Gibson Primer 1001, 1002	pX333-Hygro- sgRNA1460- sgRNA1461	EcoRI		Gibson Assembly		15119 16010, 26
pet45b(+)- chTMPRSS2 (siehe Abbildung 13)	306	chTMPRSS 2	Gibson Primer 1005, 1006	pet45b(+)	BamHI		Gibson Assembly		28, 861, 862
pet45b(+)- chTMPRSS2-Exon 8-14 (siehe Abbildung 14)	392	chTMPRSS 2 Exon 8-14	Gibson Primer 1289, 1006	pet45b(+)	BamHI		Gibson Assembly		28, 861, 862

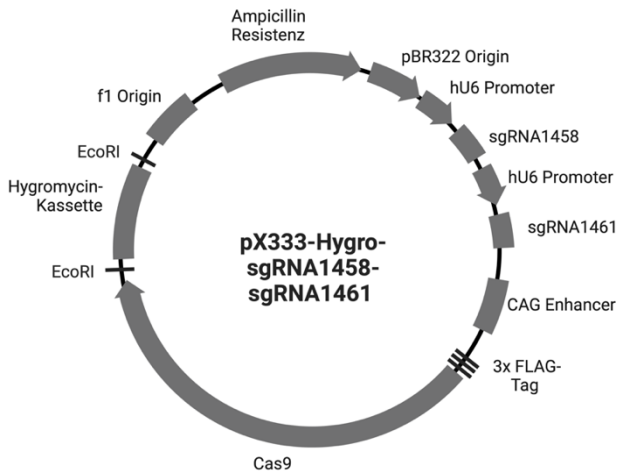
---

pGEM-T <sup>®</sup> Easy - 331 TMPRSS2 LO #3-1 (siehe Abbildung 15)	LongAmp- KO-PCR (902, 903) auf PGC #3- 1 gDNA	pGEM-T Easy	EcoRI	Blunt End 28, 29 T4 DNA Ligase
---	---	-------------	-------	--------------------------------------

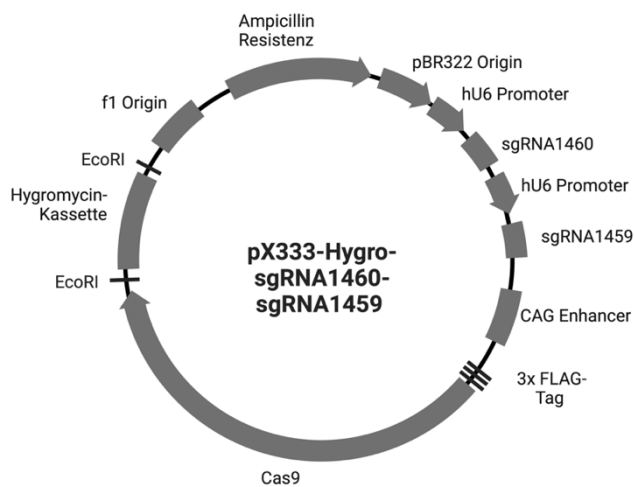
---



**Abbildung 8: pX333-Hygro-sgRNA1458-sgRNA1459 (#243)**



**Abbildung 9: pX333-Hygro-sgRNA1458-sgRNA1461 (#255)**



**Abbildung 10: pX333-Hygro-sgRNA1460-sgRNA1459 (#256)**

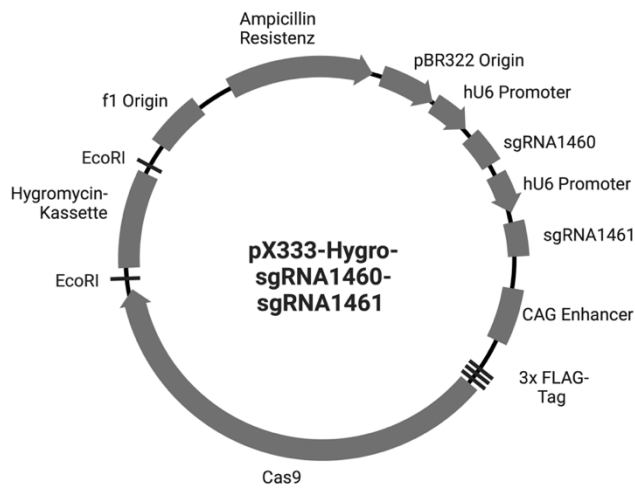


Abbildung 11: pX333-Hygro-sgRNA1460-sgRNA1461 (#257)

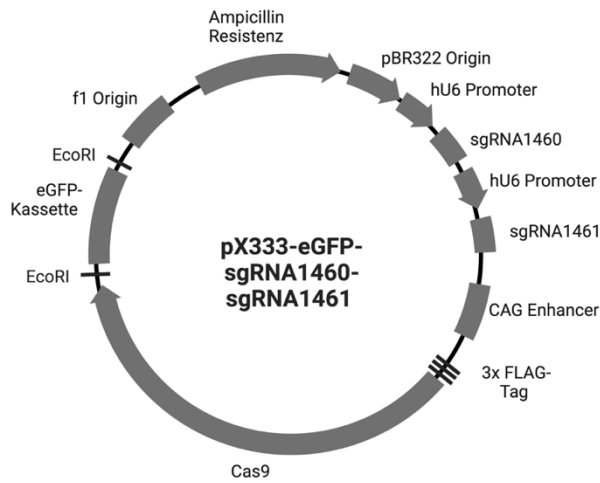


Abbildung 12: pX333-eGFP-sgRNA1460-sgRNA1461 (#303)

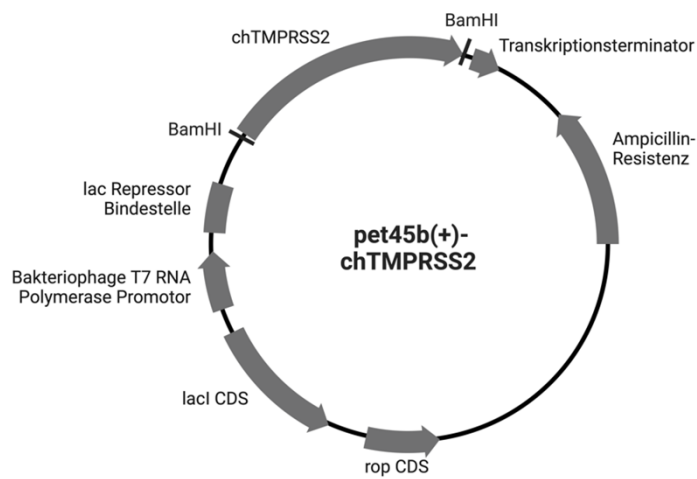


Abbildung 13: pet45b(+)-chTMPRSS2 (#306)

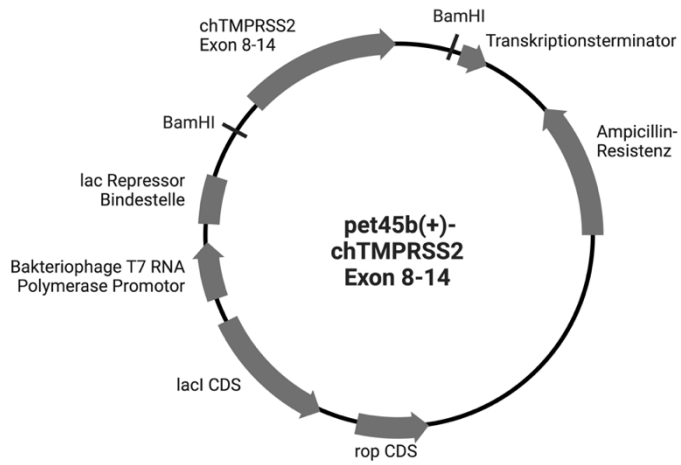


Abbildung 14: pet45b(+)-chTMPRSS2-Exon 8-14 (#392)

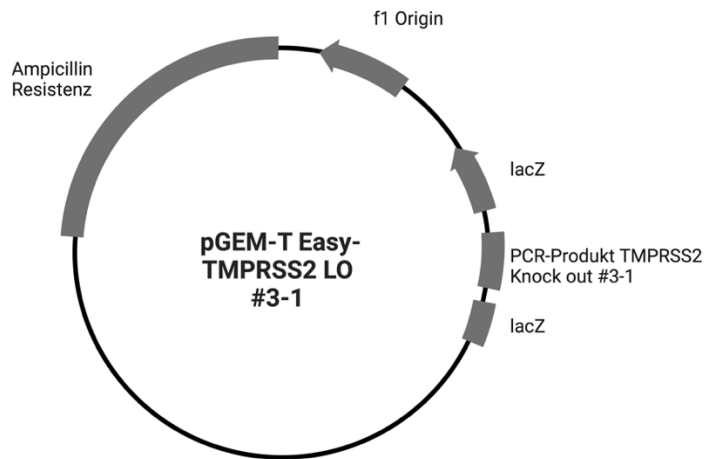


Abbildung 15: pGEM-T® Easy -TMPRSS2 LO #3-1

## 2.11. Software und verwendete Online-Dienste

**Tabelle 59: Verwendete Software**

<b>Software</b>	<b>Link</b>	<b>Firma</b>	<b>Zweck</b>
Benchling	<a href="https://www.benchling.com">https://www.benchling.com</a>	Benchling, San Francisco, USA	Analyse der Ergebnisse der Sanger-Sequenzierungen, Erstellung von Genkarten, Design von CRISPR sgRNAs, Planung von Klonierungen und PCRs, Design von Primern
BioRender	<a href="https://biorender.com">https://biorender.com</a>	BioRender, Toronto, CAN	Erstellung von wissenschaftlichen Abbildungen und Plasmid-Karten
Fusion FX		Vilbert Lourmat, Eberhardzell, GER	Detektion der Western Blots
GraphPad (Prism 9)	Version: 9.3.1.	GraphPad Software, San Diego, USA	Erstellung von wissenschaftlichen Abbildungen und Zusammenfassung der Daten
IBM <sup>®</sup> SPSS <sup>®</sup> Statistics	Version: 28.0.1.1 (14)	IBM, USA	Statistische Analysen
Leica Application Suite X	Version: v.3.7.4.23463	Leica Camera, Wetzlar, GER	Erstellung von Mikroskopie-Aufnahmen
Microsoft Office	Version 16.70	Microsoft, Redmond, USA	Excel, PowerPoint, Word
NCBI	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov">https://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>	NCBI, USA	Genomdatenbank und Erstellung von Genom-Alignments
NCBI Protein Blast	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins</a>	NCBI, USA	Erstellung von Proteinalignments
NEB Tm Calculator	<a href="https://tmcalculator.neb.com/#!/main">https://tmcalculator.neb.com/#!/main</a>	New England Biolabs, Ipswich, USA	Bestimmung der Annealing Temperatur basierend auf der Schmelztemperatur der verwendeten Primer und der genutzten Polymerase



---

NEBioCalculator <sup>®</sup>	<a href="https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation">https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation</a>	New England Biolabs, Ipswich, USA	Berechnung des Insert:Vektor Verhältnisses für die Ligation
Primer-Design Tool "Primer3"	<a href="https://primer3.ut.ee">https://primer3.ut.ee</a>	Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, USA	Design von Primern
PyRat	<a href="https://btr-tum.pyrat.cloud/cgi-bin/login.py">https://btr-tum.pyrat.cloud/cgi-bin/login.py</a>	Scionics Computer Innovation GmbH, Dresden, GER	Datenbank für das Management der Tiere
TIDE: Tracking of IN- DELS by Decomposi- tion	<a href="http://shinyapps.datacurators.nl/tide/">http://shinyapps.datacurators.nl/tide/</a>	Deskop Genetics, Lon- don, Great Britain	Analyse auf INDELS in der Sequenz [192]
VisionCapt „Quantum ST5“	Version 16.15	Vilbert Lourmat, Eberhardzell, GER	Detektion von Agarose-Gelen und der SDS-PAGE
Workbench	<a href="https://workbench.ub.tum.de">https://workbench.ub.tum.de</a>	Technische Universität München, München, GER	Online-Laborbuch zur Dokumentation der Experimente und der generierten Daten

---

## 3. Methoden

### 3.1. Zellkultur

#### 3.1.1. Auftauen der Zellen

Die Zellen wurden standardmäßig in flüssigem Stickstoff bei  $-196\text{ °C}$  gelagert. Um diese aufzutauen, wurden sie direkt vom Stickstofftank in ein  $37\text{ °C}$  warmes Wasserbad überführt. Als die Zellen fast vollständig aufgetaut waren, wurden sie in ein 50 ml Falcon überführt und dann wurde tropfenweise unter Schwenken 20 ml kaltes Manipulation-Medium (siehe Tabelle 11) hinzugegeben. Nach dem Pelletieren der Zellen (10 min, PGCs: 230 g, alle anderen Zellen: 300 g) wurde das Manipulation-Medium abgesaugt, die Zellen wurden typischerweise in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert und anschließend der Zellzahl entsprechend in ein geeignetes Zellkulturgefäß überführt.

#### 3.1.2. Kultivierung von Suspensionszellen

**DT40 Zellen** (siehe Tabelle 4) sind Hühner-B-Zellen aus der Bursa, welche ursprünglich von einem Lymphom stammen, das durch ein ALV ausgelöst wurde [193-195]. Die etablierte Zelllinie kann unkompliziert genetisch verändert werden, weshalb die Zellen eine große Bedeutung in der Forschung und in der Biotechnologie einnehmen [193, 195].

Die Zellen wurden bei  $37\text{ °C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  kultiviert und regulär 3x wöchentlich versorgt. Die Suspensionszellen wurden dafür in ein Falcon überführt und nach dem Pelletieren (10 min, 300g, RT) wurde typischerweise 1/10 der resuspendierten Zellen mit neuem Medium (siehe Tabelle 12) weiter kultiviert.

**PGCs** (siehe Tabelle 4) sind - anders als die DT40 Zellen - Primärzellen, welche aber ebenfalls in Suspension wachsen und eine runde Form aufweisen [164]. Die Zellen leiten sich aus dem Endoderm ab, die meisten PGCs wandern dann in die sich entwickelnden Blutgefäße und gelangen auf diesem Weg schließlich in die Gonadenanlage [196]. Aus diesen Zellen bilden sich bei der Geschlechtsreife Sperma- oder Eizelle, wodurch die PGCs die Erstellung von genetisch veränderten Hühner-Linien ermöglichen [164].

Die Zellen wurden bei  $37\text{ °C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  kultiviert. Die PGCs wurden aus dem Blut von 65 h alten Embryos, welche sich zu dem Zeitpunkt in dem H&H Stadium 14-16 befinden [165, 166, 197], isoliert. Dafür wurden embryonierte Eier mittig angeschliffen, vorsichtig geöffnet und in eine Wägeschale überführt. Im Anschluss wurde unter dem Mikroskop Blut vom Embryo genommen, welches dann in 500  $\mu\text{l}$  PGC-Medium (siehe Tabelle 13)

überführt wurde. Die Nadel wurde zwischen jedem Embryo mit Manipulation-Medium (siehe Tabelle 11) gereinigt.

Im Labor wurde dann der Überstand verworfen, das Blut-Pellet wurde in 150 µl frischem PGC-Medium resuspendiert und in eine 48-Well-Platte überführt, in der je 150 µl PGC-Medium vorgelegt wurde. Die Zellen wurden täglich unter dem Mikroskop kontrolliert und 3x wöchentlich wurde montags, mittwochs und freitags das Medium gewechselt oder die Zellen wurden expandiert.

In der alltäglichen Zellkultur wurden die PGCs im ersten Schritt gezählt, anschließend zentrifugiert (10 min, 230 g, RT) und dann in 2/3 neuem und 1/3 konditioniertem Medium resuspendiert. Dabei wurden die Zellen montags und mittwochs auf eine Zelldichte von 125.000 Zellen/ml und freitags auf 100.000 Zellen/ml ausgesät. Die Zellen wurden jedes Mal in eine neue Zellkulturflasche überführt.

### 3.1.3. Kultivierung von adhärenenten Zellen

MDCK Zellen (siehe Tabelle 4) wurden ursprünglich 1958 von Madin und Darby etabliert [198]. Dabei handelt es sich um Nierenzellen des Hundes, welche ursprünglich für Virus-Wirt-Studien verwendet wurden [198]. Diese Zellen wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit für die Herstellung von Virenstocks mit ungespaltenem HA0 [28] und für die Rücktitration von Virus-infizierten Proben zur Bestimmung des Titers verwendet.

DF-1 Zellen (siehe Tabelle 4) sind eine Hühner-Fibroblasten-Zelllinie, welche ursprünglich von Douglas Foster 1998 aus Hühner-Embryo-Fibroblasten (CEFs) abgeleitet wurde. Die Zellen haben keine endogenen Sequenzabschnitte von aviären Leukose- oder Sarkomviren [199]. Dabei war die Entwicklung der Zelllinie aufgrund einer spontanen Transformation möglich [195].

Die adhärenenten **MDCKs** wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> und die **DF-1 Zellen** wurden bei 40 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Standardmäßig wurden die Zellen 3-mal pro Woche versorgt. Dafür wurden diese mit PBS gewaschen, anschließend für 5 min mit 1,5 ml 0,25x (DF-1) oder 1x (MDCK) Trypsin inkubiert und mit Medium (für MDCKs siehe Tabelle 14; für DF-1 Zellen siehe Tabelle 15) abgestoppt. Das Volumen des Mediums wurde so gewählt, dass die Zellen im ursprüngliche Gesamtvolumen - abhängig von der verwendeten Trypsin-Menge – zentrifugiert (5 min, 300 g, RT) werden konnten. Nach dem Pelletieren der Zellen wurden diese im ursprünglichen Gesamtvolumen resuspendiert, 1:10 gesplittet und weiter kultiviert.

#### 3.1.4. Zählen der Zellen

Das Zählen der Zellen erfolgte mit der Neubauer Zählkammer. Dafür wurde 10 µl der Zellen auf die Kammer gegeben und anschließend wurden die 4 Großquadrate ausgezählt. Mithilfe der untenstehenden Formel wurde die Zellzahl/ml berechnet:

$$\frac{\text{Anzahl der gezählten Zellen}}{4} * 10.000 = \text{Zellzahl/ml}$$

#### 3.1.5. Transfektion von Suspensionszellen

##### 3.1.5.1. Transfektion der DT40 Zellen

Für die Transfektion von DT40 Zellen wurde das Plasmid in PBS verdünnt. Dabei wurden die Zellen gezählt, 5 Mio. Zellen pro Konstrukt wurden pelletiert (10 min, 300 g) und die Pellets wurden in je 1 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert (4 min, 300 g). Diese wurden dann in 100 µl PBS mit 10 µg Plasmid resuspendiert, in die Elektroporationsküvette überführt und elektroporiert (8 Pulse, 125 µSek/Puls, 350 V). Die Zellen wurden mit 500 µl DT40 Medium bei 37 °C für 5 min inkubiert und abschließend in eine T25-Flasche mit 5 ml vorgelegtem DT40 Medium überführt. Typischerweise wurden die Zellen 48 h nach der Elektroporation pelletiert, gDNA wurde isoliert und auf INDELS untersucht.

##### 3.1.5.2. Transfektion der PGCs

Für die Transfektion der PGCs wurde das AMAXA™ Cell Line Nucleofector™ Kit V (siehe Tabelle 54) verwendet. Dafür wurden die Zellen im ersten Schritt gezählt und dann wurden 5 Mio. Zellen pro Konstrukt pelletiert (10 min, 230 g). Im Anschluss wurden die PGCs in je 1 ml PBS vorsichtig resuspendiert und erneut zentrifugiert (4 min, 230 g). Dann wurden die pelletierten Zellen in 100 µl Nucleofector mit Zusätzen (1:4,5 Verdünnung) und 10 µg Plasmid resuspendiert und in die Elektroporationsküvette überführt. Nach der Elektroporation (8 Pulse, 100 µsec/Puls, 350 V) wurde 500 µl PGC-Medium zu den Zellen gegeben und es folgte eine Inkubation von 5 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Anschließend wurden die Zellen in 2/3 neuem und 1/3 konditioniertem Medium resuspendiert und weiter kultiviert.

48 h nach der Transfektion wurden die Zellen auf eGFP<sup>+</sup>-Zellen mit dem AriaFusion BD FACS Zellsorter gesortet. Das transfizierte CRISPR Konstrukt pX333 enthält eine eGFP-Kassette, sodass die Zellen, welche das Plasmid aufgenommen haben, transient den grünen Fluoreszenzfarbstoff exprimieren. Für den Sort wurden die Zellen pelletiert (10 min, 230 g, RT) und in 1 ml PGC-Medium mit Pen/Strep (siehe Tabelle 13)

resuspendiert. Vor dem Sort wurden die Zellen noch durch das im Deckel des FACS-Tubes enthaltene Zellsieb gefiltert. Die eGFP<sup>+</sup>-Zellen wurden dann in 2 FACS-Tubes gesammelt und anschließend wieder in einer 48 Well-Platte in Kultur gebracht. Die Zellen konnten sich nach dem Sort für 1 Woche erholen, wurden dabei in einem Well einer 48-Well-Platte kultiviert und standardmäßig 3x pro Woche mit frischem Medium (siehe 3.1.2) versorgt. Anschließend wurde eine Limiting Dilution (0,5 Zellen/ Well) gestartet. Die Zellen wurden montags, mittwochs und freitags versorgt und kontinuierlich expandiert. Sobald ein Einzelzellklon in eine T25-Zellkulturflasche umgesetzt werden konnte, wurde ein Zellpellet (ca. 300.000 Zellen) genommen, gDNA isoliert (siehe 3.3.1) und auf einen KO der TMPRSS2 Serinprotease-Domäne (siehe 3.3.4.2) analysiert.

### 3.1.6. Transfektion von adhärenenten Zellen

Für die **Transfektion von DF-1 Zellen** wurde das Viafect™ Transfection Reagent gemäß Herstellerangaben (siehe Tabelle 54) verwendet. Dabei wurden am ersten Tag 50.000 Zellen pro Well in einer 24-Well-Platte ausgesät. Am Tag der Transfektion wurde der Mastermix in einem Verhältnis von 6:1 (Transfektionsreagenz : Plasmid), wie in der untenstehenden Tabelle 60 zusammengefasst ist, vorbereitet und für 20 min bei RT inkubiert.

**Tabelle 60: Reaktionszusammensetzung für das Viafect™ Transfection Reagent**

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen</b>
Viafect™ Transfection Reagent	3 µl
Plasmid DNA	500 ng
OptiMEM™	Auf ein Gesamtvolumen von 50 µl

Während der Inkubation wurde das Medium der Zellen erneuert und anschließend wurde der Transfektionsansatz tropfenweise zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden dann weiter bei 40 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 3.1.7. Selektion der transfizierten Zellen mit Antibiotikum

24 h nach der Transfektion wurde die Selektion der Zellen mit Hygromycin gestartet. Dafür wurde das Antibiotikum mit einer Konzentration von 80 ng/µl mit dem DF-1 Medium gemischt und vorsichtig zu den transfizierten Zellen gegeben. Der Selektionsdruck wurde typischerweise für 72 - 96 h aufrecht gehalten und anschließend konnte die Einzelzell-Kultivierung in einer 96-Well-Platte gestartet werden. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 0,5 Zellen/ Well ausgesät und schrittweise expandiert. Sobald die Zellen in eine T25-Flasche überführt werden konnte, wurde ein Zellpellet zur gDNA-Isolierung

(siehe 3.3.1) genommen und für die anschließende Genotypisierung (siehe 3.3.4.2) verwendet.

### 3.1.8. Kryokonservierung

Die Zellen wurden typischerweise in einer Dichte von 1 Mio. Zellen/Vial weggefroren. Dafür wurden diese im ersten Schritt gezählt und anschließend pelletiert. Das Pellet wurde in je 0,9 ml/Vial Manipulation-Medium resuspendiert und dann wurde tropfenweise die gleiche Menge an Manipulation-Medium + 20 % DMSO unter Schwenken hinzugegeben. Abschließend wurden 1,8 ml-Aliquots erstellt, welche dann zuerst für ein kontrolliertes Einfrieren bei -80 °C in einer CoolCell<sup>®</sup> Einfrierbox gelagert und 24 h später dann für die Langzeitlagerung in den flüssigen Stickstoff gebracht wurden.

## 3.2. Tiere und Tierhaltung

Bei den verwendeten Hühnern handelt es sich um LSL-classic (siehe Tabelle 3). Die Tiere wurden in der Versuchsstation Thalhausen, TUM School of Life Science (Ampertshausen 15, 85402 Kranzberg) gehalten. Die Tiere hatten Trinkwasser und konventionelles Legehennenfutter *ad libitum* zur Verfügung.

Die Eier wurden standardmäßig bei 37,8 °C und 55 % Luftfeuchtigkeit unter Wenden (6x täglich) bis ED17 (Embryonaltag, embryonic day) im HEKA Favorit Olymp oder Procon BSS inkubiert. Die Eier wurden dann für den Schlupf ab ED18 ohne Wenden bei 37,2 °C inkubiert. Zum Schlupf (ED20-ED21) wurde die Temperatur noch auf 37 °C bei 80 % Luftfeuchtigkeit angepasst. Während der Inkubation wurden die Eier an ED7 und ED18 geschickt, sodass unbefruchtete Eier oder tote Embryos frühzeitig aussortiert werden konnten.

Für die TOCs wurden die Eier bis ED20 kontinuierlich bei 37,8 °C und 55 % Luftfeuchtigkeit unter 6-maligem Wenden bebrütet.

### 3.2.1. Erstellung von Keimbahn-Chimären

Für die Erstellung der Keimbahn-Chimären wurden im ersten Schritt die PGCs isoliert (siehe 3.1.2), genetisch verändert, gesortet, Einzelzellklone kultiviert (siehe 3.1.5.2) und analysiert (siehe 3.3.4.2). Nachdem ein Einzelzellklon mit einem *TMPRSS2<sup>+/-</sup>* KO identifiziert wurde, konnten die Zellen in 65 h alte Embryos injiziert werden, um so die Keimbahn-Chimären zu erstellen.

Die PGCs wurden dafür am Tag der Injektion gezählt und in einer Konzentration von 3.000 Zellen/ $\mu$ l in 200  $\mu$ l Manipulation Medium resuspendiert.

Die Putenei-Surrogate wurden vor der Injektion an der spitzen Seite geöffnet und der komplette Inhalt wurde verworfen. Bevor der injizierte Embryo in das Putenei überführt wurde, wurde je 1 ml 20 %-Pen/Strep in die Eier gegeben, um möglichen Kontaminationen vorzubeugen. Dabei waren die Puteneier immer zwischen 30 und 40 g schwerer als die LSL-classic WT-Eier.

Die LSL-classic WT-Eier wurden bis zu einem Alter von 65 h inkubiert. Diese wurden dann mit einem DREMEL<sup>®</sup> in der Mitte des Eis vorsichtig angeschliffen, sodass sie vorsichtig mit dem Skalpell geöffnet und in die Wägeschale überführt werden konnten. Bei einer intakten Membran wurde 1  $\mu$ l Zellen in das Blutsystem des Embryos mit einer Mundpipette unter dem Mikroskop injiziert. Anschließend wurde der injizierte Embryo zurück in das Putenei-Surrogate überführt und mit Klarsichtfolie verschlossen. Dann wurden die Eier weiter bebrütet.

Ab ED20 wurden die Embryonen 5-mal täglich kontrolliert. Je nach Entwicklungszustand wurden Luftlöcher in die Klarsichtfolie gestochen, um den natürlichen Schlupfvorgang zu simulieren. Sobald die Küken die Membran mit dem Schnabel öffneten, wurden Luftlöcher in die Klarsichtfolie gemacht. Die Küken wurden alle 4 h kontrolliert, um das sichere Schlüpfen der Tiere zu gewährleisten. Sobald das Loch in der Membran einen Durchmesser von ca. 0,75 cm hatten, wurden die Tiere vorsichtig in einen Karton gesetzt.

### 3.2.2. Sammeln von Sperma-Proben

Nachdem die Chimären in einem Alter von ca. 16 Wochen geschlechtsreif waren, wurden die Tiere zur Spermagewinnung trainiert und Spermaproben wurden für die anschließende Genotypisierung gesammelt. Dafür wurden die Federn um die Kloake gestutzt.

Die Tiere wurden auf eine weiche Unterlage an der Tischkante gesetzt, eine Person hielt die Beine der Tiere fest und massierte mit der anderen Hand den Hahn abdominal. Sobald die Kloake nach außen gestülpt war, drückte die zweite Person diese vorsichtig zusammen und die Spermaprobe wurde in einem 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen aufgefangen. Wurde die Probe dabei durch Kot verunreinigt, wurde diese verworfen. Ansonsten wurde gDNA aus der Spermaprobe (siehe 3.3.1), isoliert und die Probe konnte auf die genetische Veränderung (siehe 3.3.4.2) untersucht werden.

### 3.2.3. Blutabnahme

Die Blutabnahme erfolgte bei den Küken, aber auch bei den erwachsenen Tieren, immer an der *Vena jugularis dextra*. Dabei wurde die entsprechende Stelle am Hals zuerst mit 70 % EtOH desinfiziert und die benötigte Menge an Blut wurde vorsichtig entnommen. Diese richtet sich gemäß den Richtlinien von GV-Solas. Das Blut wurde dann in EDTA-Mikroküvetten gegeben, um die Blutgerinnung zu unterbinden. In diesem Zusammenhang wurden die Küken außerdem gegen die Marek-Krankheit geimpft und Flügelmarken wurden eingezogen.

## 3.3. Molekularbiologische Methoden

### 3.3.1. Isolierung genomischer DNA

**Genomische DNA (gDNA) aus Zellen, Blut, Gewebe oder Sperma** wurde mithilfe des ReliaPrep™ Blood gDNA MiniPrep Systems gemäß Herstellerangaben (siehe Tabelle 54) isoliert.

Dafür wurden die zuvor pelletierten Zellen (mind. 300.000 Zellen) in 200 µl Cell Lysis Buffer (CLD) und 20 µl Proteinase K resuspendiert, für 10 Sek. gevortext und anschließend für 10 min bei 56 °C inkubiert. Im nächsten Schritt wurde 250 µl Binding Buffer (BBA) hinzugegeben, erneut für 10 Sek. gevortext und auf die ReliaPrep™ Binding Column, welche in einem Collection Tube steckte, gegeben. Die Säule wurde dann zentrifugiert (1 min, max. Geschwindigkeit) und der Durchfluss verworfen. Im nächsten Schritt wurde die Säule 3x mit je 500 µl Column Wash Solution (CWD) gewaschen (3 min, max. Geschwindigkeit). Abschließend wurde die Säule in ein 1,5 ml Eppendorf Röhrchen überführt und die gDNA wurde von der Säule in 50 – 100 µl nuklease-freiem H<sub>2</sub>O eluiert. Die gDNA wurde bei -20 °C gelagert.

Für die Isolierung von gDNA aus Blut wurde 5 µl Probe mit 195 µl PBS, 200 µl Cell Lysis Buffer und 20 µl Proteinase K gemischt. Für die Isolierung von gDNA aus Sperma wurde 5 µl Sperma mit 195 µl PBS, 200 µl Cell Lysis Buffer und 20 µl Proteinase K gemischt, für 10 Sek. gevortext und anschließend ÜN bei 56 °C inkubiert. Gewebeproben wurden mit 200 µl Cell Lysis Buffer und 20 µl Proteinase K gemischt und ebenfalls ÜN bei 56 °C inkubiert. Anschließend wurde das Protokoll, wie oben beschrieben, durchgeführt.

**gDNA aus Zellen** wurde ebenfalls mit dem „Quick & Dirty Protokoll“ isoliert. Dafür wurde das Zellpellet in 30 µl 100 mM NaOH resuspendiert und anschließend für 5 min bei 95 °C inkubiert. Dann wurde 100 µl 75 mM Tris-HCl hinzugegeben, die Probe wurde kurz



gevortext und anschließend zentrifugiert (30 Sek., 13000 g). Es wurden standardmäßig 2 µl der gDNA im Überstand in PCRs verwendet. Die gDNA wurde bei -20 °C gelagert.

**gDNA aus Blut** wurde vor allem bei einer größeren Probenanzahl mit dem „Quick & Dirty Protokoll“ isoliert. Dafür wurde 1 µl Blut zu 200 µl STM-Puffer (siehe Tabelle 23) gegeben, gevortext und anschließend zentrifugiert (5 min, 1000 g). Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Pellet in 400 µl TEN-Puffer (siehe Tabelle 24) mit Pronase E (100 µg/ml) resuspendiert und für 1 h bei 37 °C und unter Schütteln (250 rpm) inkubiert. Zur Inaktivierung der Pronase E folgte eine abschließende Inkubation für 15 min bei 65 °C ebenfalls unter Schütteln. Es wurden standardmäßig 2 µl der gDNA in PCRs verwendet. Die gDNA wurde bei -20 °C gelagert.

**gDNA aus Gewebe** wurde ebenfalls standardmäßig mit dem „Quick and Dirty Protokoll“ isoliert. Dafür wurde ein kleines Stück Gewebe mit 250 µl Tissue Lysis Buffer (siehe Tabelle 26) und 10 µl Proteinase K (20 mg/ml) durch Vortexen gemischt und anschließend für 12 – 20 h bei 56 °C unter Schütteln (350 rpm) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben erneut gevortext und dann zentrifugiert (20 min, 3600 rpm). Im nächsten Schritt wurde 50 µl Überstand mit 50 µl Isopropanol in einer 96-Well-Platte gemischt, gevortext und zentrifugiert (15 min, 3600 rpm). Der Überstand wurde komplett verworfen und das Pellet wurde für mind. 10 – 15 min bei RT getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl nuklease-freies Wasser resuspendiert und es folgte eine finale Inkubation für 30 min bei 56 °C unter Schütteln. Es wurden standardmäßig 2 µl der gDNA in PCRs verwendet. Die gDNA wurde bei -20 °C gelagert.

**gDNA aus Sperma** wurde auch mit einem „Quick & Dirty Protokoll“ isoliert. Dafür wurde 5 µl Sperma mit 200 µl TEN Puffer und Pronase E (100 µg/ml) gemischt, gevortext und anschließend ÜN bei 37 °C unter Schütteln (500 rpm) inkubiert. Um die Pronase E zu inaktivieren, erfolgte eine zweite Inkubation für 10 min bei 65 °C unter Schütteln. Es wurden standardmäßig 2 µl der gDNA in PCRs verwendet. Die gDNA wurde bei -20 °C gelagert.

### 3.3.2. Isolierung von RNA

Für die Isolierung der **RNA aus Zellen** wurde das ReliaPrep™ RNA Cell MiniPrep System gemäß Herstellerangaben (siehe Tabelle 54) genutzt.

Im ersten Schritt wurden die pelletierten Zellen erneut in kaltem PBS resuspendiert und erneut pelletiert (5 min, 300 g, RT). Währenddessen wurde 1-Thioglycerol im BL-Puffer im Verhältnis 1:100 verdünnt. Die pelletierten Zellen wurden in diesem Puffer

resuspendiert. Das Volumen wurde dabei gemäß Herstellerangaben abhängig von der Zellzahl angepasst. Um die DNA zu scheren, wurde die Probe noch 7-10x auf- und abpipettiert.

Im nächsten Schritt wurde die vom Hersteller empfohlene Menge an 100 % Isopropanol hinzugegeben und die Probe wurde für 5 Sek. gevortext und anschließend auf eine Minicolumn gegeben und zentrifugiert (30 Sek., 14.000 g, RT). Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule wurde mit 500 µl RNA Wash Solution gewaschen (30 Sek., 14.000 g, RT). Anschließend wurde der Durchfluss erneut verworfen. Dann wurde der Mastermix für den DNase I Verdau angesetzt, welcher pro Probe 24 µl Yellow Core Buffer, 3 µl MnCl<sub>2</sub> und 3 µl DNase I enthält und in der angegebenen Reihenfolge vorsichtig gemischt wurde. Anschließend wurde dieser für 15 min bei RT auf der Säule inkubiert. Nach dem Hinzugeben von 200 µl Column Wash Solution (30 Sek., 14.000 g, RT) wurde die Säule mit 500 µl RNA Wash Solution (30 Sek., 14.000 g, RT) gewaschen, der Durchfluss wurde verworfen. Dieser Waschschrift wurde erneut mit 300 µl RNA Wash Solution wiederholt (2 min, max. Geschwindigkeit, RT). Im letzten Schritt wurde die Säule in ein neues Eppendorf-Röhrchen gesteckt und in der empfohlenen Menge in nuklease-freiem Wasser eluiert (1 min, 12.000 g, RT). Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

Die Isolierung der **RNA aus Geweben** erfolgte mit dem ReliaPrep™ RNA Tissue MiniPrep System von Promega™ gemäß Herstellerangaben (siehe Tabelle 54) verwendet.

Dafür wurde im ersten Schritt 1-Thioglycerol mit dem LBA-Buffer gemäß Herstellerangaben im Verhältnis 1:50 gemischt und zu dem Gewebe hinzugefügt. Dieses wurde im Anschluss in einem Gewebe-Homogenisator in einem InnuSpeed Lysis Tube A homogenisiert und dann wurde die Probe noch 7 bis 10x auf- und abpipettiert, um die DNA zu scheren.

Die Probe wurde zentrifugiert (3 min, 14.000 g) und in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt. Dann wurde die empfohlene Menge an 100 % Isopropanol hinzugegeben und für 5 Sek. gevortext. Das Lysat wurde auf eine Minicolumn gegeben und zentrifugiert (30 Sek., 14.000 g, RT). Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule wurde mit 500 µl RNA Wash Solution gewaschen (30 Sek., 14.000 g, RT). Im Anschluss wurde der Ansatz für den DNase I Verdau vorbereitet. Dafür wurde pro Probe 24 µl Yellow Core Buffer mit 3 µl MnCl<sub>2</sub> und 3 µl DNase I vorsichtig gemischt und auf die Membran gegeben. Nach einer Inkubation von 15 min bei RT wurden 200 µl Column Wash Solution hinzugefügt (30 Sek., 14.000 g, RT). Die Säule wurde daraufhin mit 500 µl RNA Wash Solution (30 Sek., 14.000 g, RT) und anschließend mit 300 µl RNA Wash Solution (2 min, max. Geschwindigkeit, RT) gewaschen. Diese wurde in ein neues Eppendorf-

Röhrchen gesteckt und mit der empfohlenen Menge in nuklease-freiem Wasser eluiert (1 min, 12.000 g, RT). Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

Im Falle von fibrösem Gewebe, wie beispielsweise Herz oder Brustmuskel, wurde dieses in 1-Thioglycerol und LBA-Buffer homogenisiert, anschließend 7 bis 10-mal auf- und abpipettiert, dann mit dem identischen Volumen RNA Dilution Buffer (RDB) gemischt und für 10 Sek. gevortext. Nach einer Inkubation von 1 min bei RT wurde das Homogenat zentrifugiert (3 min, 10.000 g, RT). Dann wurde die empfohlene Menge an Isopropanol hinzugegeben und das Protokoll nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 3.3.3. cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde das GoScript™ Reverse Transcription Mix, Random Primers Kit gemäß Herstellerangaben (siehe Tabelle 54) verwendet. Dafür wurden die verschiedenen Komponenten, wie in Tabelle 61 dargestellt, gemischt:

**Tabelle 61: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die cDNA-Synthese**

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen</b>
GoScript™ Reaction Buffer, Random Primers	4 µl
GoScript™ Enzyme Mix	2 µl
RNA	400 ng
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	Auf ein Gesamtvolumen von 20 µl

Der Ansatz wurde durch vorsichtiges Pipettieren gemischt und anschließend, wie in Tabelle 62 beschrieben, inkubiert:

**Tabelle 62: Temperaturprogramm cDNA Synthese**

<b>Schritte</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	<b>Anzahl Zyklen</b>
Primer Annealing	25 °C	5 min	1 x
Extension	42 °C	60 min	1 x
Inaktivierung	70 °C	15 min	1 x

Die cDNA wurde nach der Inaktivierung (siehe Tabelle 62) noch für 5 min auf Eis inkubiert, anschließend mit 20 µl nuklease-freiem H<sub>2</sub>O gemischt, 5 µl-Aliquots wurden vorbereitet und anschließend bei -20 °C gelagert.

### 3.3.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)

In dieser Arbeit wurden die verschiedenen Polymerasen individuell je nach Fragmentlänge und Verwendung gewählt. Die Annealing Temperatur wurde standardmäßig mit dem „Tm Calculator“ von NEB (siehe Tabelle 59) berechnet. Sollten sich die

Schmelztemperaturen der beiden Primer um mehr als 5 °C unterscheiden, wurde im ersten Schritt der Etablierung der PCR ein Temperaturgradient getestet, welcher sich an der von dem T<sub>m</sub> Calculator berechneten Temperatur orientierte.

Die Elongationszeit ist definiert, als die Zeit, die die spezifische Polymerase für das Amplifizieren von 1 kb benötigt. Sind die Annealing Temperatur und die Temperatur während der Elongation entsprechend den Herstellerangaben, kann auch eine 2-Step-PCR durchgeführt und der Schritt des Annealings so übersprungen werden.

Die FIREpol<sup>®</sup> DNA-Polymerase ist eine thermostabile *Taq* DNA Polymerase mit 5' und 3' Enzymaktivität. Das PCR-Produkt enthält immer polyA Tails. Laut Protokoll wird eine cDNA-Konzentration von 0,01 pg/μl bis 0,1 ng/μl und eine gDNA-Konzentration von 0,1 ng/μl bis 10 ng/μl empfohlen [200]. Die FIREpol<sup>®</sup> DNA-Polymerase wurde vor allem für die Amplifikation von kurzen DNA-Fragmenten verwendet. Die untenstehenden Tabellen fassen die Reaktionszusammensetzung (siehe Tabelle 63) und das verwendete Temperaturprogramm (siehe Tabelle 64) zusammen.

**Tabelle 63: Reaktionszusammensetzung für den FIREpol<sup>®</sup> DNA Polymerase Mastermix**

5x FIREpol <sup>®</sup> DNA Polymerase Mastermix	4 μl
Forward Primer (1 pmol/μl)	4 μl
Reverse Primer (1 pmol/μl)	4 μl
Template DNA	variabel
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	Auf ein Gesamtvolumen von 20 μl

**Tabelle 64: Temperaturprogramm für den FIREpol<sup>®</sup> DNA Polymerase Mastermix**

Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	
Denaturierung	95 °C	30 Sek.	
Annealing	50 – 68 °C	30 Sek.	x 35
Elongation	72 °C	1 min/kb	
Finale Elongation	72 °C	5 min	
Lagerung	4 °C	unbegrenzt	

Die **HOT FIREpol<sup>®</sup> DNA Polymerase Mastermix** ist ebenfalls eine thermostabile *Taq* DNA Polymerase [201] und erlaubt den Nachweis von mehreren Targets in einer Reaktion [202]. Diese Polymerase wurde standardmäßig für die Geschlechtsbestimmung der Tiere, sowie für den Nachweis eines *TMPRSS2<sup>-/-</sup>* Genotypen verwendet. Die untenstehenden Tabelle 65 und Tabelle 66 fassen die Reaktionszusammensetzung und das verwendete Temperaturprogramm zusammen.

**Tabelle 65: Reaktionszusammensetzung für den HOT FIREpol® DNA Polymerase Mastermix**

5x HOT FIREpol® DNA Polymerase Mastermix	4 µl
Forward Primer (1 pmol/µl)	Je 1 µl
Reverse Primer (1 pmol/µl)	Je 1 µl
Template DNA	variabel
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	Auf ein Gesamtvolumen von 20 µl

**Tabelle 66: Temperaturprogramm für den HOT FIREpol® DNA Polymerase Mastermix**

Initiale Denaturierung	95 °C	12 min	
Denaturierung	95 °C	30 Sek.	
Annealing	50 – 68 °C	30 Sek.	x 35
Elongation	72 °C	1 min/kb	
Finale Elongation	72 °C	5 min	
Lagerung	4 °C	unbegrenzt	

Die **Q5® High-Fidelity DNA Polymerase** ist ebenfalls eine thermostabile DNA-Polymerase. Diese wurde aufgrund der niedrigen Fehlerrate im Vergleich zu einer *Taq*-Polymerase [203] typischerweise für Klonierungen verwendet. Diese niedrige Fehlerrate liegt an der 3' zu 5' Exonuklease-Aktivität. Das PCR-Produkt hat allerdings keine polyA Tails.

Laut Protokoll werden DNA-Konzentrationen zwischen 1 ng und 1 µg gDNA und 1 pg bis 1 ng von Plasmid- oder viraler DNA empfohlen. Bei einem besonders hohen GC-Gehalt des zu amplifizierenden Fragments kann noch ein GC Enhancer zum Reaktionsmix hinzugefügt werden [204]. Die untenstehenden Tabellen fassen die Reaktionszusammensetzung (siehe Tabelle 67) und das verwendete Temperaturprogramm (siehe Tabelle 68) zusammen.

**Tabelle 67: Reaktionszusammensetzung für die Q5® High-Fidelity DNA Polymerase**

5X Q5® Reaction Buffer	5 µl
10 mM dNTPs	0,5 µl
Forward Primer (10 pmol/µl)	1,25 µl
Reverse Primer (10 pmol/µl)	1,25 µl
Template DNA	variabel
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	0,25 µl
5X Q5® High GC Enhancer	(5 µl)
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	Auf ein Gesamtvolumen von 25 µl

**Tabelle 68: Temperaturprogramm für die Q5® High-Fidelity DNA Polymerase**

Initiale Denaturierung	98 °C	30 Sek.	
Denaturierung	95 °C	30 Sek.	
Annealing	50 – 72 °C	20 Sek.	x 35
Elongation	72 °C	20-30 Sek./kb	
Finale Elongation	72 °C	2 min	
Lagerung	4 °C	unbegrenzt	

Die **LongAmp® Taq DNA Polymerase** eignet sich besonders für das Amplifizieren von längeren DNA-Fragmenten oder von komplizierteren Stellen im Genom. Das PCR-Produkt hat dA-Überhänge am 3' Ende.

Laut Protokoll sind für Fragmente, die kleiner als 15 kb sind, DNA-Konzentrationen von 10 ng bis 1 µg (gDNA) und 10 pg bis 10 ng (Plasmid- oder virale DNA) empfohlen [205]. Die untenstehenden Tabellen fassen die Reaktionszusammensetzung (siehe Tabelle 69) und das verwendete Temperaturprogramm (siehe Tabelle 70) zusammen.

**Tabelle 69: Reaktionszusammensetzung für die LongAmp® Taq DNA Polymerase**

5X LongAmp Taq Reaction Buffer	5 µl
10 mM dNTPs	0,75 µl
Forward Primer (10 pmol/µl)	2 µl
Reverse Primer (10 pmol/µl)	2 µl
Template DNA	variabel
LongAmp® Taq DNA Polymerase	1 µl
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	Auf ein Gesamtvolumen von 25 µl

**Tabelle 70: Temperaturprogramm für die LongAmp® Taq DNA Polymerase**

Initiale Denaturierung	94 °C	30 Sek.	
Denaturierung	94 °C	30 Sek.	
Annealing	45 – 65 °C	30-60 sec	x 30
Elongation	65 °C	50 Sek./kb	
Finale Elongation	65 °C	10 min	
Lagerung	4 °C	unbegrenzt	

### 3.3.4.1. PCR zur Geschlechtsbestimmung

Für das **Sexing** wurden die Primer 1, 2, 3 und 4 (siehe Tabelle 55) verwendet. Dabei amplifizierte die HOT FIREpol® Multiplex DNA Polymerase mit den Primern 1 und 2 250 bp auf dem Z-Chromosom, wohingegen die Primer 3 und 4 im W-Chromosom banden und ein Fragment mit 375 bp detektieren. Die Annealing-Temperatur lag bei 56 °C und die Elongationszeit betrug 30 Sek bei 35 Zyklen. Dadurch hatten die Hennen 2 Banden, wohingegen die Hähne nur eine Bande bei 250 bp zeigten.

#### 3.3.4.2. PCR für den Nachweis des KOs der TMPRSS2 Serinprotease-Domäne

Für den Nachweis eines *TMPRSS2*<sup>+/-</sup> bzw. *TMPRSS2*<sup>-/-</sup> Genotyps wurde die LongAmp<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase verwendet. Für diese PCR banden die Primer 902 und 903 (siehe Tabelle 55) im Intron nach Exon 9 und in Exon 14 und amplifizierten 332 bp. Da die Annealing-Temperatur der Primer für 63 °C berechnet wurde und die Temperatur während der Elongation bei 65 °C für die LongAmp<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase lag, wurde eine 2-Step-PCR gewählt. Dabei war die Elongationszeit bei 30 Sek. mit 40 Zyklen. Bei dieser gewählten Elongationszeit wurde diese auf das kurze Fragment, welches spezifisch für einen KO der TMPRSS2 Serinprotease-Domäne war, optimiert.

Um *TMPRSS2*<sup>+/-</sup> von *TMPRSS2*<sup>-/-</sup> Klonen zu unterscheiden, wurde eine WT-Kontroll-PCR mit der FIREpol<sup>®</sup> DNA Polymerase etabliert. Bei dieser PCR banden die Primer 861 und 1094 (siehe Tabelle 55) in Exon 11 und in dem darauffolgenden Intron. Die Annealing Temperatur lag bei 56 °C bei einer Elongationszeit von 35 Sek. mit 40 Zyklen. Das Amplikon hatte eine Länge von 486 bp. Ausschließlich die heterozygoten Proben zeigten eine Bande.

Für die Unterscheidung der *TMPRSS2*<sup>-/-</sup> Klone von *TMPRSS2*<sup>+/-</sup> und WT-Proben wurde eine Multiplex-PCR etabliert. Hier wurde die HOT FIREpol<sup>®</sup> DNA Polymerase verwendet. Die Primer 936 und 937 (siehe Tabelle 55) banden in dem Intron nach Exon 2 und in Exon 4 bei einem Amplikon von 704 bp. Die Primer 861 und 1094 (siehe Tabelle 55) banden in Exon 11 und in dem nachfolgenden Intron mit einem Amplikon von 486 bp. Diese Primer banden in dem Bereich, der im Fall einer genetischen Modifikation mithilfe von CRISPR/Cas9 entfernt wurde. Es wurde eine Annealing-Temperatur von 62 °C und eine Elongationszeit von 40 Sek. bei 35 Zyklen verwendet. Dabei zeigten alle Proben eine Bande bei 704 bp, wohingegen nur die *TMPRSS2*<sup>+/-</sup> oder die WT-Proben eine Bande bei 486 bp aufwiesen.

#### 3.3.4.3. PCR zum Nachweis von Cas9

Der Nachweis von Cas9 erfolgte mit dem FIREpol<sup>®</sup> DNA Polymerase Mastermix und den Primern 1085 und 1086 (siehe Tabelle 55) bei einer Amplikon-Länge von 685 bp. Die Elongationszeit betrug 50 Sek. bei einer Annealing-Temperatur von 56 °C bei 35 Zyklen.

#### 3.3.4.4. PCRs für Klonierungen

Für die Klonierungen der *chTMPRSS2*-cDNA in den pET45b(+)-Backbone (siehe Tabelle 57) wurde die Q5<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase mit den Primern 1005, 1289 und 1006 (siehe Tabelle 55), welche in Exon 2, Exon 8 und in Exon 14 banden, verwendet. Die Primer waren Gibson-Primer, dabei interagierte ein Teil des Primers jeweils mit der cDNA von *chTMPRSS2* und der restliche Bereich des Primers ermöglichte einen Überhang mit dem pET45b(+)-Backbone. Für beide PCRs wurde eine Annealing Temperatur von 67 °C verwendet, jedoch variierte die Elongationszeit. Für die Amplifikation des kompletten *chTMPRSS2* mit den Primern 1005 und 1006 wurden 45 Sek. bei 35 Zyklen verwendet und für die Amplifikation des *chTMPRSS2*-Fragments von Exon 8 bis Exon 14 mit den Primern 1289 und 1006 wurde eine Elongationszeit von 30 Sek. bei 35 Zyklen gewählt.

Für die Klonierungen der *eGFP*-Kassette in das pX333-Konstrukt wurde ebenfalls die Q5<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase mit Gibson-Primern verwendet. Die beiden Primer 1001 und 1002 (siehe Tabelle 55) amplifizierten die *eGFP*-Kassette mit einer Länge von 834 bp und bildeten zusätzlich die Überhänge, um die Klonierung in das Backbone zu ermöglichen. Dabei wurde eine Annealing Temperatur von 70 °C bei einer Elongationszeit von 25 Sek. mit 35 Zyklen gewählt.

#### 3.3.4.5. Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

In der RT-PCR wurde das Amplikon auf cDNA-Ebene amplifiziert. Dafür wurden für *chTMPRSS2* die Primer 861 und 862 (siehe Tabelle 55) genutzt, wodurch ein PCR-Produkt mit einer Länge von 162 bp amplifiziert wurde. Als Housekeeping-Gen wurde *BETA-ACTIN* mit den Primern 277 und 278 (siehe Tabelle 55) verwendet, wodurch ein Amplikon von 300 bp gebildet wurde. Für die RT-PCR wurde die FIREpol<sup>®</sup> DNA Polymerase bei einer Annealing-Temperatur von 56 °C und einer Elongationszeit von 25 Sek. mit 40 Zyklen genutzt.

#### 3.3.5. Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auswertung einer PCR, einer PCR-Produkt-Aufreinigung oder eines Verdaus wurde die Probe auf ein Agarose-Gel geladen. Dabei wurde entweder ein TBE- (siehe Tabelle 27) oder ein TAE-Gel (siehe Tabelle 28) verwendet, je nachdem, ob nur die Größe der DNA überprüft oder ob die Probe noch aus dem Gel aufgereinigt wurde. Die nachfolgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung eines 1 % Gels. Wenn kleine Fragmente (ca. bis ca. 300 bp) aufgetrennt wurden, wurde ein 1,5 oder ein 2 % Gel



verwendet. Bei DNA, die größer als 4 kb ist, wurde ein 0,8 % Gel genutzt. Abhängig von der Größe des Gels wurde eine Spannung von 80, 100 oder 140 V angelegt.

**Tabelle 71: Zusammensetzung des Agarose-Gels**

	<b>50 ml Gel</b>	<b>100 ml Gel</b>	<b>300 ml Gel</b>
TBE/ TAE Puffer	50 ml	100 ml	300 ml
PeqGREEN	2 µl	4 µl	12 µl
Agarose	0,5 g	1 g	3 g

Der fluoreszierende DNA Farbstoff PeqGREEN wurde verwendet, um die DNA unter dem UV-Licht sichtbar zu machen [206]. Der 1kb Plus DNA Ladder erlaubte die Größenbestimmung der aufgetrennten Banden auf dem Gel.

### 3.3.6. DNA-Aufreinigung

#### 3.3.6.1. DNA-Aufreinigung aus einem PCR-Produkt

Die DNA-Aufreinigung des PCR-Produkts erfolgte mithilfe des Wizard® SV Gel and PCR Clean-up Systems (siehe Tabelle 54) gemäß Herstellerangaben. Dafür wurde im ersten Schritt das identische Volumen Membrane Binding Solution zu dem PCR-Produkt hinzugefügt.

Im Anschluss wurde die Suspension auf die SV Minicolumn gegeben und für 1 min bei RT inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (1 min, 16.000 g) wurde 700 µl Membrane Wash Solution hinzugegeben und erneut zentrifugiert (1 min, 16.000 g). Der Durchfluss wurde verworfen und dieser Schritt wurde erneut mit 500 µl Membrane Wash Solution wiederholt (5 min, 16.000 g). Die Säule wurde in ein neues Collection Tube gegeben und erneut zentrifugiert (1 min, max. Geschwindigkeit). Im letzten Schritt wurde die DNA in 20 – 50 µl nuklease-freiem H<sub>2</sub>O eluiert. Die DNA wurde bei -20 °C gelagert.

#### 3.3.6.2. DNA-Aufreinigung aus einem Gel-Stück

Für die DNA-Aufreinigung aus einem Gelstück wurde das E.N.Z.A.® Gel Extraction Kit von Omega gemäß Herstellerangaben (siehe Tabelle 54) verwendet.

Im ersten Schritt wurde der XP2 Binding Buffer (1 ml Puffer/ 1 g Gelstück) zum ausgeschnittenen Gelstück hinzugegeben, welches im Anschluss bei 60 °C geschmolzen wurde. Max. 700 µl der Mischung wurde auf die Säule gegeben und dann wurde diese zentrifugiert (1 min., 10.000 g, RT). Dieser Schritt wurde so lange wiederholt, bis die Mischung komplett auf die Säule gegeben wurde.

Die Säule wurde im nächsten Schritt mit 300 µl XP2 Binding Buffer gewaschen (1 min, 10.000 g, RT) und der Durchfluss wurde verworfen. Dann wurde 700 µl des SPW Buffers auf die Säule gegeben (1 min, max. Geschwindigkeit, RT) und der Durchfluss wurde erneut verworfen. Die leere Säule wurde in einem frischen Röhrchen erneut zentrifugiert (2 min, max. Geschwindigkeit, RT) und anschließend in ein neues Eppendorf-Röhrchen gesteckt. Abschließend wurde die DNA in 30 µl Elutionspuffer nach einer Inkubation von 1 min bei RT eluiert (1 min, max. Geschwindigkeit, RT). Die DNA wurde bei -20 °C gelagert.

### 3.3.7. Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration mit dem NanoDrop™ Lite

Die Konzentration der DNA und RNA wurde mithilfe des NanoDrop™ Lite Spektrophotometers gemäß des Herstellerprotokolls bestimmt. Als Blank wurde immer der Puffer, in dem die Probe zuvor eluiert wurde, verwendet. Der  $A_{260}/A_{280}$ -Wert macht Angaben zur Reinheit der Probe. Wenn dieser zwischen 1,8 und 2,0 lag, so wurde die Reinheit als gut eingestuft [207].

## 3.4. Klonierung

### 3.4.1. Ligation in den pGEM-T® Easy Backbone

Der pGEM-T® Easy Backbone (siehe Tabelle 57) wird typischerweise für die Klonierung von PCR-Produkten verwendet. Der Backbone hat unter anderem zwei internen Primer T7 und SP6 (siehe Tabelle 55) an den 5'- und 3'-Enden der multiplen Klonierungsstelle [208]. Dafür wurden generell verschiedene Insert:Vektor Verhältnisse (1:1, 3:1, 5:1) getestet, die mit der untenstehenden Formel bestimmt werden konnten.

$$\frac{ng \text{ Vektor} * kb \text{ Größe Insert}}{kb \text{ Größe Vektor}} * \text{Verhältnis (Insert:Vektor)} = ng \text{ Insert}$$

Der pGEM-T® Easy Vektor hat eine Größe von 3015 bp und es wurden standardmäßig 50 ng Vektor verwendet. Tabelle 72 zeigt den Ligationsansatz:

**Tabelle 72: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Ligation in den pGEM-T® Easy Vektor**

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen</b>
2x Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5 µl
pGEM-T® Easy Vektor	50 ng
Insert	X ng
T4 DNA Ligase	1 µl
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	Auf ein Gesamtvolumen von 20 µl

Der Reaktionsansatz wurde durch Pipettieren gemischt und für 1 h bei RT oder ÜN bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ligationsansatz in kompetente Bakterien transformiert.

### 3.4.2. Gibson Assembly

Das Gibson Assembly wurde bei der Klonierung der verschiedenen Plasmide für die Proteinproduktion und für den Austausch der Hygromycin-Resistenz durch die eGFP-Kassette verwendet (siehe Tabelle 58). Das Insert hatte dabei jeweils Überhänge zu dem Backbone und die Ligation erfolgte dann mithilfe des NEBuilder® HiFi DNA Assembly Mastermix (siehe Tabelle 54). Der Reaktionsansatz (siehe Tabelle 73) wurde für 1 h bei 50 °C inkubiert und anschließend in kompetente Bakterien transformiert.

**Tabelle 73: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für den NEBuilder® HiFi DNA Assembly Mastermix**

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen</b>
NEBuilder® HiFi DNA Assembly Mastermix	10 µl
Backbone	100 ng
Insert	X ng
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	Auf ein Gesamtvolumen von 20 µl

Die Menge an Insert wurde mit dem NEBioCalculator® (siehe Tabelle 59) mit einem Insert:Backbone Verhältnis von 3:1 berechnet.

### 3.4.3. CRISPR Klonierung

Die Klonierung von sgRNAs (siehe Tabelle 56, Tabelle 57, Tabelle 58) in einen CRISPR-Backbone [209], wie beispielsweise pX333 (siehe Tabelle 57), kann in 3 Schritte unterteilt werden – die Phosphorylierung und das Annealing der Oligonukleotide, der Verdau und die Ligation sowie die PlasmidSafe Reaktion, um ungewünschte Re-Ligationsprodukte zu vermeiden.

Im ersten Schritt wurden die Oligonukleotide (siehe Tabelle 56), die die sgRNA enthalten, wie in Tabelle 74 und Tabelle 75 dargestellt, gemischt und inkubiert:

**Tabelle 74: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Phosphorylierung und das Annealing der Oligonukleotide**

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen</b>
Oligonukleotid 1 (100 µM)	1 µl
Oligonukleotid 2 (100 µM)	1 µl
PNK Buffer	X ng
T4 PNK	0,5 µl
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	6,5 µl

**Tabelle 75: Temperaturprogramm für die Phosphorylierung und das Annealing der Oligonukleotide**

37 °C	30 min	
95 °C	5 min	5°C/ min auf 25 °C

Im nächsten Schritt erfolgte der Verdau des CRISPR-Backbones und die Ligation. Dafür wurden die zuvor annealten Oligonukleotide im Verhältnis 1:250 mit nuklease-freiem H<sub>2</sub>O verdünnt. Tabelle 76 und Tabelle 77 zeigen das Pipettierschema und das verwendete Temperaturprogramm:

**Tabelle 76: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für den Verdau des Backbones und die Ligation**

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen</b>
CRISPR Backbone	100 ng
1:250 verdünnte, annealte Oligonukleotide	2 µl
Tango Buffer	2 µl
FastDigest BbsI	1 µl
T7 DNA Ligase	0,5 µl
10 mM DTT	1 µl
10 mM ATP	1 µl
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	Auf ein Gesamtvolumen von 20 µl

**Tabelle 77: Temperaturprogramm für den Verdau und die Ligation**

Verdau	37 °C	5 min	Zyklus 1-6
Ligation	23 °C	5 min	Zyklus 1-6

Im letzten Schritt der Klonierung erfolgte dann die PlasmidSafe Reaktion. Tabelle 78 zeigt die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes, welcher für 30 min bei 37 °C inkubiert wurde.

**Tabelle 78: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die PlasmidSafe Reaktion**

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen</b>
Ligationsmix	11 µl
10x PlasmidSafe Puffer	1,5 µl
10 mM ATP	1,5 µl
PlasmidSafe™ ATP dependent DNase	1 µl

Abschließend wurde der Ligationsansatz nach der PlasmidSafe Reaktion in kompetente Bakterien transformiert. In das pX333-Backbone können zwei sgRNAs kloniert werden. Dafür wurde die erste sgRNA, wie in diesem Kapitel (3.4.3) beschrieben, über die BbsI-Schnittstelle eingefügt und kann nach der Plasmid-Isolierung (siehe 3.4.7) über den Primer 15128 (siehe Tabelle 55) mit der Sanger-Sequenzierung (siehe 3.4.10) überprüft

werden. Für die zweite sgRNA wird das Plasmid mit dem Restriktionsenzym Bsal linearisiert und über diese Schnittstelle konnte die sgRNA in das Plasmid kloniert werden. Um die erfolgreiche Integration der zweiten sgRNA ebenfalls über die Sanger-Sequenzierung zu überprüfen, wurde der Primer 15119 (siehe Tabelle 55) genutzt.

#### 3.4.4. Transformation in kompetente Bakterien

Nach der Ligation wurde der Ansatz in chemischkompetente Bakterien transformiert. Dafür wurden verschiedene Bakterienstämme verwendet:

**Tabelle 79: Bakterienstämme der verschiedenen Klonierungsstrategien**

<b>Verwendung</b>	<b>Bakterien</b>
pGEM- T <sup>®</sup> Easy	Selbst hergestellte DH5 $\alpha$
Gibson Assembly + Protein Produktion	Selbst hergestellte DH5 $\alpha$ , C2987H, C2527H
CRISPR	Selbst hergestellte DH5 $\alpha$

Der Ligationsansatz wurde im ersten Schritt kurz zentrifugiert und dann wurden davon 2  $\mu$ l mit den zuvor auf Eis aufgetauten Bakterien vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde auf Eis inkubiert, es folgte ein Hitzeschock und eine erneute Inkubation auf Eis. Die Inkubationszeiten für die verschiedenen Klonierungsstrategien sind in Tabelle 80 zusammengefasst. Nach der Zugabe von 950  $\mu$ l SOC-Medium wurden die Bakterien bei 37 °C unter Schütteln (250 rpm) weiter inkubiert.

**Tabelle 80: Inkubationszeiten der verschiedenen Klonierungsstrategien**

	<b>pGEM-T<sup>®</sup> Easy</b>	<b>Gibson Assembly</b>	<b>CRISPR</b>	<b>C2527H</b>
Auf Eis	20 min	30 min	30 min	30 min
42 °C	45 – 50 Sek.	30 Sek.	30 Sek.	10 Sek.
Auf Eis	2 min	2 min	5 min	5 min

Während diesem Inkubationsschritt wurden – im Fall der pGEM-T<sup>®</sup> Easy Vektor Klonierung – die vorgewärmten LB-Amp Platten noch mit X-Gal (20 mg/ml) beschichtet. Der Reaktionsansatz für den Mastermix ist in Tabelle 81 beschrieben. Pro Platte wurden 100  $\mu$ l verwendet. Das ermöglicht eine spätere Blau-weiß-Selektion der Kolonien. Typischerweise haben dabei die weißen Kolonien das Plasmid mit dem gewünschten Insert, wohingegen die blauen Kolonien nur den Plasmid-Backbone enthalten. Letzteres enthält unter anderem die enzymatisch-aktive beta-Galaktosidase, welche X-Gal spaltet und dadurch ein blaues Pigment entstehen lässt. Die erfolgreiche Ligation des Inserts

in die *lacZ*-Klonierungsstelle im Backbone bedingt einen Verlust der Enzymfunktion der  $\beta$ -Galaktosidase, weshalb X-Gal nicht modifiziert werden kann [210].

**Tabelle 81: Mastermix für die Beschichtung der LB-Amp-Platten**

<b>Bestandteile</b>	<b>Volumen</b>
LB Medium	480 $\mu$ l
Ampicillin	0,48 $\mu$ l
X-Gal	120 $\mu$ l

Nach dem letzten Inkubationsschritt bei 37 °C wurden dann die Bakterien auf den LB-Platten verteilt. Im Fall der pGEM- T<sup>®</sup> Easy Vektor Klonierung (siehe 3.4.1) wurden typischerweise 100 und 900  $\mu$ l Bakterien und bei den anderen Methoden (siehe 3.4.2, 3.4.3) wurden normalerweise 50, 150 und 800  $\mu$ l Bakterien ausplattiert. Die Platten wurden dann ÜN bei 37 °C weiter inkubiert.

#### 3.4.5. Kultivierung der Bakterien

Mithilfe der Blau-weiß-Selektion durch X-Gal konnten die Bakterien-Kolonien, welche den pGEM-T<sup>®</sup> Easy Vektor (siehe 3.4.1, Tabelle 57) mit dem gewünschten Insert aufgenommen haben, aufgrund deren weißer Farbe von den Bakterienkolonien, die kein Plasmid enthielten und damit eine blaue Farbe hatten, unterschieden werden [210]. Bei den anderen Klonierungsstrategien (siehe 3.4.2, 3.4.3) erfolgte die Auswahl der Kolonien zufällig. Normalerweise wurden zwei bis vier Kolonien gepickt und weiter kultiviert.

Die Bakterien wurden am Tag nach der Transformation in 5 ml LB-Medium und 5  $\mu$ l Amp (100 mg/ml) ÜN kultiviert. Bei größeren Kulturen wurde typischerweise tagsüber eine Vorkultur von 5 ml mit 5  $\mu$ l Amp angeimpft, die dann abends in eine 250 ml ÜN-Kultur (250 ml LB-Medium mit 250  $\mu$ l Amp) überführt wurde. Die Bakterien wurden immer bei 37 °C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert.

#### 3.4.6. Erstellen eines Glycerolstocks

Für die Langzeitlagerung der Bakterien wurde standardmäßig ein Glycerolstock erstellt. Dafür wurde 850  $\mu$ l der Bakterienkultur mit 150  $\mu$ l Glycerol durch Vortexen gemischt und anschließend bei -80 °C gelagert.

#### 3.4.7. Plasmid-Isolierung

Um das gewünschte Plasmid zu isolieren, wurde das PureYield<sup>™</sup> Plasmid MiniPrep System (siehe Tabelle 54) verwendet. Im ersten Schritt wurden die Bakterien vollständig pelletiert (30 Sek., max. Geschwindigkeit), dann in 600  $\mu$ l nuklease-freiem H<sub>2</sub>O

resuspendiert und mit 100 µl Cell Lysis Buffer durch 6-maliges Invertieren gemischt. Im Anschluss wurde 350 µl Neutralization Solution hinzugegeben, erneut durch Invertieren gemischt und zentrifugiert (3 min, max. Geschwindigkeit). Der Überstand wurde dann auf die PureYield™ Minicolumn gegeben (30 Sek., max. Geschwindigkeit), die dann mit 200 µl Endotoxin Removal Buffer (ERB) (30 Sek., max. Geschwindigkeit) und 400 µl Column Wash Solution (CWC) (30 Sek., max. Geschwindigkeit) gewaschen wurde. Im letzten Schritt wurde die Säule auf ein neues Eppendorf-Röhrchen gesetzt, 60 µl nuklease-freies H<sub>2</sub>O wurden auf die Säule gegeben und nach einer Inkubation von 1 min bei RT wurde das Plasmid eluiert (30 Sek., 12.000 g). Die Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

Wurde eine höhere Konzentration und größere Mengen an Plasmid benötigt, wurde das PureYield™ Plasmid MidiPrep System (siehe Tabelle 54) genutzt. Dafür wurde die Bakterienkultur ebenfalls im ersten Schritt pelletiert (10 min, 4.000 g) und in 6 ml Cell Resuspension Solution resuspendiert und in ein Greiner-Tube überführt. Dann wurde 6 ml Cell Lysis Solution hinzugegeben und durch 5-maliges Invertieren gemischt. Nach einer Inkubation von 3 min bei RT wurden 10 ml Neutralization Solution hinzugefügt, ebenfalls durch Invertieren gemischt und anschließend zentrifugiert (15 min, 12.000 g). Währenddessen wurde die blaue PureYield™ Clearing Column in die weiße PureYield™ Binding Column gesteckt, auf die dann das Lysat gegeben wurde. Nachdem dieses die beide Säulen vollständig mithilfe des angelegten Vakuums passierte, wurde die PureYield™ Clearing Column entfernt und die Säule erst mit 5 ml Endotoxin Removal Wash und dann mit 20 ml Column Wash Solution gewaschen. Im Anschluss wurde die Säule für 60 Sek. getrocknet und auch nochmals auf einem Papierhandtuch abgetupft, um das Ethanol der Wash Solution zu entfernen. Im letzten Schritt wurde ein Eppendorf-Röhrchen und die Säule in den Eluator™ Vacuum Elution Device nach Herstellerangaben eingespannt, 500 µl nuklease-freies H<sub>2</sub>O wurden auf die Säule gegeben und nach einer Inkubation von 5 min bei RT erfolgte die Elution ebenfalls über das angelegte Vakuum. Die Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

#### 3.4.8. Konzentrieren der DNA

Sollte die Isolierung des Plasmids mit dem PureYield™ Plasmid MidiPrep System (siehe 3.4.7) keine ausreichende Konzentration erzielt haben, wurde die DNA erneut mit Natrium Acetat gefällt und in einem geringeren Volumen gelöst. Dafür wurde zuerst 100 % Ethanol im Verhältnis 1:1 zu der DNA hinzugefügt und dann wurde im Verhältnis 1:10, basierend auf dem neuen Gesamtvolumen, noch Natrium Acetat (0,24 g/ml) hinzugegeben. Die Probe wurde durch Vortexen gemischt und anschließend zentrifugiert (10

min, 10.000 g, 4 °C). Der Überstand wurde abgekippt und das Pellet wurde mit 500 µl 75 % Ethanol gewaschen (10 min, 10.000 g, 4 °C). Der Überstand wurde erneut vollständig verworfen und das Pellet wurde für 20 min bei RT getrocknet. Anschließend wurde dieses in 50 °C vorgewärmten PBS resuspendiert, um eine finale Konzentration von 1000 ng/µl zu erreichen. Dabei wurde ebenfalls ein Verlust von 25 % mitberücksichtigt. Sollte sich das Pellet nicht lösen, konnte es noch für 10 min bei 50 °C inkubiert werden. Die Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

#### 3.4.9. Restriktionsverdau

Nach der Plasmid-Isolierung (siehe 3.4.7) wurde typischerweise ein Restriktionsverdau mit einem Gesamtvolumen von 25 µl angesetzt, um zu überprüfen, ob das Plasmid das gewünschte Insert enthält. Ein 50 µl-Ansatz wurde verwendet, um einen Plasmid-Backbone oder ein Insert zu isolieren. In beiden Fällen wurde der Ansatz wurde bei 37 °C inkubiert. Tabelle 82 fasst die Reaktionszusammensetzung, sowie die Inkubationsdauer zusammen.

**Tabelle 82: Reaktionszusammensetzung für einen Restriktionsverdau**

	<b>25 µl Ansatz</b>	<b>50 µl Ansatz</b>
Restriktionsenzym-spezifischer Puffer (10x)	2,5 µl	5 µl
Restriktionsenzym	je 10 Units	je 20 Units
Plasmid	500 ng	1000 ng
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	Auf ein Gesamtvolumen von 25 µl	Auf ein Gesamtvolumen von 50 µl
Inkubationsdauer	1 h	4 h oder ÜN

#### 3.4.10. Sanger-Sequenzierung

Um die erfolgreiche Klonierung zu überprüfen oder das PCR-Produkt zu analysieren, wurde im letzten Schritt die DNA zum Sanger-Sequenzieren geschickt. Dafür wurde das Mix2Seq ON Kit oder der TubeSeq Service von Eurofins verwendet. Bei Letzterem wurden Standard-Primer für die Analyse verwendet. Ansonsten wurde der entsprechende Primer mit der DNA und Wasser in einem Gefäß gemäß Herstellerangaben (siehe Tabelle 54) gemischt. Die verwendeten Volumina sind in Tabelle 83 zusammengefasst. Die Analyse erfolgte am nächsten Tag über Benchling (siehe Tabelle 59).



**Tabelle 83: Reaktionsansatz für die Sanger-Sequenzierung mit dem Mix2Seq ON Kit**

	<b>DNA</b>	<b>Primer</b> <b>[10 pmol/μl]</b>	<b>Nuclease-freies H<sub>2</sub>O</b>
Nicht aufgereinigtes PCR-Produkt	0,5 μl	2 μl	17,5 μl
Aufgereinigtes PCR-Produkt	5 – 10 ng/μl*	2 μl	Auf ein Gesamt-Volumen von 17 μl
Plasmid	50 – 100 ng/μl	2 μl	Auf ein Gesamt-Volumen von 17 μl

(\* benötigte DNA-Konzentration ist abhängig von der Länge des zu sequenzierenden Fragments)

### 3.5. *In vitro* Influenza-A-Virus-Infektionen

#### 3.5.1. Erstellen von Virenstämmen mit ungespaltenem HA0

Typischerweise werden Virusstocks in Hühnereiern produziert [211]. Aufgrund der Proteasen im Ei lassen sich dabei aber nur Virenstocks mit bereits gespaltenem HA herstellen.

Da der Fokus in dieser Arbeit auf den Serinproteasen, besonders auf TMPRSS2, lag, welche die Influenza-A-Virus-Infektion durch die posttranslationale Spaltung des HA0 ermöglichen [28], war die Herstellung von Virenstocks mit ungespaltenem HA0 von größter Bedeutung. Diese Virenstocks konnten in MDCK-Zellen produziert werden [28].

Dafür wurden am ersten Tag 500.000 Zellen in einer T25-Zellkulturflasche ausgesät, welche dann am zweiten Tag mit einem Influenza-A-Virus-Stamm mit gespaltenem HA (siehe Tabelle 6) (MOI = 0,1) in 1% BSA-PBS infiziert wurden. Dafür wurden die Zellen zuerst mit PBS gewaschen und anschließend für 1 h bei 37 °C mit 1 ml der Virus-Verdünnung in 1% BSA-PBS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3x mit warmem PBS gewaschen und anschließend weiter inkubiert. 24 hpi wurde der Überstand in ein 15 ml Falcon überführt und zentrifugiert (5 min, 240 g, 4 °C). Dann wurde der Überstand aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Um den Titer des hergestellten Stocks zu bestimmen, wurden diese auf MDCK-Zellen (siehe 3.5.3) zurücktitriert.

#### 3.5.2. Lösen und Verdünnen der Inhibitoren Aprotinin und Camostatmesilat

Aprotinin [149] und Camostatmesilat [22] sind Serinprotease-Inhibitoren, welche in dieser Arbeit für die TOC-Experimente verwendet wurden.

Der Inhibitor Aprotinin wurde in nuklease-freiem Wasser gelöst und die Stock-Lösung von 500 μM wurde bei 4 °C gelagert. Der Inhibitor Camostatmesilat wurde in DMSO

gelöst. Hierbei wurde ein Stock von 20 mM hergestellt. Dabei wurden die Aliquots bei -20 °C gelagert und nach dem Auftauen wurden die Reste verworfen [22].

### 3.5.3. Bestimmung des Virus-Titers durch die Titration auf MDCK-Zellen

#### 3.5.3.1. Titration des Virus und Infektion der MDCK-Zellen

Um den Titer der verwendeten Virenstocks (siehe Tabelle 6) oder den der gesammelten Überständen (siehe 3.6.2) zu bestimmen, wurden die Proben auf MDCK-Zellen rücktitiert und anschließend mit einem mouse-anti-Influenza A Nukleoprotein-Antikörper (siehe Tabelle 53) und dem sekundären Antikörper Alexa Fluor™ 568 goat-anti-mouse Antikörper (siehe Tabelle 53) gefärbt.

Dafür wurden 24 h vor der Infektion die MDCK-Zellen in einer 96-Well-Platte ausgesät. Typischerweise wurden dafür 3 ml Zellen, welche konfluent in einer T75 Flasche wuchsen, mit 18 ml Medium gemischt und 150 µl pro Well wurden in einer 96-Well-Platte ausgesät.

Am Tag der Infektion wurde im ersten Schritt die Virusverdünnung in 0,2 % BSA-PBS in einer separaten 96-Well-Platte hergestellt: dafür wurde 20 µl Virus mit 180 µl 0,2 % BSA-PBS in der ersten Reihe gemischt und im Anschluss wurde die serielle log<sub>10</sub> Verdünnungsreihe bis zu einer Verdünnungsstufe von 10<sup>-8</sup> erstellt. Die 20 µl der letzten Reihe wurden jeweils verworfen.

Die MDCKs wurden 1x mit PBS gewaschen und anschließend in je 50 µl Virusverdünnung für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die MDCKs erneut 3x mit PBS gewaschen und schließlich für 11 h bei 37 °C in 150 µl MDCK-Medium inkubiert.

12 hpi wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden mit je 100 µl eiskaltem 4 % PFA in PBS für 10 min auf Eis fixiert.

#### 3.5.3.2. Immunfluoreszenz-Färbung der Zellen

Nach der Fixierung der MDCK-Zellen wurden diese 2x mit PBS gewaschen und dann mit 50 µl 0,5 % Triton-X 100 in PBS für 10 min bei RT permeabilisiert. Die Zellen wurden erneut 3x mit PBS gewaschen und schließlich in je 50 µl primären mouse-anti-Influenza A Nukleoprotein-Antikörper (siehe Tabelle 53) in 1 % BSA-PBS für 1 h bei RT inkubiert. Die MDCKs wurden dann 3x in 1 % BSA-PBS gewaschen und mit je 50 µl des sekundären Antikörper Alexa Fluor™ 568 goat-anti-mouse Antikörper (siehe Tabelle 53) in 1 % BSA-PBS für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden im letzten Schritt 3x

mit PBS gewaschen, in 150 µl PBS gelagert und anschließend unter dem Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet. Der Titer wurde mit der untenstehenden Formel bestimmt.

$$FFU \text{ pro ml} = \text{Anzahl der gezählten Zellen} * \text{Virusverdünnung} * 20$$

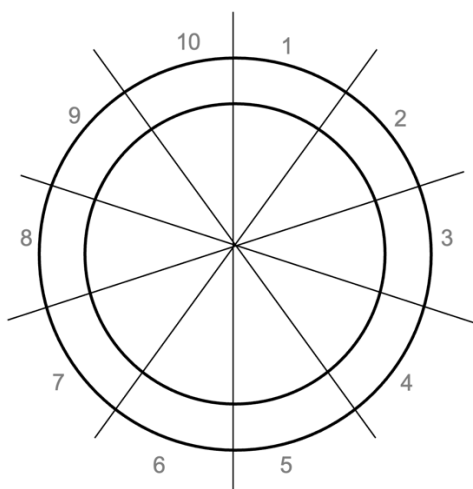
### 3.6. Trachealorgankulturen (TOCs)

#### 3.6.1. Isolierung der Trachealorgankulturen

Für die Präparation der TOCs wurden LSL-Eier bis ED20 inkubiert. Nachdem der Embryo durch Dekapitation getötet und die Trachea isoliert wurde, wurde diese in ein 50 ml Falcon mit TOC-Medium (siehe Tabelle 16) überführt und gevortext. Anschließend wurde das Bindegewebe und die Muskeln an der Trachea entfernt und diese wurde unter dem Mikroskop in etwa 0,8 mm dünne Ringe mit einer Mikrotom-Klinge geschnitten. Die TOCs wurden dann in ein FACS-Röhrchen, welches 800 µl TOC-Medium enthält, überführt und unter Schütteln bei 37 °C inkubiert.

#### 3.6.2. TOCs: Influenza-A-Virus-Infektion

Am vierten Tag nach der TOC-Präparation wurden die TOCs mit niedrigpathogenen aviären Influenza-Viren infiziert. Dafür wurden die Proben im ersten Schritt unter dem Mikroskop auf eine Zilienaktivität von 100 % überprüft. Die Trachealring-Kultur wurde dabei unter dem Mikroskop in zehn gleiche Bereiche unterteilt und für jeden dieser Teile wurde der Anteil der motilen Zilien bestimmt. Um die Zilienaktivität des TOCs zu bestimmen, wurde die Aktivität der zehn Bereiche summiert. Die TOCs, welche keine Zilienaktivität von 100 % aufwiesen, wurden aussortiert.



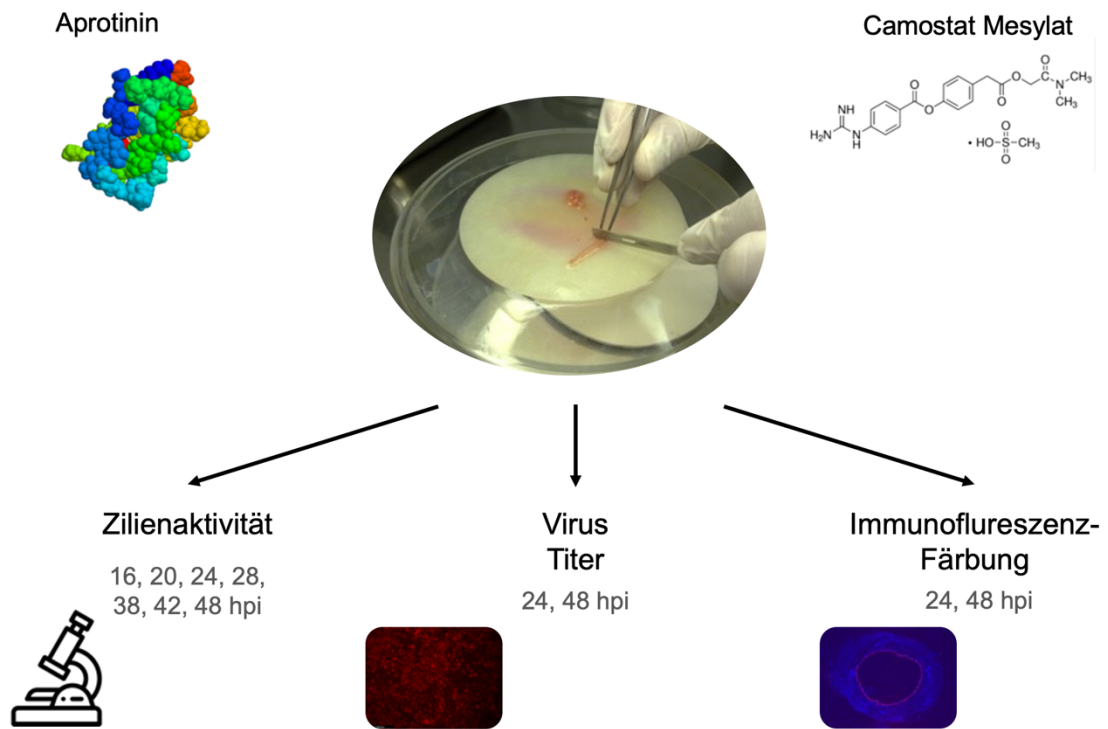
#### **Abbildung 16: Schematische Darstellung zur Bestimmung der Zilienaktivität**

Das TOC wurde unter dem Mikroskop in 10 gleich große Teile unterteilt, sodass im nächsten Schritt für jeden dieser Bereiche der Anteil der motilen Zilien bestimmt werden konnte. Abschließend wurden die einzelnen Werte summiert, sodass die gesamte Zilienaktivität der TOC-Probe bestimmt werden konnte.

Anschließend wurden neue FACS-Röhrchen mit TOC-Medium (+ 5  $\mu$ M Inhibitor/ + je 2,5  $\mu$ M Aprotinin und Camostatmesilat) vorbereitet, die TOCs wurden gevortext und in die neuen Röhrchen überführt. Nach einer Inkubation von 2 h unter Schütteln wurden die TOCs in eine 48-Well-Platte überführt, welche je 200  $\mu$ l TOC-Medium mit 1 % BSA und 100 FFU/TOC (für H9N2 und H6N8: 100 FFU/Probe) enthielten. Nach einer Inkubation von 1 h bei RT wurden die TOCs 3x mit PBS gewaschen, anschließend wieder in die FACS-Röhrchen mit dem konditionierten Medium überführt und weiter inkubiert.

Die Zilienaktivität wurde nach 16, 20, 24, 28, 38, 42 und 48 hpi in einer Doppelblindstudie kontrolliert (siehe Abbildung 16). Außerdem wurde nach 24 und 48 hpi je 50  $\mu$ l Überstand für die Rücktitration auf MDCK-Zellen zur Bestimmung des Virustiters (siehe 3.5.3) gesammelt. Die Aufhebung der Verblindung erfolgte nach der Bestimmung des Virustiters. Des Weiteren wurden die Proben in O.C.T. 24 und 48 hpi weggefroren, um anschließend Immunfluoreszenz-Färbungen durchführen zu können (siehe 3.7.1).

Für H1N1 wurden ausschließlich unbehandelte TOCs mit einem Titer von  $10^4$  FFU/Probe infiziert. Die Probennahme erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie bei H9N2 und H6N8. Abbildung 17 fasst den Experimentaufbau und die Probennahme zusammen:



**Abbildung 17: TOCs – Übersicht der Experimentaufbaus und der Probennahme**

Die TOCs wurden mit dem Inhibitor Aprotinin (5  $\mu\text{M}$ ), mit Camostatmesilat (5  $\mu\text{M}$ ) oder mit beiden Inhibitoren (je 2,5  $\mu\text{M}$ ) behandelt und 2 h später mit 100 FFU/TOC H9N2 oder H6N8 infiziert. Für H1N1 wurden die unbehandelten Proben mit einem Titer von  $10^4$  FFU/TOC infiziert. Die Zilienaktivität wurde 16, 20, 24, 28, 38, 42 und 48 hpi kontrolliert, die Virusüberstände 24 und 48 hpi wurden auf MDCK-Zellen rücktitriert und zu den gleichen Zeitpunkten wurden die Proben mithilfe einer Immunfluoreszenz-Färbung analysiert.

### 3.7. Histologie und Immunfluoreszenz-Färbung

In dieser Doktorarbeit wurden alle Gewebe in O.C.T. fixiert. Die TOCs wurden zuerst auf Trockeneis eingefroren und dann nochmals in den Stickstoff überführt. Die anderen Organe wurden ausschließlich im Stickstoff eingefroren. Anschließend wurden alle Organe bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Die Gewebeschnitte wurden an einem Kryotom bei einer Schnittdicke von 5  $\mu\text{m}$  (TOCs) und 7  $\mu\text{m}$  (andere Organe) angefertigt.

#### 3.7.1. TOCs: Immunfluoreszenzfärbung

Im ersten Schritt der Färbung wurden die Schnitte in eiskaltem Aceton für 10 min fixiert, welches dann abgekippt wurde. Nachdem das Aceton evaporiert war, während die Proben ca. 20 min bei RT gelagert wurden, wurden die Schnitte 3x für je 5 min in PBS gewaschen. Anschließend wurden diese in PBS/Glycin (siehe Tabelle 36) für 5 min inkubiert. Die Schnitte wurden kurz 2x mit PBS und 1x mit Leitungswasser gewaschen, sodass daraufhin die Zellen mit 0,2 % Triton<sup>TM</sup> X-100 in PBS für 10 min permeabilisiert werden konnten.

Dann wurde im nächsten Schritt je 500 µl des primären mouse-anti-Influenza A Nukleoprotein-Antikörpers in 3 % BSA-PBS (siehe Tabelle 53) direkt auf das Gewebe gegeben und für 1 h bei RT in der Feuchtkammer inkubiert. Daraufhin wurden die Schnitte erneut 2x kurz mit PBS und 1x mit Leitungswasser gewaschen und der sekundäre Alexa-Fluor™ 568 goat-anti-mouse Antikörper in 3 % BSA-PBS (siehe Tabelle 53) wurde auf die Proben gegeben. Nach einer erneuten Inkubation von 1 h bei RT in der Feuchtkammer wurden die Proben wieder kurz 2x mit PBS und 1x mit Leitungswasser gewaschen.

Im letzten Schritt erfolgte dann das Eindeckeln, für das das VECTASHIELD® Vibrance™ Antifade Mounting Medium mit DAPI verwendet wurde. Mit DAPI wurden die Zellkerne gefärbt- Die Schnitte wurden dann ÜN unter dem Abzug getrocknet und Bilder wurden aufgenommen.

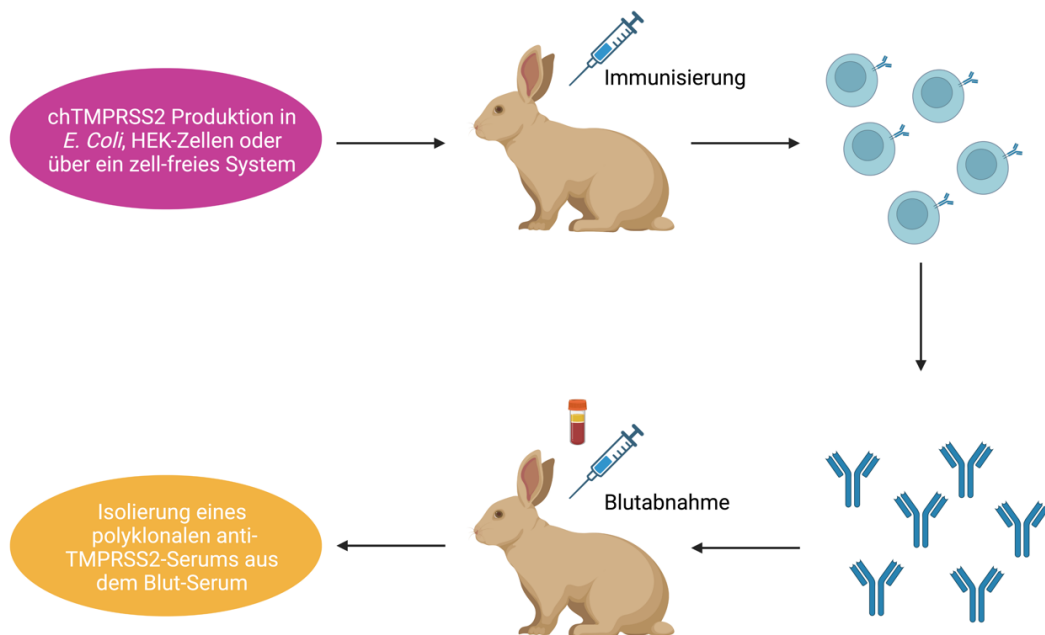
### 3.7.2. Organe: TMPRSS2

Die Gewebeschnitte wurden in eiskaltem Aceton für 2 min fixiert, anschließend für 10 min bei RT getrocknet und dann für 15 min in PBS rehydriert. Anschließend folgte das Blockieren mit Serum. Dabei wurde eine 1:40 Verdünnung in 1 % BSA-PBS mit dem Serum der Tierart des Sekundär-Antikörpers erstellt und die Schnitte wurden in 250 µl für 1 h bei RT in der Feuchtkammer inkubiert.

Anschließend wurde die goat-anti-hTMPRSS2-Antikörper-Verdünnung (siehe Tabelle 53) in PBS hergestellt, die Blockier-Lösung wurde vorsichtig abgekippt und dann wurden die Schnitte mit 250 µl des goat-anti-hTMPRSS2-Antikörpers für 1 h bei RT in der Feuchtkammer inkubiert. Die Schnitte wurden 3x für 5 min in PBS gewaschen und schließlich folgte die Inkubation des sekundären mouse-anti-goat CFL 594 Antikörpers in PBS (siehe Tabelle 53) für 1 h bei RT in der Feuchtkammer. Die Schnitte wurden 3x für 5 min mit PBS gewaschen, mit dem VECTASHIELD® Vibrance™ Antifade Mounting Medium mit DAPI bedeckt und mit einem Deckglas eingedeckelt.

### 3.8. Produktion eines polyklonalen Serums in Kaninchen

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte ein polyklonales Serum in Kaninchen hergestellt werden. Der erste Schritt dabei ist die *in vitro*-Proteinproduktion. Nach einer erfolgreichen Aufreinigung des Antigens, folgt die Immunisierung des Kaninchens zur Herstellung des polyklonalen Antiserums (siehe Abbildung 18) [212]. Die B-Zellen werden stimuliert und die unterschiedlichen Klone produzieren Antikörper, die das polyklonale Serum bilden [213]. Nach jeder Immunisierung wird dem Tier Blut abgenommen, um final das Serum zu gewinnen.



**Abbildung 18: Immunisierung eines Kaninchens zur Herstellung eines polyklonalen anti-chTMPRSS2-Serums**

Im ersten Schritt bei der Herstellung eines polyklonalen anti-chTMPRSS2-Serums erfolgt die Produktion des Antigens (chTMPRSS2) zum Beispiel in *E. Coli*, in HEK-Zellen oder mit einem zellfreien System. Anschließend folgt die Immunisierung des Kaninchens, sodass die B-Zellen zur Antikörper-Produktion angeregt werden. Nach jeder Immunisierung wird dem Kaninchen Blut abgenommen, sodass das polyklonale Serum aus dem Blutserum isoliert werden kann. Die Abbildung wurde mit BioRender, basierend auf den Informationen von [212, 213] erstellt.

### 3.8.1. Proteinproduktion in *E. Coli BL21(DE3)*

Für das Testen der unterschiedlichen Reaktionsbedingungen (siehe Tabelle 91) wurde das Protein standardmäßig im ersten Schritt aus einer 0,5 L *E. Coli BL21(DE3)* Kultur aufgereinigt und zuerst in einem Western Blot getestet (siehe 3.9.2). Nachdem chTMPRSS2 in den Eluaten so über den His-Tag nachgewiesen werden konnte, wurde eine 4 L oder 8 L-Kultur aufgereinigt. Diese Proben wurden dann im SDS-Gel mit einer Coomassie-Brilliant Blue R-250-Färbung (siehe 3.9.3) analysiert.

Für die Proteinproduktion in *E. Coli BL21(DE3)* wurde eine ÜN-Kultur angeimpft, welche dann am nächsten Morgen in die Hauptkultur überführt wurde. Dabei wurde je 12,5 ml Vorkultur pro 500 ml Hauptkultur verwendet. Die Optische Dichte  $OD_{600}$  wurde in 30-minütigen Abständen in einem Spektrometer gemessen. Dafür wurde je 1 ml der Kultur verwendet. Bei einer  $OD_{600} = 0,5$  wurde die Proteinexpression durch die Zugabe des

Zuckers IPGT (siehe Tabelle 34, finale Konzentration: 1 mM) induziert. Es folgte eine Inkubation für 4 h bei 37 °C unter Schütteln (250 rpm).

Anschließend wurde die Kultur pelletiert (30 min, 4000 g, 4 °C) und in Ultraschallpuffer (siehe Tabelle 40) resuspendiert. Nach dem Ultraschallaufschluss (7x 30 Sek., 30 Sek. Pause dazwischen, 70 % Power) auf Eis wurden die Bakterien erneut zentrifugiert (25 min, 12000 g, 4 °C).

Währenddessen wurde die Ni-NTA Agarose Matrix equilibriert – dafür wurde diese erst mit ddH<sub>2</sub>O (3 min, 1670 g, 4 °C), dann mit Elutionspuffer (siehe Tabelle 40, Tabelle 91) (3 min, 1670 g, 4 °C) und schließlich mit Equilibrierungspuffer (siehe Tabelle 40) (3 min, 1670 g, 4 °C) gewaschen. Anschließend wurde das Lysat zur Matrix gegeben und ÜN bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Es wurde je 1 ml Ni-NTA Matrix pro L Bakterienkultur genutzt.

### 3.8.2. Proteinaufreinigung

Am nächsten Tag wurde die Lysat-Matrix-Mischung auf die Säule gegeben, eine 30 µl-Probe des Durchflusses gesammelt und mit je 15 ml Washing Buffer 1 (siehe Tabelle 40, Tabelle 91) und Washing Buffer 2 (siehe Tabelle 40, Tabelle 91) gewaschen. Auch bei diesen beiden Schritten wurden 30 µl-Proben für die anschließende Analyse gesammelt. Im letzten Schritt wurden dann zehn Fraktionen in je 250 µl Elutionspuffer (siehe Tabelle 40, Tabelle 91) eluiert. Anschließend folgte die Analyse der Proben im Western Blot oder über eine SDS-PAGE (siehe 3.9).

Das Säulenmaterial wurde 1x wiederverwendet. Für die Regenerierung der Säule wurde diese mit 5 ml Elutionspuffer, 5 ml Puffer F (siehe Tabelle 41), 10 ml ddH<sub>2</sub>O und 5 ml Column Storage Buffer (siehe Tabelle 42) gewaschen. Die Lagerung erfolgte dann in dem Column Storage Buffer bei 4 °C.

## 3.9. Proteinanalyse

### 3.9.1. SDS PAGE

Die Protein-Proben wurden im ersten Schritt der Analyse auf ein SDS-Gel geladen, welches dann entweder mit Coomassie-Brilliant Blue R-250 gefärbt wurde oder im nächsten Schritt auf eine Nitrozellulosemembran übertragen wurde. Tabelle 84 zeigt die Zusammensetzung des SDS-Gels, welches aus einem Trenn- und einem Sammelgel besteht.



**Tabelle 84: Zusammensetzung des SDS-Gels**

	<b>Trenngel (10 %)</b>	<b>Sammelgel (4 %)</b>
ddH <sub>2</sub> O	4,16 ml	3,05 ml
4x Tris-Cl/SDS, pH 8,8	2,5 ml	-
4x Tris-Cl/SDS, pH 6,8	-	1,25 ml
30 % Acrylamid	3,33 ml	0,65 ml
10 % APS*	50 µl	25 µl
99 % TEMED	10 µl	7,5 µl

\* Stock-Lösung in Tabelle 48 zusammengefasst

Alle Komponenten des Trenngels wurden in einem 15 ml Falcon gemischt und nach dem Hinzufügen des Acrylamids wurde die Flüssigkeit in die Gelkassette pipettiert. Um ein Austrocknen zu vermeiden, wurde diese mit dH<sub>2</sub>O während des Polymerisierens beschichtet. Nach ca. 30 min wurde das Wasser vorsichtig abgekippt und die Komponenten des Sammelgels wurden ebenfalls gemischt und auf das Trenngel gegeben. Im letzten Schritt wurde der Kamm in das Gel gesteckt. Nach ca. 30 min war auch dieser Gel-Teil polymerisiert und konnte verwendet werden.

Die Proteinproben wurden währenddessen in 1x Laemmli (siehe Tabelle 43) und DTT für 5 min bei 95 °C, wie in Tabelle 85 zusammengefasst, aufgekocht.

**Tabelle 85: Reaktionsansatz der Proteinproben in 1x Laemmli**

	<b>1x Laemmli</b>	<b>1 M DTT</b>
30 µl Protein Probe	60 µl	4,5 µl
10 µl Protein Probe	20 µl	1,5 µl

Anschließend wurde erneut die Menge an DTT hinzugefügt, welche auch im ersten Schritt entsprechend des Probenvolumens (siehe Tabelle 85) verwendet wurde, und die Proben wurden zusammen mit dem entsprechenden Marker, welche in der untenstehenden Tabelle 86 zusammengefasst sind, auf das Gel geladen. Die Gelelektrophorese wurde bei 80 V für 10 min und bei 200 V für ca. 40 min durchgeführt.

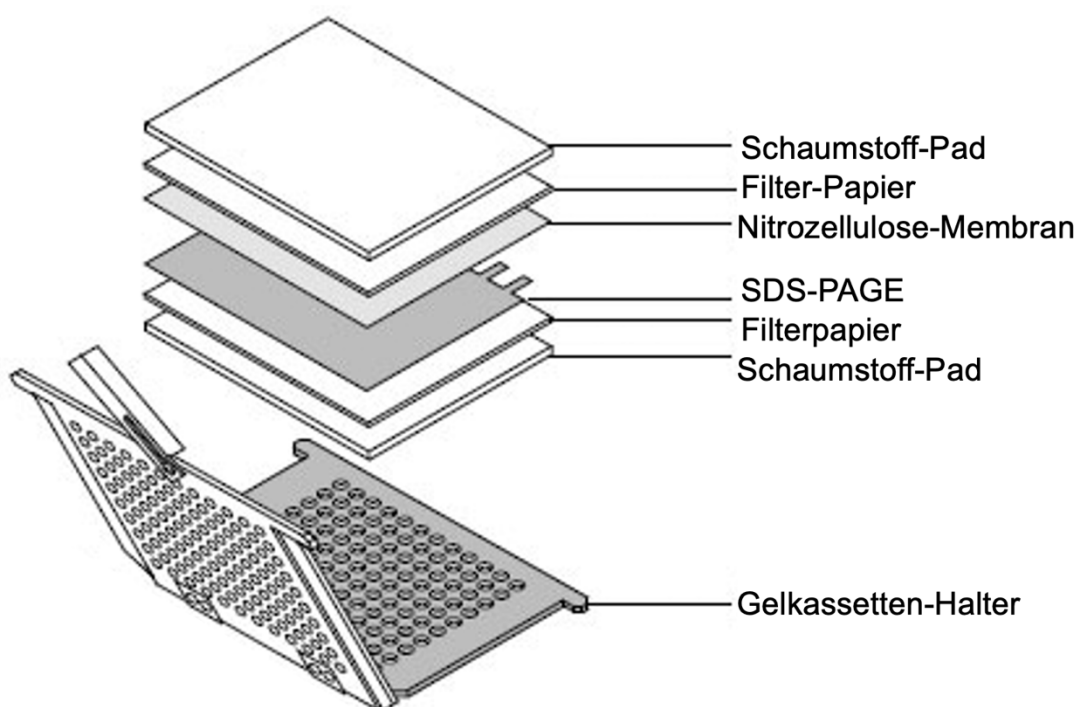
**Tabelle 86: Proteinmarker**

Coomassie-Brilliant Blue R-250	Thermo Scientific PageRuler™ Broad Range Unstained Protein Ladder	10 µl
Western Blot	Thermo Scientific PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Je 5 µl
	Invitrogen MagicMark™ XP Western Standard	

### 3.9.2. Western Blot

Für den spezifischen Nachweis des Proteins in einem Protein-Gemisch erfolgte die Analyse mit einem Western Blot über spezifische Antikörper [214, 215].

Dafür wurde das Sammelgel vom Trenngel gelöst und die Proteine aus dem Trenngel wurde auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (siehe Abbildung 19). Dafür wurde der Towbin Buffer (siehe Tabelle 45) genutzt. Dabei waren Gel und Membran noch jeweils zwischen einem Filterpapier in der Blotting-Kassette. Das Blotten benötigte 1h bei 100 V.



**Abbildung 19: Schematischer Aufbau der SDS-PAGE und der Nitrozellulose-Membran in der Gelkassette beim Tank-Blotting**

Im Gelkassetten-Halter befinden sich ein Schaumstoff-Pad, ein Filterpapier, die SDS PAGE, die Nitrozellulose-Membran, ein Filterpapier und ein Schaumstoff-Pad. Dabei ist die SDS-PAGE auf der Seite der Kathode und die Nitrozellulose-Membran auf der Seite der Anode angeordnet (modifiziert von [216]).

Währenddessen wurde die 4 % Magermilchlösung in PBS angesetzt. Nach erfolgreichem Blotten wurde die Nitrozellulose-Membran, auf der nun der Thermo Scientific PageRuler™ Prestained Protein Ladder zu sehen ist, in ein 50 ml Falcon mit 3 ml 4 % Magermilchlösung und dem direkt konjugierten His-Antikörper-HRP (siehe Tabelle 53) überführt und bei 4 °C ÜN auf einem Schüttler inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Nitrozellulosemembran 6x für 10 min mit PBS-T gewaschen. Zur Detektion der Antikörper über den HRP-Tag wurde die Nitrozellulosemembran mit 4 ml ECL A Lösung (siehe Tabelle 46), 400 µl der ECL B

Lösung (siehe Tabelle 47) und 1,2 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 1 min inkubiert und anschließend mit dem Fusion FX detektiert. Dabei wurde die Entwickler-Lösung direkt vor der Detektion frisch hergestellt.

### 3.9.3. Coomassie-Brilliant Blue R-250-Färbung

Die SDS-PAGE wurde standardmäßig mit Coomassie-Brilliant Blue R-250 gefärbt, sobald die erfolgreiche Proteinexpression im Western Blot nachgewiesen werden konnte. Dadurch konnte die Effizienz der Proteinaufreinigung näher analysiert werden, da die Dicke der Bande auf dem Coomassie-Gel es auch erlaubte, Aussagen über die Proteinmenge zu treffen. Außerdem konnte dadurch auf die Reinheit der Proben abgeschätzt werden, da die unspezifischen, endogenen Proteine der *E. Coli BL21(DE3)* ebenfalls gefärbt wurden.

Nach der Gelelektrophorese wurde das Sammelgel vorsichtig entfernt und das Trenngel wurde für 30 min in 20 ml Coomassie-Brilliant Blue R-250 (siehe Tabelle 49) unter leichtem Schütteln inkubiert. Das Entfärben des Gels mit der Entfärbelösung (siehe Tabelle 50) erfolgte dann ÜN. Am nächsten Tag wurde dann das Gel mit dem Quantum ST5 mit Weißlicht fotografiert.

### 3.9.4. Massenspektroskopische Analyse

Die massenspektroskopische Analyse wurde von dem Bayerischem Zentrum für Biomolekulare Massenspektrometrie (BayBioMS Zentrum) in Freising übernommen. Dafür wurden 50 µl der zu analysierenden Probe auf ein SDS-Gel (siehe 3.9.1) geladen und mit einer Coomassie-Brilliant Blue R-250-Färbung gefärbt (siehe 3.9.3). Die Banden, welche analysiert werden sollten, wurden aus dem Coomassie-Brilliant Blue R-250-gefärbtem SDS-Gel mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten, dann von der Core-Facility, dem BayBioMS, in einem in-Gel Verdau weiterverarbeitet und im Massenspektrometer (MS) gemessen. Die Analyse wurde ebenfalls von dem BayBioMS Zentrum durchgeführt.

### 3.10. Bioinformatische Analyse

Für die statistische Auswertung der Daten wurde SPSS (siehe Tabelle 59) verwendet. Dafür wurden die Daten zu Beginn mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung untersucht. Bei einem  $p$ -Wert  $> 0,05$  waren die Daten normalverteilt und es folgte ein Student-t-Test. Bei nicht normalverteilten Daten ( $p$ -Wert  $< 0,05$ ) folgte ein Mann-Whitney-U-Test, wenn zwei Gruppen miteinander verglichen werden sollte. Für den Fall, dass mehrere Gruppen mit nicht-normalverteilten Daten statistisch untersucht werden sollte,

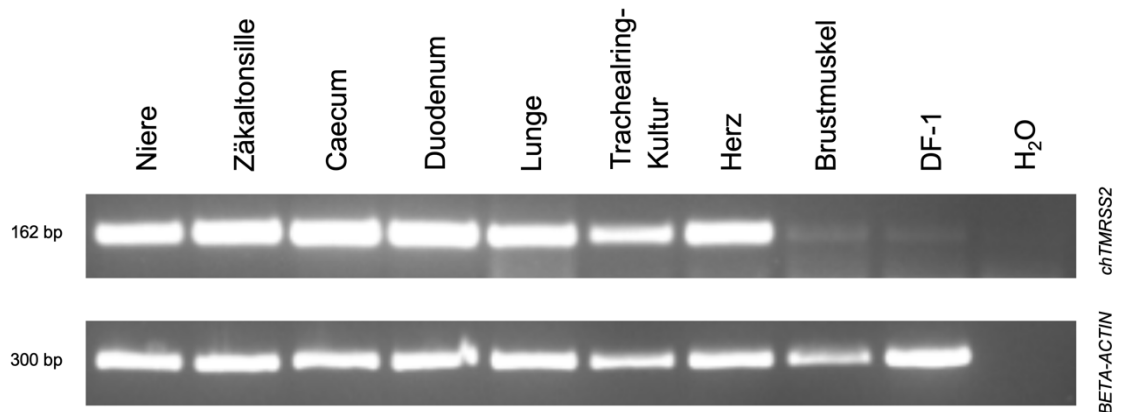
wurde ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. War die Mehrheit der Daten nicht-normalverteilt und nur einzelne Gruppen normalverteilt, wurden alle Datensätze als nicht-normalverteilt behandelt. Das Signifikanz-Niveau lag bei 0,05, folglich wurde bei einem  $p$ -Wert  $\leq 0,05$  von einem signifikanten Unterschied gesprochen. Die Daten wurden dann mithilfe von GraphPad (Prism 9) (siehe Tabelle 59) visualisiert.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Ubiquitäre Expression von *chTMPRSS2* in Organen und in DF-1 Zellen

Für die Bestimmung der unterschiedlichen Expressionslevel des *chTMPRSS2* in Duodenum, Zäkaltonsille, Niere, Caecum, Lunge, Brustmuskel und Herz wurden die Organe repräsentativ von einem männlichen WT-Tier 14 Tage nach dem Schlupf analysiert. Die Trachealing-Kultur wurde aus einem WT-Embryo an ED20 präpariert (siehe 3.6.1) und die Probe für die DF-1 Zellen wurde aus der täglichen Zellkultur gewonnen (siehe 3.1.3). Die RNA wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben (siehe 3.3.2, 3.3.3), sodass die Proben im Anschluss in der RT-PCR (siehe 3.3.4.5) getestet werden konnten.

Mithilfe der RT-PCR konnte die *chTMPRSS2* Expression in Niere, Zäkaltonsille, Caecum, Duodenum, Lunge, Trachealing-Kultur, Herz, Brustmuskel und in DF-1 Zellen durch die Bande bei 162 bp nachgewiesen werden. Dabei war das Expressionslevel von *chTMPRSS2* im Brustmuskel und in den DF-1 Zellen niedriger im Vergleich zu den anderen Organen. Als Housekeeping-Gen diente *BETA-ACTIN* mit einer Amplikonlänge von 300 bp (siehe Abbildung 20).



**Abbildung 20: Ubiquitäre Expression des *chTMPRSS2* in allen untersuchten Organen und DF-1 Zellen**

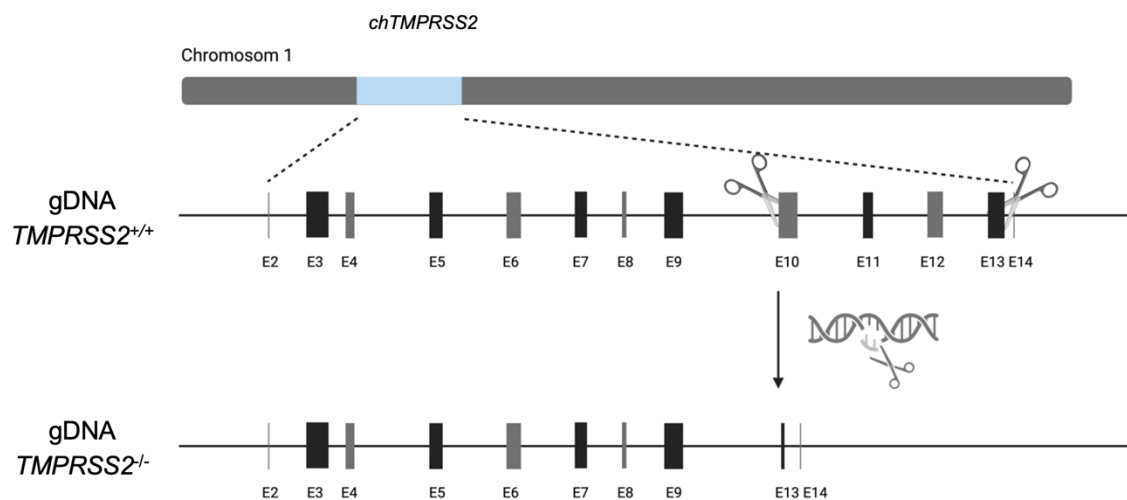
Die *chTMPRSS2*-Expression in Niere, Zäkaltonsille, Caecum, Duodenum, Lunge, TOC, Herz, Brustmuskel und in DF-1 Zellen wurde mittels RT-PCR analysiert. Als Housekeeping-Gen wurde *BETA-ACTIN* genutzt. Die Organe wurden von einem männlichen Tier 14 Tage nach dem Schlupf isoliert, die Trachealing-Kultur wurde aus 20-Tagen alten WT-Embryonen isoliert.

## 4.2. Erstellung einer genetisch veränderter Hühnerlinie mit einem KO der Serinprotease-Domäne des TMPRSS2

### 4.2.1. Targeting Strategie und Etablierung einer PCR zum Nachweis eines KOs der TMPRSS2 Serinprotease-Domäne

Um einen Funktionsverlust des TMPRSS2 zuerst in Hühnerzellen und dann im nächsten Schritt im Tier zu erzeugen, sollte die Serinprotease-Domäne, welche von Exon 10 – 13 codiert wird, mithilfe von CRISPR/Cas9 entfernt werden. Das gesamte *chTMPRSS2* Protein wird im WT von 14 Exons codiert, wodurch - im Fall eines KOs der TMPRSS2 Serinprotease-Domäne - der homozygote Genotyp nur 10 Exons hat und Exon 14 direkt auf Exon 9 folgt. Diese Targeting-Strategie wurde bereits bei der Erstellung von *TMPRSS2<sup>-/-</sup>* Mäusen verwendet [36].

Für den Nachweis eines erfolgreichen KOs der TMPRSS2 Serinprotease-Domäne wurde eine PCR mit den Primer 902 und 903 etabliert, welche auf das verkürzte Amplikon zwischen dem Intron nach Exon 9 und Exon 14 screenen. Im Fall einer genetischen Veränderung ist das PCR-Produkt 332 bp lang, wohingegen der WT ein Amplikon von 3931 bp aufweist. Die Elongationszeit dieser PCR wurde dabei auf das kurze Amplikon optimiert (siehe 3.3.4.2, Abbildung 21).



**Abbildung 21: Prinzip der PCR zum Nachweis eines KOs der TMPRSS2 Serinprotease-Domäne**

*chTMPRSS2* wird im WT von 14 Exons codiert. Um einen KO zu erzeugen, sollte mit CRISPR/Cas9 die Serinprotease-Domäne, welche von Exon 10 bis 13 codiert wird, entfernt werden. Im *chTMPRSS2<sup>-/-</sup>* Genotyp wird das Protein von 10 anstatt von 14 Exons codiert, sodass Exon 14 direkt auf Exon 9 folgt. Die zuvor designierten sgRNAs schnitten im Intron nach Exon 9 und im letzten Abschnitt von Exon 13 (angepasst von [36]). Für den Nachweis eines *TMPRSS2<sup>-/-</sup>* wurde mit einer PCR auf die Amplikon-Länge zwischen dem Intron nach Exon 9 und Exon 14 gescreent. In diesen beiden Abschnitten banden auch die verwendeten Primer 902 und 903. Da die Elongationszeit auf das kurze Fragment mit einer Länge von 332 bp optimiert

war, konnte nur dieses Amplikon im *TMPRSS2*<sup>-/-</sup> nachgewiesen werden. Folglich konnte nur zwischen dem WT und *TMPRSS2*<sup>+/-</sup> bzw. *TMPRSS2*<sup>-/-</sup> unterschieden werden. Die Abbildung wurde mit BioRender erstellt und ist nicht maßstabsgetreu.

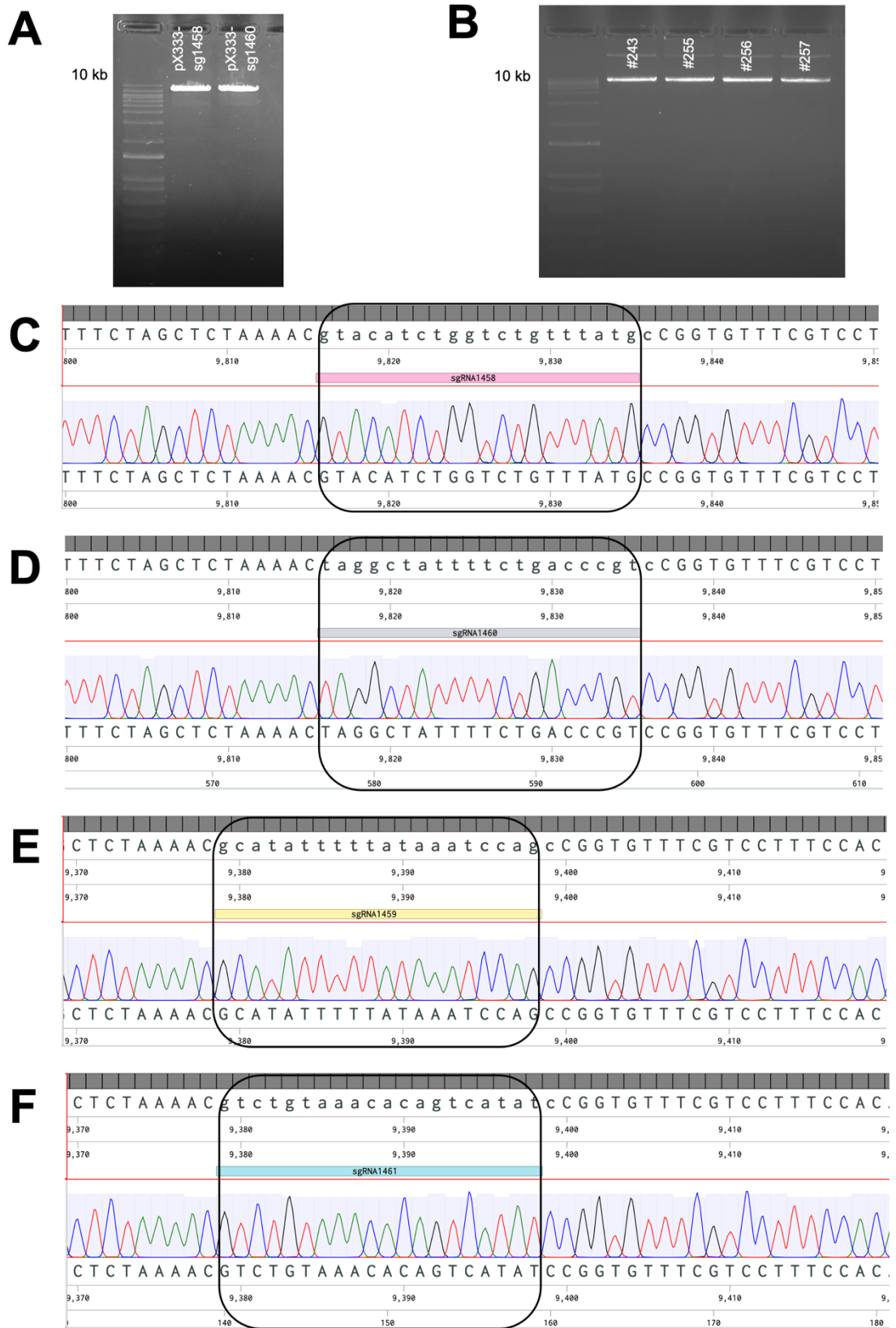
#### 4.2.2. KO der TMPRSS2 Serinprotease-Domäne mittels CRISPR/Cas9

Im ersten Schritt wurden je 2 sgRNAs in Exon 10, welche sich nahe an dem upstream gelegenen Intron nach Exon 9 befinden, und 2 sgRNAs in Exon 13, welche wiederum relativ nahe an der downstream orientierten Intron-Region liegen, mithilfe des Benchling-Tools designt (siehe Tabelle 87). Die Auswahl der sgRNAs erfolgte jeweils über einen hohen prozentualen Anteil des ON- und Off-Target-Scores.

**Tabelle 87: On- und Off-Target-Scores der verwendeten sgRNAs**

<b>sgRNA</b>	<b>On-Target-Score [%] [217]</b>	<b>Off-Target-Score [%] [218]</b>
sgRNA1458	59,6	43,1
sgRNA1459	56,7	33,1
sgRNA1460	58,0	44,7

Anschließend wurden die vier sgRNAs 1458, 1459, 1460 und 1461 (siehe 0) in einen pX333-Backbone mit einer *Hygromycin*-Kassette (#97) (siehe Tabelle 57) kloniert (siehe 3.4.3, Tabelle 58). Um die verschiedenen Kombinationen der sgRNAs nachfolgend *in vitro* zu testen, wurden die vier Plasmide #243, 255, 256 und 257 generiert (siehe Tabelle 58, Abbildung 8, Abbildung 9, Abbildung 10, Abbildung 11, Abbildung 22).



**Abbildung 22: Klonierung der sgRNA in den pX333-Hygromycin Backbone**

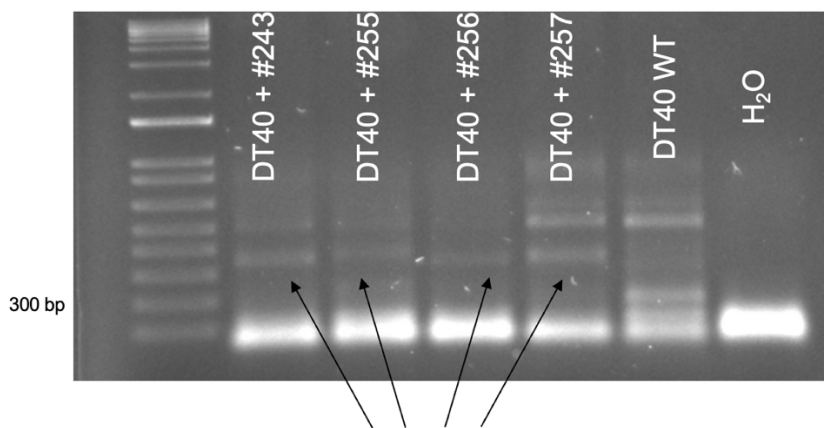
**A** Im ersten Schritt wurde die sgRNA 1458 bzw. 1460 über die BbsI Schnittstelle in den Backbone eingebracht und die Integration wurde durch einen Verdau mit BbsI und BshTI bestätigt. Beide Konstrukte zeigten eine einzige Bande bei 10090 bp. **B** Anschließend wurden jeweils die sgRNAs 1459 und 1461 über die BsaI Schnittstelle in die beiden Plasmide kloniert und die vier Konstrukte zeigten im Verdau mit BsaI und BshTI



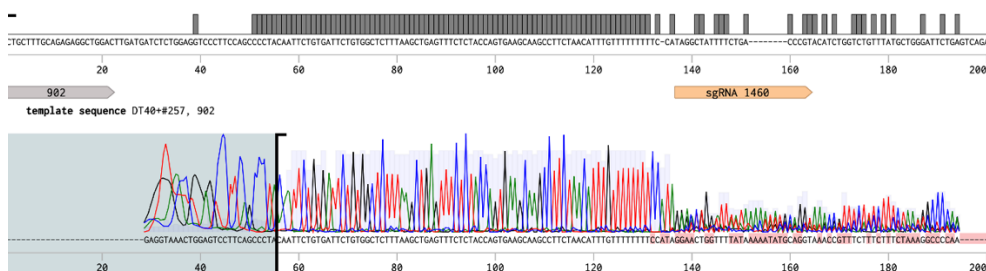
die erwartete Bande bei 10086 bp. **C-F** Die korrekte Integration der sgRNA 1458 (**C**), 1460 (**D**), 1459 (**E**) und 1461 (**F**) wurde durch Sanger-Sequenzierung (Primer 15128 für 1458 und 1460, Primer 15119 für 1459 und 1461) bestätigt.

Um die Effizienz der verschiedenen sgRNA-Kombinationen zu testen, wurden die vier Konstrukte in DT40 Zellen elektroporiert (3.1.5.1) und nach 72 h per PCR analysiert (siehe 3.3.4.2). Dabei zeigten die DT40-Zellen, welche mit je einem der Konstrukte #243, 255, 256 und 257 transfiziert worden waren, eine Bande für das kurze Amplikon ohne die TMPRSS2 Serinprotease-Domäne bei 355, 374, 336 und 355 bp. Dieses kurze Amplikon konnte in DT40 WT Zellen nicht nachgewiesen werden. Um den KO der TMPRSS2 Serinprotease Domäne zu bestätigen, wurde das PCR-Produkt der DT40 Zellen + #257 (pX333-Hygro-sgRNA1460-sgRNA1461) aufgereinigt (siehe 3.3.6.2) und der DNA-Doppelstrangbruch an den beiden gewünschten Stellen konnte mithilfe der Sanger-Sequenzierung (siehe 3.4.10) bestätigt werden (siehe Abbildung 23).

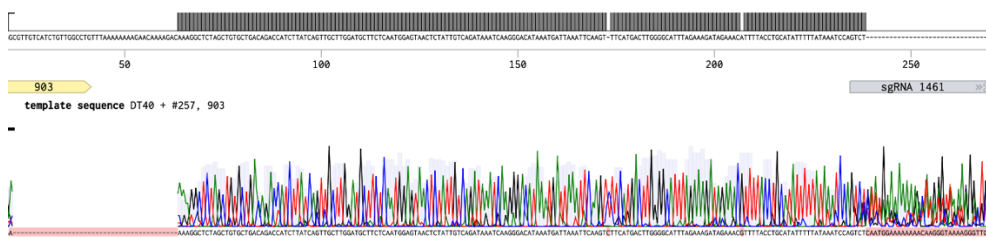
**A**



**B**



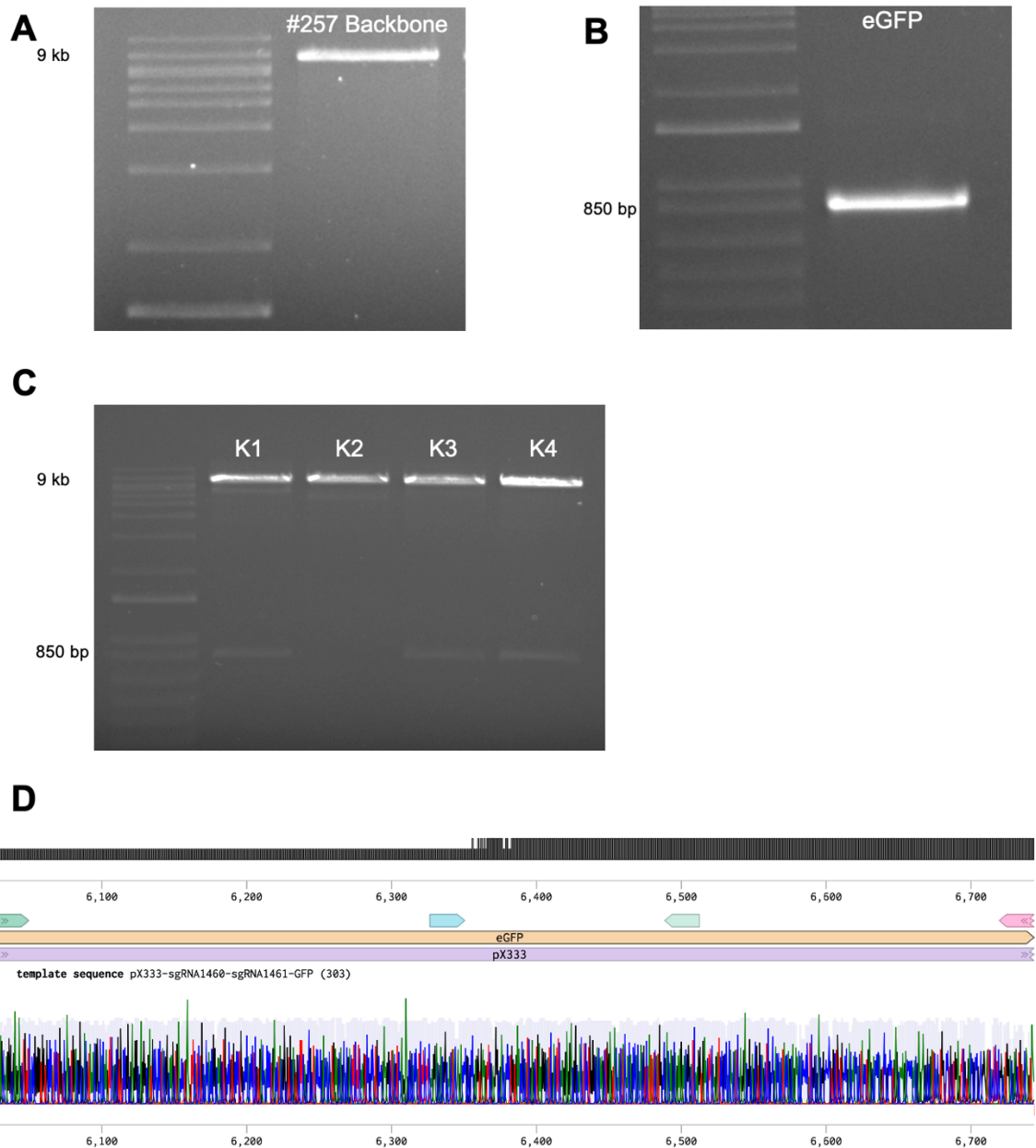
**C**



### Abbildung 23: Nachweis des TMPRSS2 KOs in DT40 Zellen

**A** Es wurden die 4 Kombinationen der sgRNAs in DT40 Zellen getestet und 72 h nach Elektroporation wurde aus den Zellen gDNA isoliert. Das PCR-Produkt mit einer Länge von 355, 374, 336 und 355 bp konnte mithilfe der Primer 902 und 903 für die transfizierten Proben amplifiziert werden, jedoch nicht im WT. Die Amplikons sind in der Abbildung mit einem Pfeil markiert. **B + C** Die genetische Modifikation wurde zusätzlich für die Probe DT40 + #257 über die Sanger-Sequenzierung mit den Primern 902 (**B** – sgRNA 1460) und 903 (**C** – sgRNA 1461) bestätigt. Der Mismatch im sequenzierten PCR-Produkt im Bereich der sgRNAs ist in rot gekennzeichnet.

Nachdem der KO der TMPRSS2 Serinprotease-Domäne mithilfe der Sanger-Sequenzierung erfolgreich bestätigt werden konnte, wurde das Plasmid #303, welches die sgRNAs 1460 und 1461, sowie eine *eGFP*-Kassette anstatt der *Hygromycin*-Resistenz trägt (siehe Abbildung 12), mithilfe eines Gibson-Assemblies (siehe 3.4.2) kloniert. Dafür wurde die 834 bp-lange *eGFP*-Kassette mit den Gibson-Primern (1001, 1002) vom Plasmid #K167 (siehe Tabelle 57) amplifiziert (siehe 3.3.4.3). Die *Hygromycin*-Kassette wurde durch den Fluoreszenz-Marker in dem Backbone #257 (siehe Tabelle 58, Abbildung 11) über die beiden *EcoRI* Schnittstellen ersetzt (siehe 3.4.2, Abbildung 12) und die korrekte Integration der *eGFP*-Kassette wurde ebenfalls über die Sanger-Sequenzierung bestätigt (siehe 3.4.10).



**Abbildung 24: Klonierung des eGFP-pX333-sg1460-sg1461 Konstrukts**

**A** Das Plasmid #257, welches die *Hygromycin*-Kassette enthält, wurde mit *EcoRI* verdaut. Der Backbone mit einer Länge von 8988 bp wurde aufgereinigt. **B** Im nächsten Schritt wurde die *eGFP*-Kassette (Gibson Primer: 1001+1002) von dem Template-Plasmid #K167 mit einer Länge von 834 bp amplifiziert und über den Gibson Assembly in den Backbone kloniert. **C** 4 Klone wurden isoliert und mit *EcoRI* verdaut, dabei zeigte die obere Bande bei 8987 bp den Backbone und die Bande bei 789 bp das *eGFP*-Insert. Klon 2 zeigte nicht die erwartete Bande bei 789 bp. Die anderen Klone #1, 3 und 4 wiesen die erwarteten Fragmente auf. **D** Die korrekte Integration der *eGFP*-Kassette anstelle der *Hygromycin*-Resistenz wurde final in Klon 4 noch über die Sanger-Sequenzierung (Primer #26 und #16010) bestätigt.

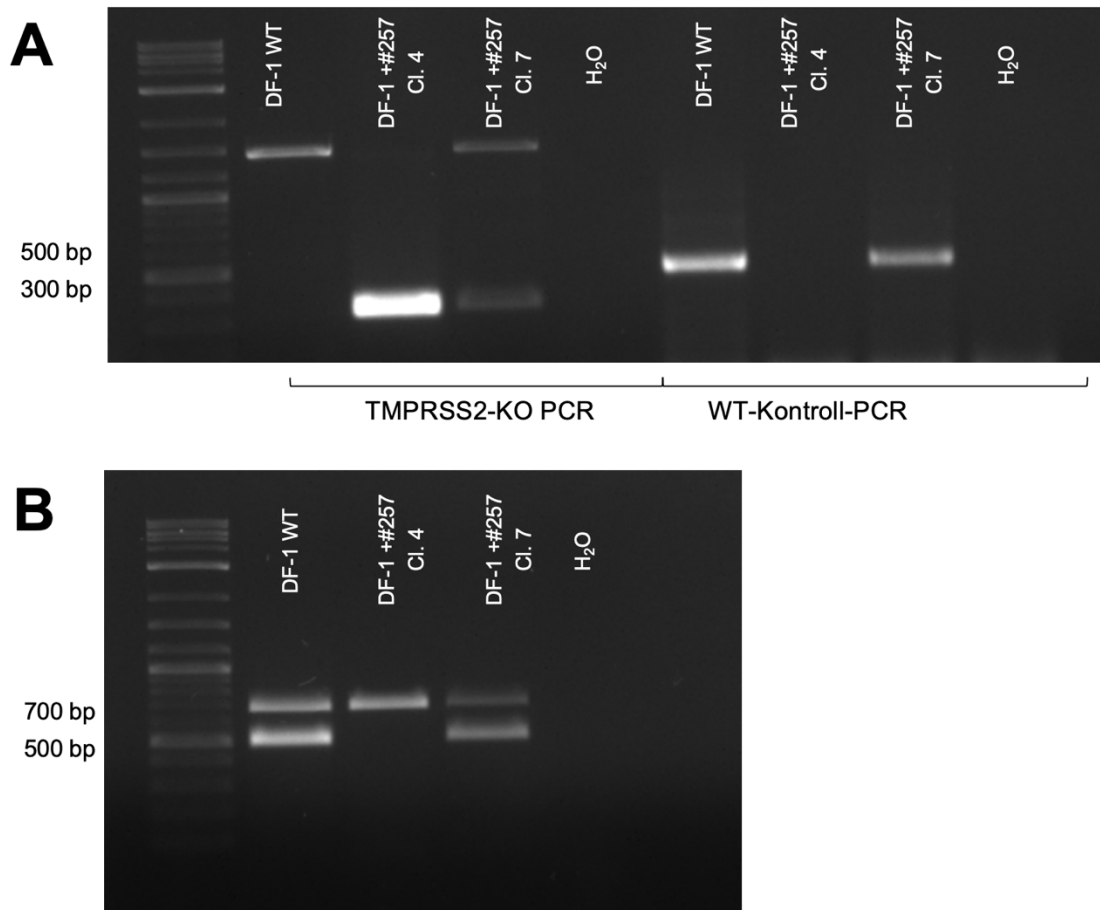
#### 4.2.3. KO der TMPRSS2 Serinprotease-Domäne mittels CRISPR/Cas9 in DF-1 Zellen

Für die Etablierung weiterer Genotypisierungsstrategien wurden DF-1 WT-Zellen mit dem Plasmid #257, welches eine *Hygromycin*-Resistenz trägt (siehe Tabelle 58, Abbildung 11), transfiziert und Einzel-Zellklone wurden kultiviert. Von den 29 Klonen wurden 6 Klone genotypisiert, darunter waren ein WT-Klon (Klon #1), ein homozygoter Klon (Klon #4) und vier heterozygote Klone (siehe Tabelle 88). In diesem Zusammenhang sollte die WT-Kontroll-PCR und eine Multiplex-PCR etabliert werden, welche die Unterscheidung zwischen *TMPRSS2*<sup>-/-</sup> und *TMPRSS2*<sup>+/-</sup> bzw. *TMPRSS2* WT ermöglicht. Aufgrund von INDELS hatte das PCR-Produkt für den *TMPRSS2*-KO eine Bande von 332 bp anstatt den erwarteten 355 bp (siehe 4.2.2, 4.2.4, Abbildung 27).

**Tabelle 88: Genotypisierung von DF-1 + #257 Einzelzell-Klonen**

Klon #	Genotyp	Klon #	Genotyp	Klon #
1	WT	7	heterozygot	1
3	heterozygot	8	heterozygot	3
4	homozygot	9	heterozygot	4

Die nachfolgende Abbildung 25 zeigt die verwendeten Genotypisierungsstrategien beispielhaft für DF-1 WT-Zellen, einem *TMPRSS2*<sup>-/-</sup> Klon (#4) und einem *TMPRSS2*<sup>+/-</sup> Klon (#7). Dabei zeigten ausschließlich die homozygoten und heterozygoten Klone eine Bande bei 332 bp in PCR mit den Primer 902 und 903 und der WT und der heterozygote Klon hatte eine Bande bei 486 bp in der WT-Kontroll-PCR mit den Primern 861 und 1094. In der Multiplex-PCR mit den Primern 936, 937, 861 und 1094 hatten alle Genotypen eine Bande bei 704 bp, ausschließlich der WT und der *TMPRSS2*<sup>+/-</sup> Klon zeigte eine Bande bei 486 bp. Diese Bande fehlte bei dem homozygoten Klon, da die Primer 861 und 1094 in der deletierten Region der Serinprotease-Domäne banden.



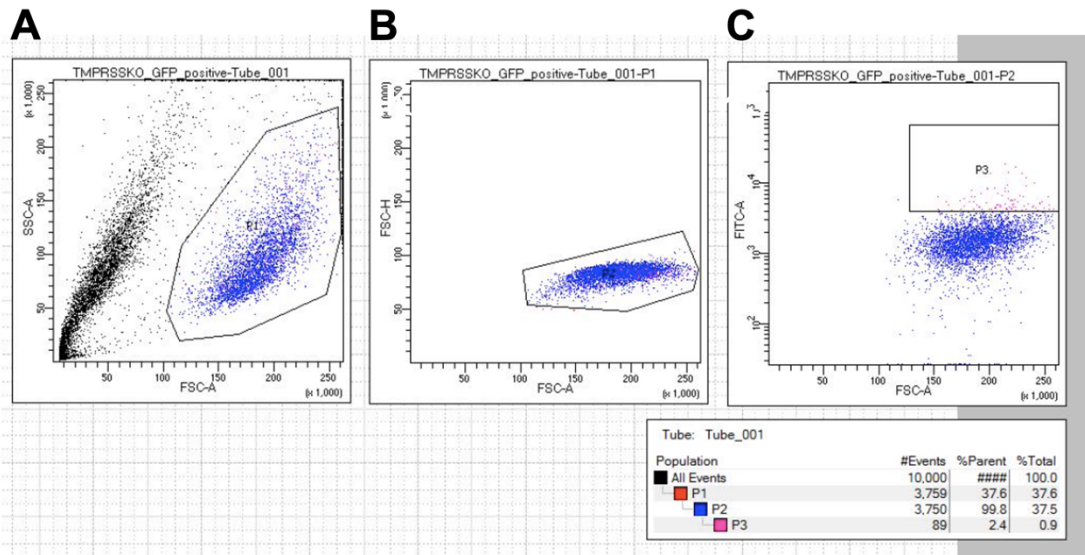
**Abbildung 25: Genotypisierung für DF-1 Einzelzell-Klonen mit einem KO der TMPRSS2 Serinprotease-Domäne und der WT-DF-1 Zellen**

**A** In der PCR (Primer: 902, 903) konnte zwischen dem WT- und den genetisch modifizierten Proben unterschieden werden. Die WT-Probe zeigte keine Bande bei 332 bp, wohingegen das PCR-Produkt im homozygoten Klon #4 und im heterozygoten Klon #7 amplifiziert werden konnte. In der WT-Kontroll-PCR (Primer: 861, 1094) kann ein heterozygoter Klon von einem homozygoten unterschieden werden. Das PCR-Produkt mit einem Amplikon von 486 bp konnte im WT und im heterozygoten KO, jedoch nicht im homozygoten KO, nachgewiesen werden. **B** Die Multiplex-PCR (Primer: 936, 937, 861, 1094) ermöglichte die Identifizierung eines homozygoten Klons. Die Bande bei 704 bp (Primer: 936, 937) konnte in allen Genotypen nachgewiesen werden, die Bande bei 486 bp (Primer: 861, 1094) wurde ausschließlich im WT und im heterozygoten Klon #7 amplifiziert.

#### 4.2.4. Erstellung genetisch veränderter PGCs mit einem KO der TMPRSS2-Serinprotease-Domäne

Nachdem die Targeting Strategie für den KO der TMPRSS2 Serinprotease-Domäne erfolgreich in DT40 Zellen etabliert (siehe 4.2.1, Abbildung 23) und das Konstrukt #303 kloniert worden war (siehe Abbildung 24), sollten im nächsten Schritt PGCs mit einem KO der TMPRSS2-Serinprotease-Domäne generiert werden. Dafür wurden männliche PGCs (LSL, Linie 9-2020) in einem Alter von 40 Tagen mit dem Plasmid #303 (siehe Tabelle 58, Abbildung 12) transfiziert (siehe 3.1.5.2). 48 h nach der Elektroporation

wurden die Zellen mit einem BD FACS Aria™ Fusion auf eGFP<sup>+</sup>-Zellen gesortet. Dafür wurden im ersten Schritt über FSC SSC auf die lebendigen Zellen, dann auf die einzelnen Zellen und schließlich auf die eGFP-positiven Zellen gated und gesortet (siehe Abbildung 26).



**Abbildung 26: Gating Strategie für den Sort auf eGFP-positive PGCs**

Die PGCs wurden an Tag 40 mit dem Plasmid #303 elektroporiert und 48 h später auf eGFP<sup>+</sup>-Zellen gesortet. **(A)** Dafür wurden im ersten Schritt über das FSC SSC die lebendigen Zellen ausgewählt, **(B)** dann die Einzelzellen und **(C)** im letzten Gate schließlich die eGFP<sup>+</sup>-Zellen, welche das Plasmid transient aufgenommen haben.

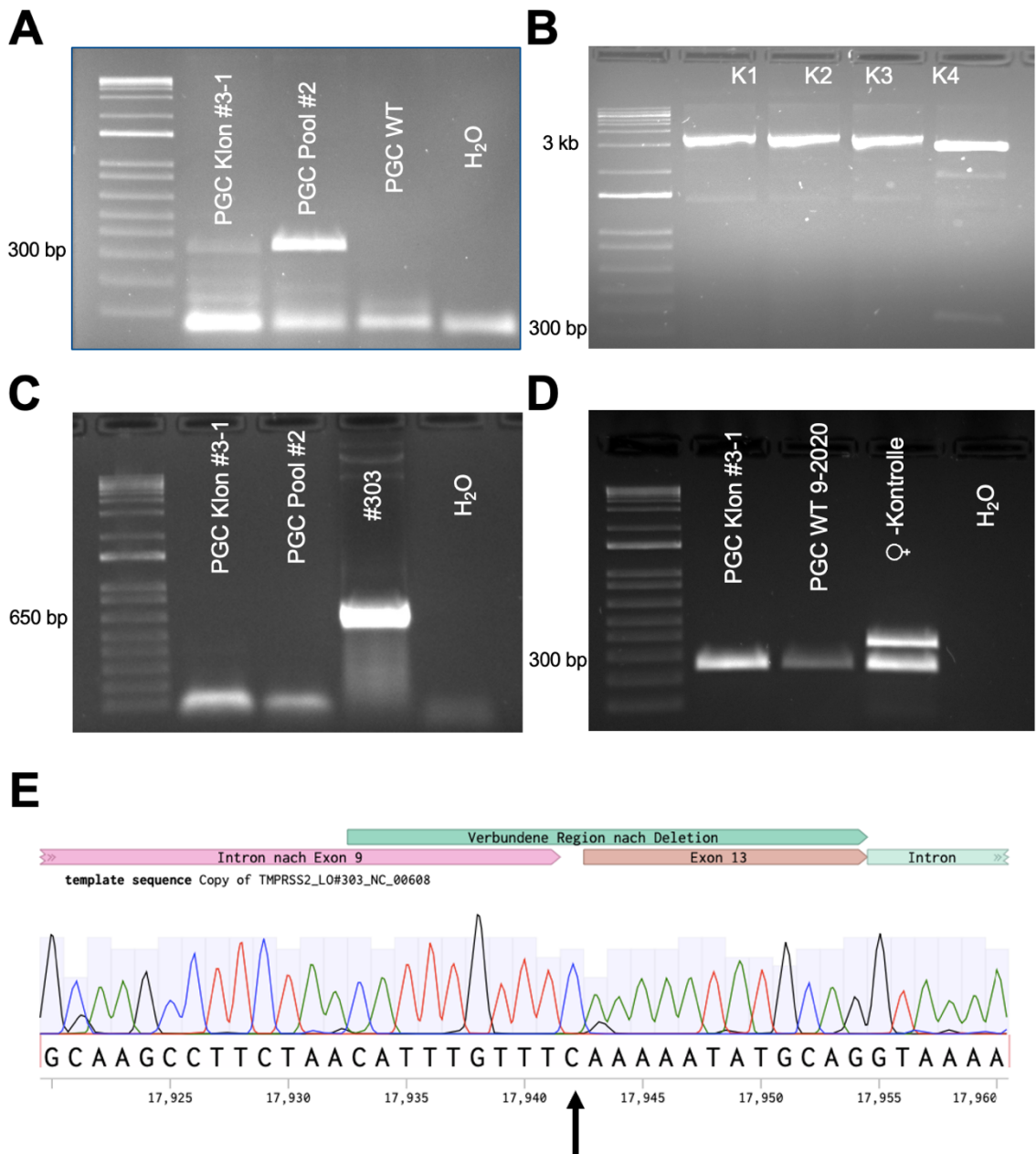
37,6 % der PGCs war lebendig, insgesamt gab es 37,5 % einzelne PGC, von denen 2,4 % eGFP<sup>+</sup> waren. In Pool #1 konnten 6000 Zellen und im Pool #2 13515 Zellen gesortet werden. Von diesen PGC-Pools wurden dann insgesamt 45 Einzelzell-Klone kultiviert, von denen 3 Klone einen KO der TMPRSS2 Serinprotease-Domäne aufwiesen. 2 Klone (#3-1, #6-13) hatten einen heterozygoten KO und der Klon #6-15 hatte einen homozygoten KO der TMPRSS2 Serinprotease Domäne (siehe Tabelle 89). Die Targeting-Effizienz lag somit bei 6,67 %.

**Tabelle 89: Genotypisierung der PGC Einzelzell-Klone**

Klon	Genotyp	Klon	Genotyp
1-1	WT	5-3	WT
1-2	WT	5-4	WT
1-4	WT	5-5	WT
1-5	WT	5-6	WT
1-6	WT	5-8	WT
2-1	WT	5-9	WT
2-2	WT	6-1	WT
2-3	WT	6-2	WT
2-4	WT	6-3	WT

2-5	WT	6-4	WT
2-6	WT	6-5	WT
<b>3-1</b>	<b>heterozygot</b>	6-6	WT
3-2	WT	6-7	WT
3-3	WT	6-8	WT
3-4	WT	6-9	WT
3-5	WT	6-10	WT
3-6	WT	6-11	WT
4-1	WT	6-12	WT
4-2	WT	<b>6-13</b>	<b>heterozygot</b>
4-3	WT	6-14	WT
4-4	WT	<b>6-15</b>	<b>homozygot</b>
5-1	WT	6-16	WT
5-2	WT		

Abbildung 27 zeigt beispielhaft die Genotypisierung des PGC Einzelzell-Klons #3-1 durch die PCR mit den Primer 902 und 903. Die gDNA des PGC-Pool #2 diente als Positivkontrolle für den KO der TMPRSS2-Serinprotease-Domäne. Die Bande bei 332 bp bestätigte die erfolgreiche genetische Modifikation im PGC-Klon #3-1 und im PGC-Pool #2, wohingegen dieses Amplikon nicht im WT nachgewiesen werden konnte. Um final den KO der Serinprotease-Domäne des chTMPRSS2 im PGC-Klon #3-1 zu bestätigen, wurde das PCR-Produkt in einen pGEM-T<sup>®</sup> Easy Vektor kloniert und mithilfe der Sanger-Sequenzierung (siehe 3.4.10) sequenziert. Dieses Ergebnis konnte bestätigen, dass in dem PGC-Klon #3-1 der letzte Abschnitt von Exon 13 direkt auf das Intron nach Exon 9 folgt. Somit fehlen Exon 10, 11, 12 komplett und 139 bp des 151 bp langen Exon 13 (92,05 %). Das Cytosin (siehe Abbildung 27 E, mit Pfeil markiert) zwischen dem Intron nach Exon 9 und den letzten 12 bp von Exon 13 wurde während des Reparaturmechanismus nach dem durch CRISPR-Cas9 induzierten Doppelstrangbruch zufällig eingefügt. Des Weiteren wurde mit der Cas9-PCR bestätigt (siehe 3.3.4.3), dass der Klon #3-1 sowie der Pool #2 keine stabile, ungewollte Cas9-Integration aufwiesen. Ausschließlich in dem Plasmid #303 (siehe Tabelle 58, Abbildung 12) konnte Cas9 mit einem Amplikon von 685 bp nachgewiesen werden. Zusätzlich dazu wurde erneut in der Sexing-PCR (siehe 3.3.4.1) bestätigt, dass der PGC-Klon und der PGC-Pool #2 ein männliches Geschlecht hatten (siehe Abbildung 27).



**Abbildung 27: Genotyping und Sequenzierung des PGC Einzelzell-Klons #3-1**

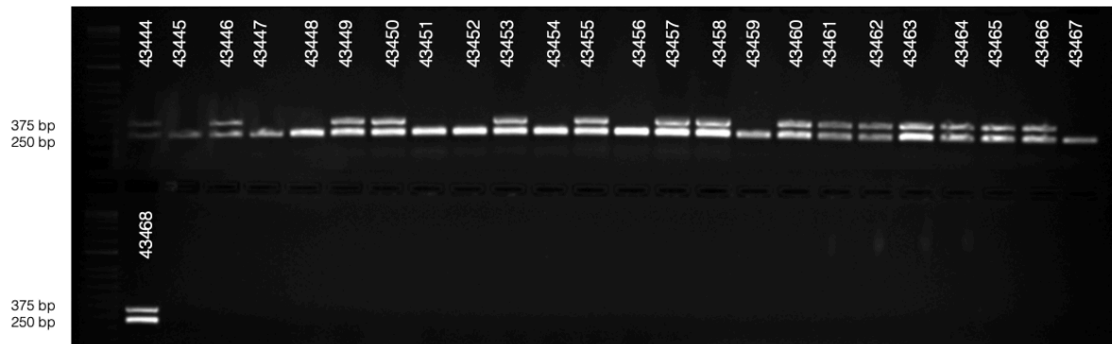
**A** Die gDNA des PGC Einzelzell-Klons wurde mit dem ReliaPrep™ Blood gDNA MiniPrep System isoliert und anschließend wurde der Klon mit einer PCR (Primer 902, 903) auf den KO der TMPRSS2 Serinprotease-Domäne getestet. Dabei diente der PGC-Pool #2 als Positivkontrolle und die PGC WT gDNA als Negativkontrolle. Die genetische Veränderung konnte im PGC-Klon #3-1 und im PGC-Pool #2 nachgewiesen werden, jedoch nicht im PGC-WT. **B** Die Bande des Klons #3-1 mit einer Länge von 332 bp wurde aufgereinigt, in einen pGEM-T® Easy Vektor kloniert, 4 Klone wurden isoliert und mit EcoRI verdaut. Klon 4 zeigte die erwarteten Banden bei 2997 bp und 350 bp. Dieser wurde anschließend sequenziert (Primer: T7, SP6). **C** Die stabile Cas9 Integration konnte für den PGC.Klon #3-1 und für den PGC-Pool #2 (Primer 1085, 1086) ausgeschlossen werden. Cas9 konnte ausschließlich in der Probe des CRISPR/Cas9 Plasmids #303 mit einer Amplikonlänge von 685 bp nachgewiesen werden (Positivkontrolle). **D** Außerdem wurde erneut bestätigt, dass der PGC-Klon #3-1 und der PGC-Pool männlich war. Als Kontrolle diente eine weibliche Probe, welche bei 250 bp und bei 375 bp eine Bande (Primer 1, 2, 3, 4) zeigte. Die männlichen Proben



wiesen ausschließlich ein Amplikon bei 250 bp auf. **E** Bei den Ergebnissen der Sanger-Sequenzierung war zu sehen, dass der letzte Abschnitt von Exon 13 direkt auf das Intron nach Exon 9 folgt. Das Cytosin wurde im Zusammenhang des DNA-Doppelstrangbruchs als Insertion eingebaut. Der erfolgreiche KO der TMPRSS2 Serinprotease-Domäne konnte in dem PGC-Klon #3-1 erfolgreich bestätigt werden.

#### 4.2.5. Erstellung der Keimbahn-Chimären mit einem KO der TMPRSS2 Serinprotease-Domäne und Nachweis der genetischen Veränderung im Sperma

Nachdem der PGC-Klon #3-1 erfolgreich durch die Sanger-Sequenzierung bestätigt werden konnte (siehe 4.2.4, Abbildung 27), konnten diese Zellen für die Erstellung der Chimären verwendet werden (siehe 3.2.1). Der PGC-Klon #3-1 wurde dabei in einem Alter von 88 Tagen in 65 h alte LSL-WT Embryonen unter dem Mikroskop injiziert. Von den 35 injizierten Embryonen, schlüpften 25 Tiere. Mithilfe der Sexing-PCR wurde das Geschlecht der Hühner bestimmt (siehe 3.3.4.1). Davon waren 8 Tiere männlich. Somit betrug die Schlupfrate 71,4 % und der Anteil der Hähne davon lag bei 28,6 %.



**Abbildung 28: Sexing der Chimären**

Nachdem gDNA aus dem Blut der Chimären mit dem Quick and Dirty Protokoll isoliert worden war, wurde das Geschlecht der Tiere mithilfe der Sexing-PCR bestimmt. Die Hennen haben ein W- und ein Z-Geschlechtschromosom, wohingegen die Hähne zwei Z-Chromosomen haben. Die Bande bei 250 bp detektiert das Z-Chromosom mit den Primern 1 und 2 und die Bande bei 375 bp das W-Chromosom mithilfe der Primer 3 und 4. Die Tiere mit den Flügelmarken #43445, #43447, #43448, #43451, #43454, #43459 und #43469 waren männlich.

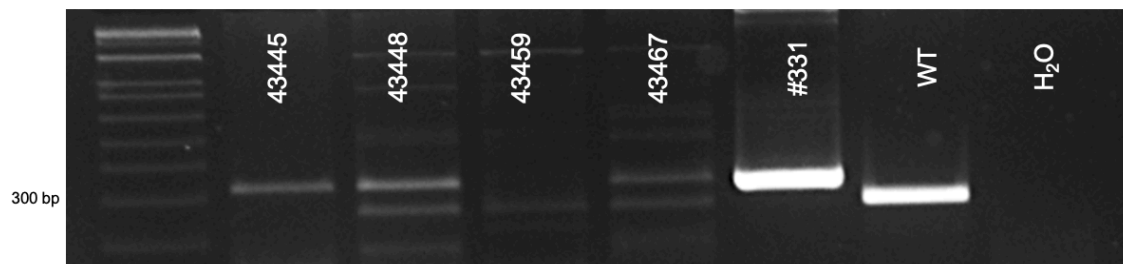
Sobald die Hähne die Geschlechtsreife erreicht hatten, wurden die Tiere schrittweise an das Sammeln von Sperma-Proben gewöhnt (siehe 3.2.2). Die gesammelten Proben wurden auf einen KO der TMPRSS2 Serinprotease-Domäne gescreent (siehe Abbildung 29, Tabelle 90). Ein positiver chimärer Hahn wurde identifiziert, sobald mehrfach ein positives PCR-Ergebnis vorlag.

**Tabelle 90: Screening der Chimären auf den KO der TMPRSS2 Serinprotease-Domäne**

Das Sperma wurde in 5 Runden von den Tieren gesammelt. Gaben die Tiere in dieser Runde keine Sperma-Probe oder musste diese aufgrund einer Verunreinigung verworfen werden, wurde dies mit einem „-“ gekennzeichnet. War die gDNA-Isolation nachweislich nicht erfolgreich, ist das mit „gDNA Iso“ in der Tabelle vermerkt. Konnte die genetische Modifikation nachgewiesen werden, ist das mit „KO“ gekennzeichnet.

Hahn #	Runde 1	Runde 2	Runde 3	Runde 4	Runde 5
43445	gDNA Iso.	gDNA Iso	gDNA Iso	<b>KO</b>	<b>KO</b>
43447	-	-	gDNA Iso	gDNA Iso	
43448	gDNA Iso	-	-	<b>KO</b>	<b>KO</b>
43452	-	gDNA Iso	-	gDNA Iso	WT
43454	gDNA Iso	gDNA Iso	-	gDNA Iso	WT
43459	-	-	-	WT	WT
43467	-	gDNA Iso	gDNA Iso	<b>KO</b>	<b>KO</b>

Die nachfolgende Abbildung 29 zeigt beispielhaft das Screening der Sperma-Proben für Runde 4 (siehe Tabelle 90). Dabei wiesen die Hähne #43445, 43448 und 43467 die Bande bei 332 bp in der PCR (3.3.4.2) auf. Das Plasmid #331 diente als Positivkontrolle, wohingegen die genetische Modifikation nicht in der Sperma-Probe des Hahnes #43459 und in der WT-Kontrolle nachgewiesen werden konnte.

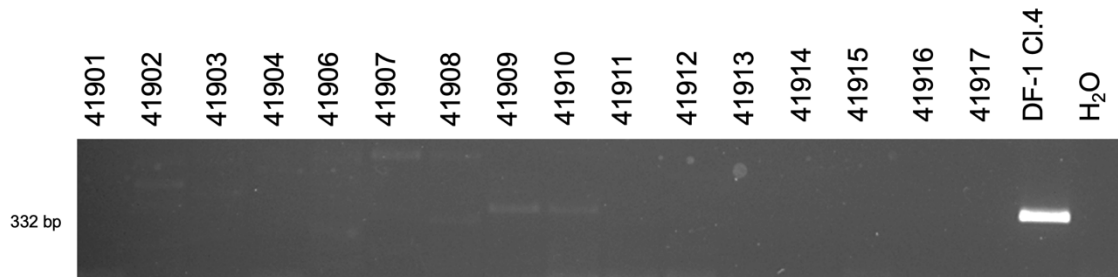


**Abbildung 29: Screening der Chimären-Sperma Proben auf einen TMPRSS2 KO**

Aus den gesammelten Sperma-Proben wurde gDNA entweder mit dem ReliaPrep™ Blood gDNA System oder mit der Quick and Dirty Methode isoliert. Anschließend wurden diese Proben auf einen KO der TMPRSS2 Serinprotease-Domäne mit der PCR gescreent. Die Tiere #43445, #43448 und #43467 zeigten einen KO der TMPRSS2 Serinprotease-Domäne durch die Bande bei 332 bp mithilfe den Primern 902 und 903 in den Sperma-Proben, welcher bei dem Hahn #43459 und bei der WT-Kontrolle nicht nachgewiesen werden konnte. Das Plasmid #331 diente als Positivkontrolle.

Die Chimären-Hähne #43445, #43448 und #43467 wurden mit WT-Hennen in Anpaarung gesetzt, um die ersten heterozygoten Tiere zu generieren. Um die erfolgreiche Keimbahn-Transmission zu überprüfen, wurden Gewebeproben von Embryos aus diesen Anpaarungen an ED7 gesammelt und nach der gDNA-Isolierung mit dem Quick and Dirty-Protokoll (siehe 3.3.1) auf die genetische Modifikation analysiert (siehe 3.3.4.2,

Abbildung 21). Ein *TMPRSS2*<sup>+/-</sup> konnte in den Embryos zuerst nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Im nächsten Schritt wurden dann die Tiere aus diesen Anpaarungen geschlüpft, wobei keines der 16 untersuchten Tiere eine genetische Modifikation aufwies (siehe Abbildung 30). Die Banden in den Proben der Tiere #41909 und 41910 konnte ebenfalls als unspezifisch nachgewiesen werden. Nach unterschiedlichen Genotyping-Strategien (Daten nicht gezeigt) wurde das positive Ergebnis aus den Embryos als falsch-positiv bewertet und keine Keimbahntransmission konnte final detektiert werden.



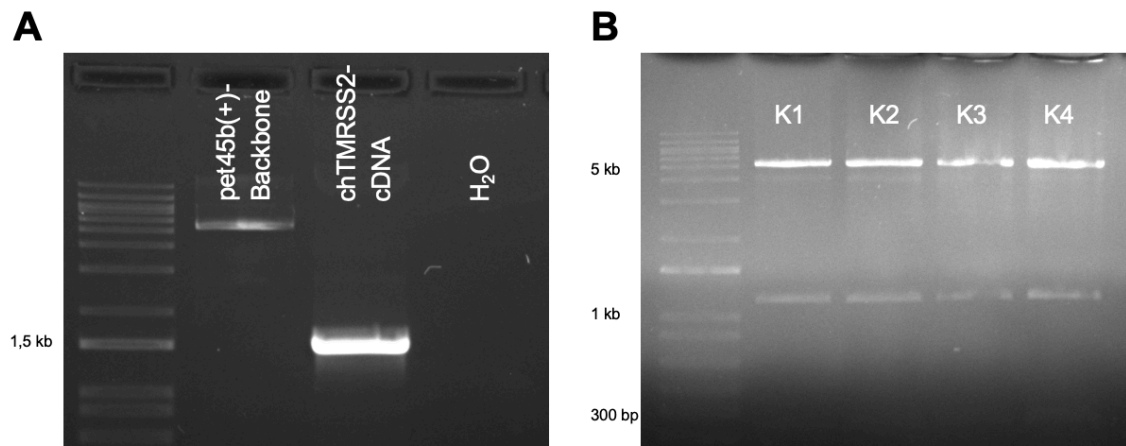
**Abbildung 30: Genotypisierung der Tiere aus der Anpaarung des Chimären-Hahns und WT-Hennen zur Etablierung der *TMPRSS2*<sup>+/-</sup> Linie**

Aus den Blutproben der 16 Tiere wurde mit der Quick and Dirty Methode gDNA isoliert und anschließend wurden die Tiere mit der PCR (Primer: 902, 903) genotypisiert. Ausschließlich die DF-1 Cl.4 Positivkontrolle zeigte das PCR-Produkt bei 332 bp. Es konnte in einer nachfolgenden PCR gezeigt werden, dass die Tiere 41902, 41908, 41909 und 41910 unspezifische Banden aufwiesen und dass es sich nicht um das gewünschte PCR-Produkt handelte.

#### 4.3. Proteinproduktion von chTMPRSS2 in *E.Coli BL21(DE3)*

##### 4.3.1. Klonierung des pET45b(+)-*chTMPRSS2* Konstrukts

Für die Proteinproduktion wurde der pET45b(+)-Backbone (siehe Tabelle 57) verwendet, bei dem die cDNA unter dem Bakteriophagen-Promoter T7 exprimiert wird [219]. Die *chTMPRSS2*-cDNA wurde mit den Gibson-Primern 1005 und 1006 vom Template-Plasmid #278 (siehe Tabelle 57) amplifiziert. Das PCR-Produkt mit einer Länge von 1509 bp wurde über eine BamHI-Schnittstelle in den pet45b(+)-Backbone mithilfe des Gibson-Assemblies (siehe 3.4.2) kloniert, vier Klone wurden isoliert (siehe 3.4.7) und in einem Kontrollverdau mit BamHI (siehe 3.4.9) getestet. Alle analysierten Klone zeigten die erwarteten Banden von 5260 bp, 1143 bp und 322 bp (siehe Tabelle 58, Abbildung 13). Die Sanger-Sequenzierung (siehe 3.4.10) bestätigte für Klon 4 die erfolgreiche Klonierung des pet45b(+)-*chTMPRSS2* Konstrukts (siehe Abbildung 13) (Daten nicht gezeigt). Abschließend wurde Klon 4 in den Bakterienstamm *E.Coli BL21(DE3)* (siehe Tabelle 5), welcher häufig für die Proteinproduktion verwendet wird [220, 221], transformiert (siehe 3.4.4, Abbildung 31).



**Abbildung 31: Klonierung des pet45b(+)-*chTMPRSS2* Konstrukts**

**A** Für die Klonierung des pET45b(+)-*chTMPRSS2* wurde das pET45b(+)-Backbone (#4) mit BamHI linearisiert. Die *chTMPRSS2*-cDNA mit einer Länge von 1509 bp wurde mit den Gibson-Primern (1005, 1006) vom Plasmid #278 amplifiziert und ebenfalls aufgereingt. **B** Nach der Transformation in den Bakterienstamm DH5 $\alpha$  wurde das Plasmid isoliert und im Kontrollverdau mit BamHI getestet. Die obere Bande bei 5260 bp zeigt das pet45b(+)-Backbone und die Banden bei 1143 bp und 322 bp zeigen das Insert *chTMPRSS2*, welches eine interne BamHI-Schnittstelle besitzt. Klon 4 wurde dann mit der Sanger-Sequenzierung sequenziert (Daten nicht gezeigt) und anschließend in *E. Coli BL21(DE3)* transformiert.

#### 4.3.2. Produktion und Aufreinigung von *chTMPRSS2* aus *E. Coli BL21(DE3)* unter Verwendung eines N-terminalen His-Tags

Die Aufreinigung des Proteins erfolgte über den N-terminalen His-Tag, der mit der Ni-NTA Agarose interagiert [222]. Über den Imidazol-Gradienten wurden dann im ersten Schritt die unspezifisch gebundenen Proteine von der Säule gewaschen und schließlich sollte das His-*chTMPRSS2* in einer oder zwei der zehn gesammelten Fraktionen von der Säule eluiert werden (siehe 3.8.2).

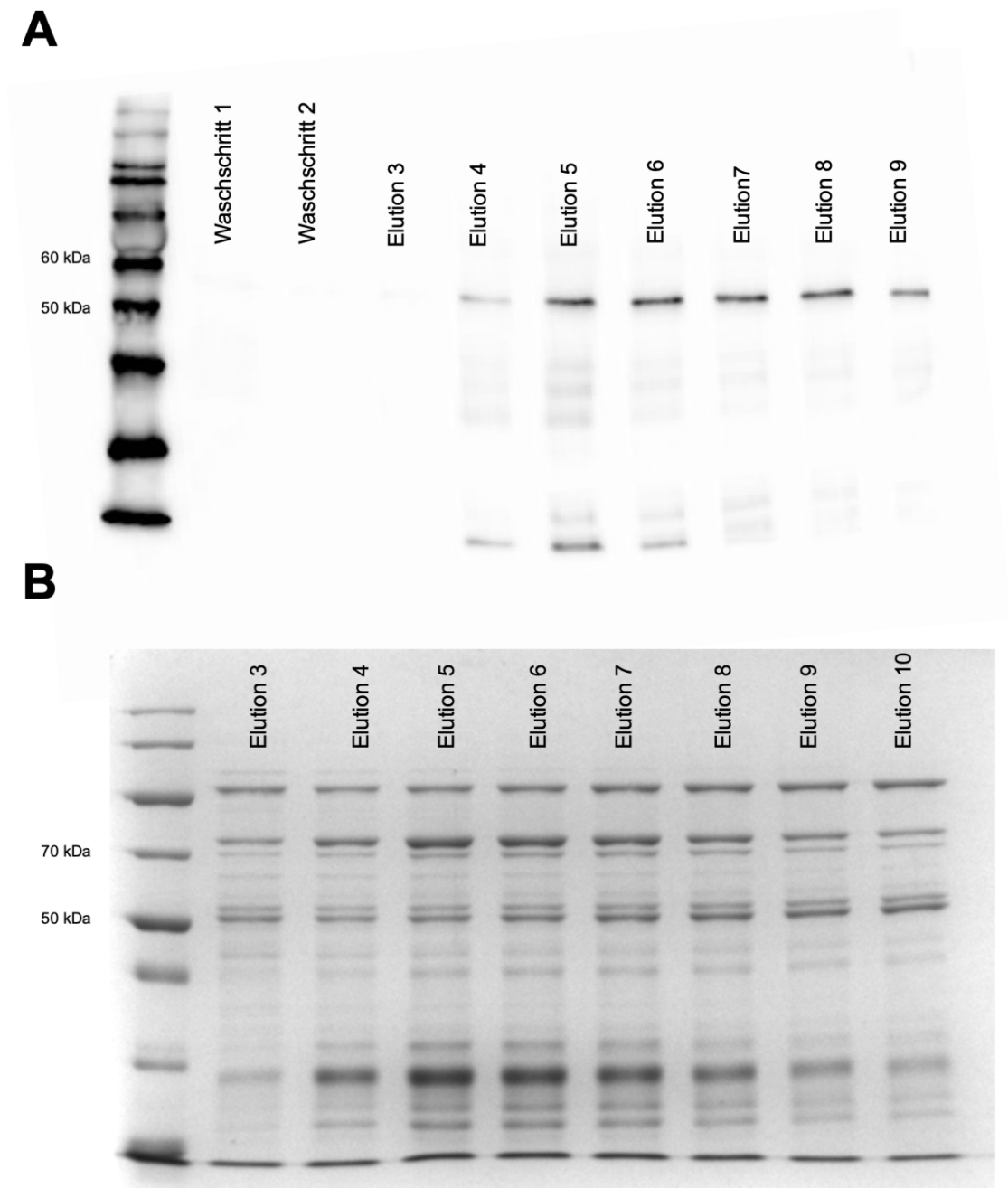
Um die unspezifischen Proteine in den Eluaten zu minimieren und gleichzeitig *chTMPRSS2* nachzuweisen, wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit acht unterschiedliche Reaktionsbedingungen (siehe Tabelle 91) getestet. Generell konnte keine optimale Reaktionsbedingung bestimmt werden, bei der *chTMPRSS2* noch in den Elutionen nachweisbar war und die unspezifischen Proteine deutlich minimiert waren.

Tabelle 91: Verwendete Reaktionsbedingungen zur Aufreinigung des His-chTMPRSS2 aus *E. Coli BL21(DE3)*

<b>MENGE IMIDAZOL</b>	<b>Bedingung 1</b>	<b>Bedingung 2</b>	<b>Bedingung 3</b>	<b>Bedingung 4</b>	<b>Bedingung 5</b>	<b>Bedingung 6</b>	<b>Bedingung 7</b>	<b>Bedingung 8</b>
Ultraschall- Puffer	+20 ul	+20 µl	+20 µl	+20 µl	+20 µl	+20 µl	+20 µl	+20 µl
Washing Buffer 1	+300 µl	+45 µl	+75 µl	+180 µl	+225,2 µl	+262,5 µl	+300 µl	+337,5 µl
Washing Buffer 2	+600 µl	+60 µl	+180 µl	+195 µl	+270 µl	+307,7 µl	+337,5 µl	+375 µl
Elutions- Puffer	EBSS-Stock (250 mM)	EBSS-Stock (250 mM)	EBSS-Stock (250 mM)	EBSS-Stock (250 mM)	EBSS-Stock (250 mM)	EBSS-Stock (250 mM)	EBSS-Stock (250 mM) +375 µl (WB3)	EBSS-Stock (250 mM)/ +250 µl/ +500 µl *

\* Für Elution 1 – 3 wurde die EBSS-Stock Konzentration von 250 mM verwendet, für Elution 4 – 6 wurde 250 µl Imidazol zur Stock-Lösung hinzugefügt und für Elution 7 – 10 wurde 500 µl Imidazol zur Stock-Lösung hinzugefügt.

Beispielhaft sind in der nachfolgenden Abbildung 32 die Ergebnisse der Aufreinigung einer 8 L Kultur mit den Reaktionsbedingungen 4 (siehe Tabelle 91) zusammengefasst. Im Western Blot (siehe Abbildung 32 A) konnte chTMPRSS2 über den N-terminalen His-Tag, welcher im Rahmen der Klonierung an das Protein geknüpft wurde, mithilfe des anti-His-HRP Antikörper spezifisch in Elution 4 -9 nachgewiesen werden. Das Protein wurde vor allem in Elution 5 bis 9 eluiert und war daher als stärkere Bande im Western Blot zu sehen. In diesen Proben waren außerdem bis zu 6 schwache, unspezifische Banden zu sehen. Kein Protein konnte in den beiden Waschsritten sowie in Elution 3 detektiert werden. Im nächsten Schritt wurden die Elutionen 3 bis 10 der gleichen Aufreinigung im SDS-Gel über eine Coomassie-Brilliant Blue R-250-Färbung (siehe Abbildung 32 B) analysiert. Alle Proben wiesen min. 14 unspezifische Banden auf, wobei keine Bande ein passendes Gewicht von 55,84 kDa hatte und als chTMPRSS2 mit N-terminalen His-Tag identifiziert werden konnte. Trotz des Erhöhens der Imidazol-Konzentration in den Wasch- und Elutions-Puffern (siehe Tabelle 91, Reaktionsbedingung 5-8) gelang es nicht, His-chTMPRSS2 spezifisch im Western Blot und über die Coomassie-Brilliant Blue R-250-Färbung zu detektieren und dabei gleichzeitig die unspezifischen Banden in letzterer Analyse merklich zu reduzieren.



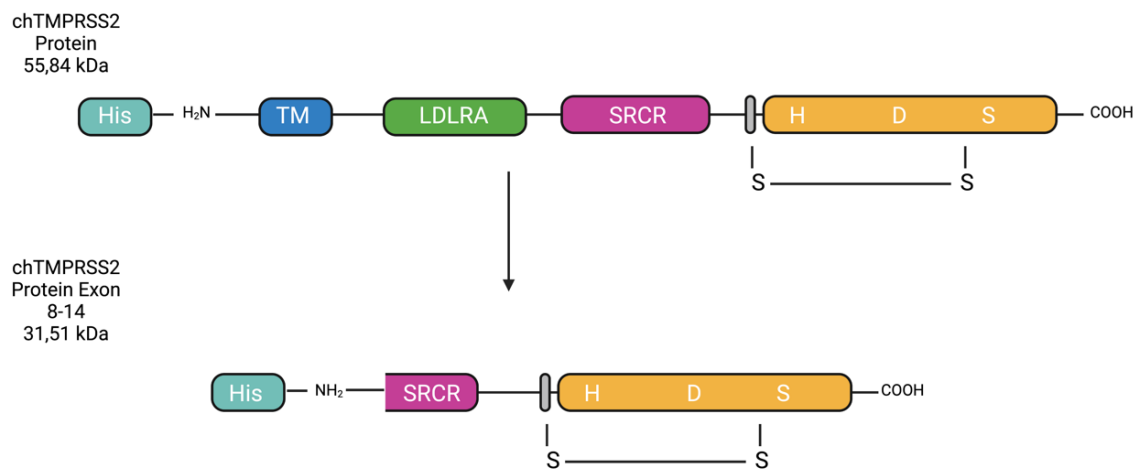
**Abbildung 32: Western Blot Analyse und Coomassie-Brilliant Blue R-250-Färbung der aufgereinigten His-chTMPRSS2 Proteinproben mit der Reaktionsbedingung 4**

**A** Der Western Blot mit dem monoklonalen und direkt-konjugiertem anti-His-HRP Antikörper zeigte die Proben nach der Proteinaufreinigung mit der Reaktionsbedingung 4 aus einer 8 L *E.Coli BL21(DE3)* Kultur. chTMPRSS2 wurde dabei über den N-terminalen His-Tag, welcher an das Protein geknüpft wurde, detektiert. Es wurden die beiden Waschschriffe und die Eluate 3 bis 9 aufgetragen. Elution 4 bis 9 zeigten die chTMPRSS2-spezifische Bande mit einem Gewicht von 55,84 kDa im Western Blot. **B** Das SDS-Gel mit der Coomassie-Brilliant Blue R-250-Färbung aus der gleichen Aufreinigung mit Reaktionsbedingung 4 fasst Elution 3 bis 10 zusammen. Alle Proben zeigten mind. 14 unspezifische Banden, Darunter konnte keine Bande mit einem Gewicht von 55,84 kDa als chTMPRSS2 mit einem N-terminalen His-Tag identifiziert werden.

Nachdem keine idealen Reaktionsbedingungen für die Aufreinigung des chTMPRSS2 mit einem N-terminalen His-Tag ermittelt werden konnte, wurde diese Strategie nicht mehr weiterverfolgt.

#### 4.3.3. Klonierung des pet45b(+)-chTMPRSS2-Exon8-14 Konstrukts

Im nächsten Schritt sollte dann nur die Protein-Domäne, welche von Exon 8-14 codiert wird, in *E. Coli BL21(DE3)* produziert werden (siehe Abbildung 33, Tabelle 58). An diese wurde ebenfalls ein N-terminaler His-Tag während der Klonierung in den pet45b(+)-Backbone geknüpft.

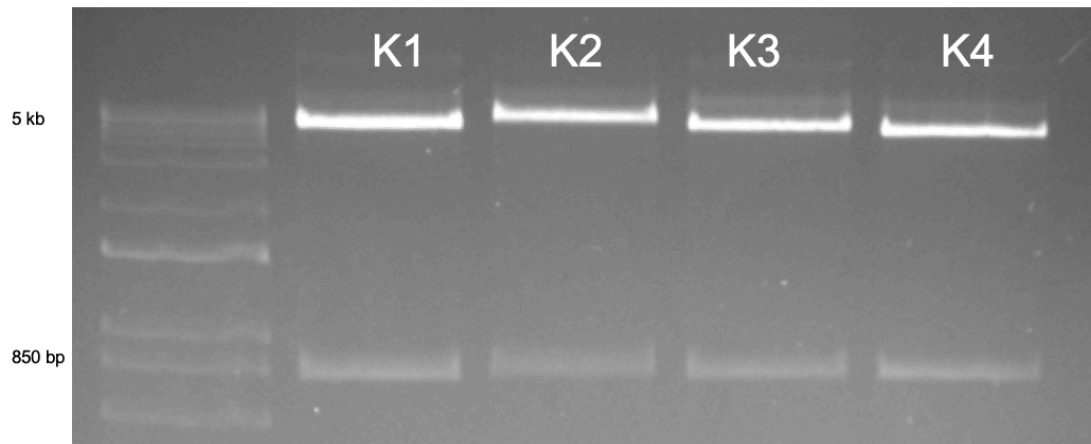


**Abbildung 33: Strategie für die Produktion der Protein-Domäne von chTMPRSS2 Exon 8 bis 14**

Die verkürzte Protein-Domäne des chTMPRSS2 hat ein Gewicht von 31,51 kDa und besitzt ebenfalls einen N-terminalen His-Tag, welcher die Aufreinigung über die Ni-NTA Säule ermöglicht. Dieser Tag wurde bei der Klonierung artifiziell an das Polypeptid geknüpft. Die verkürzte Protein-Domäne besteht aus einem Abschnitt der SRCR und der Serinprotease-Domäne. Dabei fehlt die kurze zytoplasmatische Domäne, die Transmembran-Domäne und die LDLRA-Domäne. Abbildung des vollständigen TMPRSS2 wurde basierend auf [117, 134] erstellt. Die Abbildung wurde mit BioRender erstellt und ist nicht maßstabsgetreu.

Im ersten Schritt der Klonierung wurde die cDNA von Exon 8 bis 14 mit den Primern 1289 und 1006 amplifiziert (siehe 3.3.4, Tabelle 55). Das aufgereinigte PCR-Produkt (siehe 3.3.6.1) wurde anschließend in das pET45b(+)-Backbone über die BamHI Schnittstelle (siehe Tabelle 57) mithilfe des Gibson-Assemblies kloniert (siehe 3.4.2). Aus 4 Klonen wurde das Plasmid isoliert (siehe 3.4.7) und in einem Kontrollverdau mit BamHI analysiert (siehe 3.4.9), bei dem alle getesteten Proben die erwarteten Banden bei 5260 bp und 808 bp zeigten (siehe Abbildung 34). Klon 4 wurde per Sanger-Sequenzierung (siehe 3.4.10) überprüft und final bestätigt (Daten nicht gezeigt). Abschließend wurde dieses Plasmid in den Bakterienstamm *E. Coli BL21(DE3)* transformiert (siehe 3.4.4).



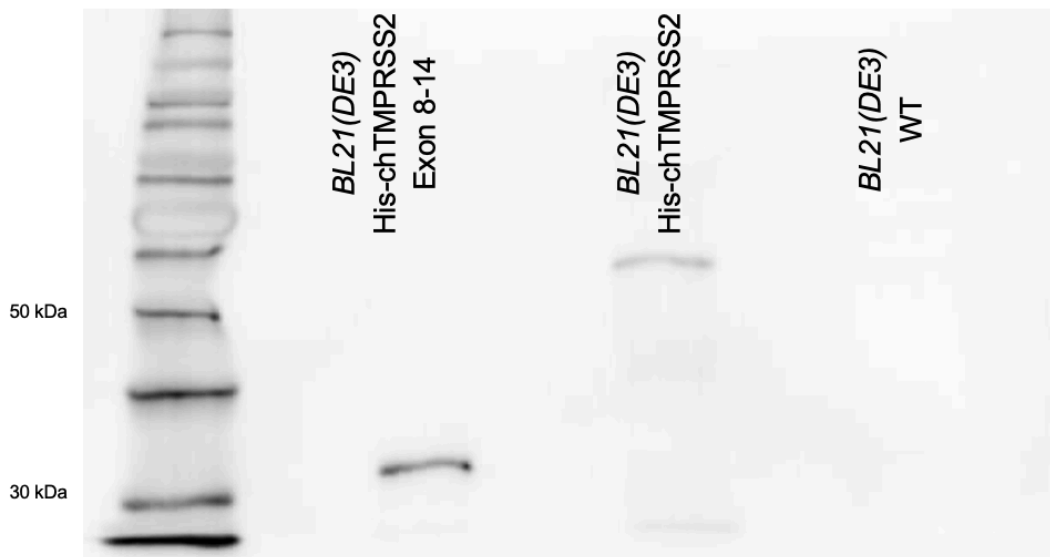


**Abbildung 34: Klonierung des pET45b(+)-*chTMPRSS2*-Exon8-14 Konstrukts**

Die cDNA wurde von Exon 8 bis 14 mit den Gibson-Primern 1289 und 1006 amplifiziert und anschließend in das aufgereinigte pET45b(+)-Backbone über die BamHI Schnittstelle kloniert. Anschließend wurde ein Kontrollverdau ebenfalls mit BamHI gemacht. Dabei zeigte die obere Bande bei 5260 bp das pet45b(+)-Backbone und die untere Bande bei 808 bp Exon 8-14 von *chTMPRSS2*. Über die Sanger-Sequenzierung mit den Primern 861, 862 und 28 konnte Klon 4 bestätigt werden, welcher anschließend in *E. Coli BL21(DE3)* transformiert wurde.

#### 4.3.4. Produktion und Aufreinigung der *chTMPRSS2*-SCRC-Serinprotease-Domäne (Exon 8 bis 14) aus *E. Coli BL21(DE3)* unter der Verwendung eines N-terminalen His-Tags

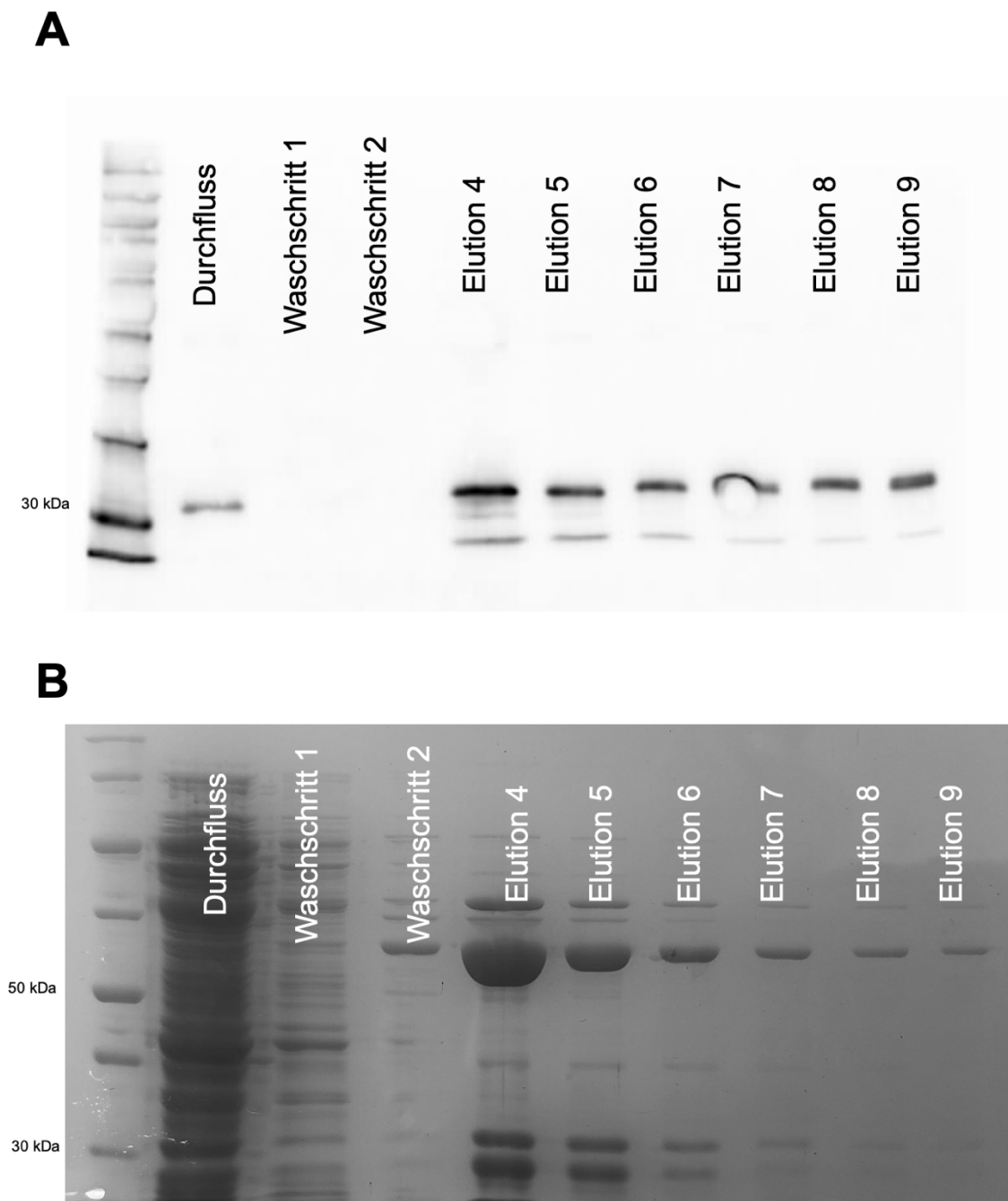
Im ersten Schritt wurde die erfolgreiche Expression der Proteindomäne im Bakterien-Lysat mithilfe eines Western Blots über den direkt-konjugierten, monoklonalen anti-His-HRP-Antikörper bestätigt. Als Positivkontrolle diente dabei das Lysat der *E. Coli BL21(DE3)*, welche das komplette Protein mit dem N-terminalen His-Tag exprimierten, und als Negativkontrolle wurde das Lysat der nicht transformierten, WT-*E. Coli BL21(DE3)* verwendet. Die Protein-Domäne hatte mit dem N-terminalen His-Tag ein Gewicht von 31,51 kDa, wohingegen das komplette Protein mit dem Tag ein Gewicht von 55,84 kDa aufwies. Im Lysat der nicht transformierten, WT-*E. Coli BL21(DE3)* konnte kein Protein mit einem His-Tag nachgewiesen werden, wodurch eine unspezifische Bindung des Antikörpers und dadurch ein falsch-positives Ergebnis ausgeschlossen werden konnte. Mit diesem Western Blot konnte gezeigt werden, dass His-*chTMPRSS2* mit einem Gewicht von 55,84 kDa und auch die Protein-Domäne His-*chTMPRSS2*-Exon 8-14 mit einem Gewicht von 31,51 kDa spezifisch in dem Bakterienstamm exprimiert wurde und für die Aufreinigung des gewünschten Proteins verwendet werden kann (siehe Abbildung 36).



**Abbildung 35: Nachweis der erfolgreichen Expression von His-chTMPRSS2-Exon8-14 im Western Blot**

Der Western Blot mit dem direkt konjugierten, monoklonalen His-Antikörper-HRP zeigte bei 31,51 kDa eine Bande für die Probe *E. Coli BL21(DE3) chTMPRSS2-Exon8-14*, wohingegen die Probe *E. Coli BL21(DE3) chTMPRSS2* eine Bande bei 55,84 kDa hatte. Um eine unspezifische Produktion auszuschließen, wurde ebenfalls eine *E. Coli BL21(DE3) WT* Lysat aufgetragen, welche keine Bande zeigte. Dadurch konnte eine spezifische Proteinproduktion bestätigt werden.

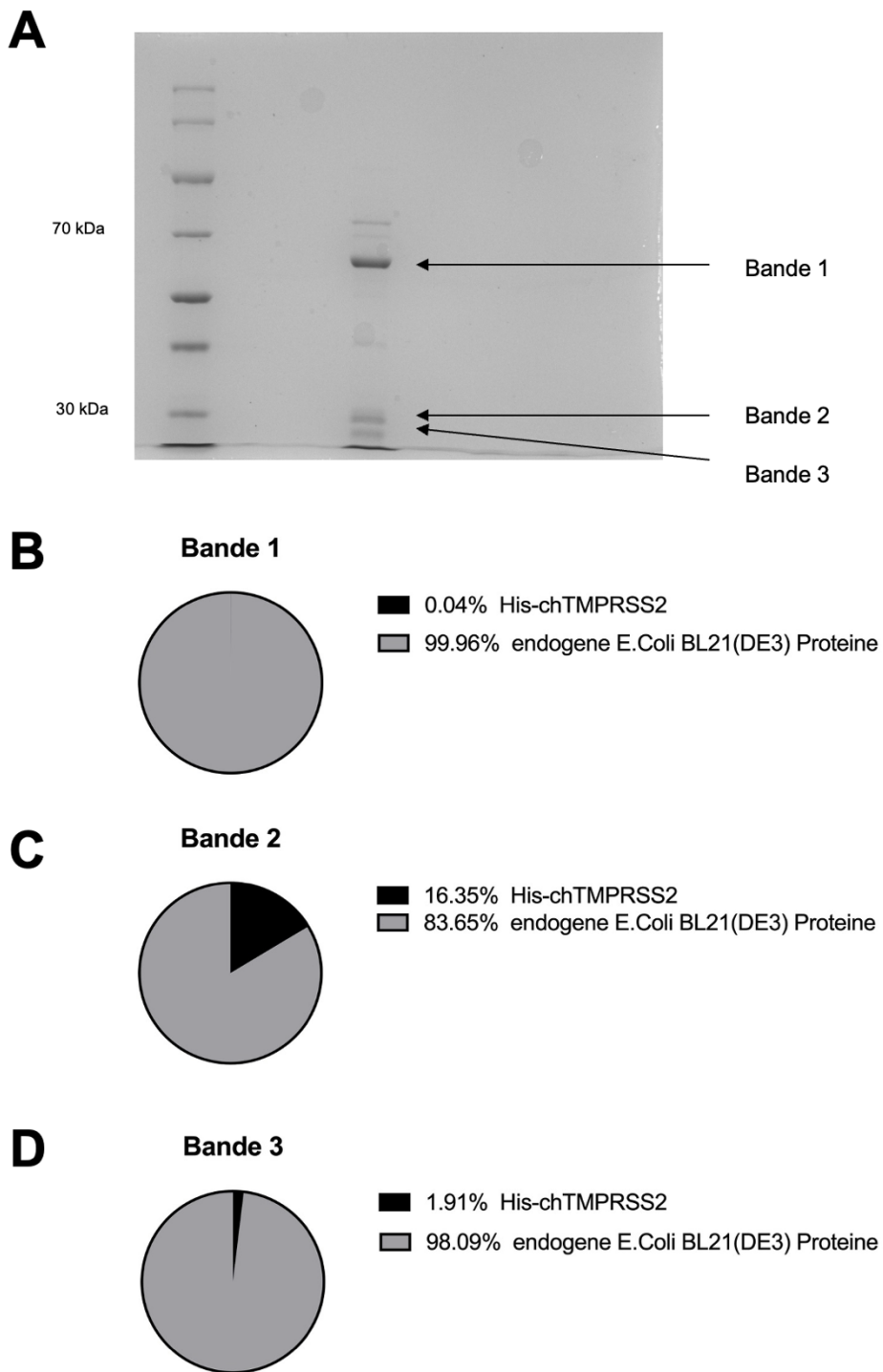
Anschließend erfolgte die erste Aufreinigung des His-chTMPRSS2-Exon8-14 (siehe 3.8). Dafür sollten die gleichen Reaktionsbedingungen, wie bei der Aufreinigung des His-chTMPRSS2 (siehe 4.3.2) genutzt werden. Bei der ersten Aufreinigung der Protein-Domäne His-chTMPRSS2 Exon 8-14 wurde die Reaktionsbedingung 2 getestet (siehe Tabelle 91). Diese Reaktionsbedingung wurde auch für die finale Proteinproduktion in einer größeren Kultur verwendet. Die Eluate, welche aus einer 0,5 L Kultur aufgereinigt wurden (siehe 3.8), wurden zuerst erneut im Western Blot getestet (siehe 3.9.2, Abbildung 36 A) und anschließend wurden die Fraktionen aus einer 4 L Kultur (siehe 3.8) im SDS- Coomassie-Brilliant Blue R-250-Gel (siehe Abbildung 36 B) analysiert. Die nachfolgende Abbildung 36 fasst die Ergebnisse des Western Blots und der Coomassie-Brilliant Blue R-250-Färbung zusammen. Im Western Blot konnte das His-chTMPRSS2-Exon 8-14 spezifisch über den anti-His-HRP-Antikörper im Durchfluss und in den Eluaten 4 bis 9 mit einem Gewicht von 31,51 kDa nachgewiesen werden. In der Coomassie-Brilliant Blue R-250-Färbung wurden in Elution 4 bis 9 zwischen 3 und 11 Banden nachgewiesen. Dabei gab es 3 vielversprechende Banden, eine Bande bei ca. 60 kDa, eine Bande knapp über 30 kDa und eine weitere mit einem Gewicht knapp unter 30 kDa.



**Abbildung 36: Western Blot Analyse und Coomassie-Brilliant Blue R-250-Färbung der aufgereinigten His-chTMPRSS2-Exon8-14 Proteinproben unter der Reaktionsbedingung 2**

**A** His-chTMPRSS2-Exon8-14 wurde aus 0,5 L *E. Coli BL21(DE3)* Kultur aufgereinigt und die gesammelten Proben aus dem Durchfluss, dem ersten und zweiten Waschschrift und die Eluate 4-9 wurden anschließend im Western Blot mit dem direkt konjugierten, monoklonalen His-Antikörper-HRP analysiert. Dabei zeigten der Durchfluss und alle Eluate die gewünschte Bande bei 31,51 kDa. **B** Dann wurde das Kulturvolumen von 0,5 L auf 4 L erhöht und die aufgereinigten Proben wurden in einem SDS- Coomassie-Brilliant Blue R-250- Gel analysiert. Dabei zeigten die analysierten Eluate ebenfalls eine Bande bei 31,51 kDa.

Um die spezifische Proteinproduktion zusätzlich zum Western Blot zu bestätigen, wurden 3 Banden aus dem Eluat 6 mit einem Skalpell ausgeschnitten und dann im MS durch das Bayerische Zentrum für Biomolekulare Massenspektrometrie analysiert (siehe 3.9.4). Die nachfolgende Abbildung 37 fasst die Probenvorbereitung und die Ergebnisse der MS-Analyse durch die Core Facility zusammen. Diese Analyse ergab, dass ausschließlich in der zweiten Bande His-chTMPRRS-Exon8-14 zu 16,4 % vorhanden war. In Bande 1 und 3 hatte die Serinprotease-Domäne mit dem N-terminalen His-Tag einen Anteil von nur 0,439 % bzw. 1,9 %. Bei den anderen Proteinen in den drei analysierten Proben handelte es sich um endogene Proteine von dem *E. Coli* BL21(DE3) Bakterienstamm. Nach diesem Ergebnis wurde die Protein-Produktion in *E. Coli* BL21(DE3) nicht weiterverfolgt.

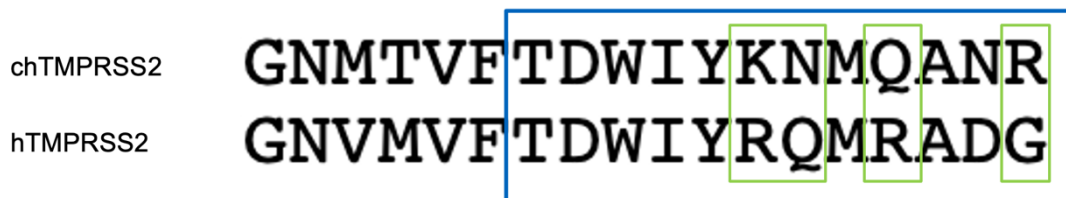


**Abbildung 37: MS-Analyse von His-chTMPRSS2-Exon8-14, Elution 6**

**A** Eluat 6 aus der 4 L *E. Coli BL21(DE3)* Kultur wurde erneut auf ein SDS- Coomassie-Brilliant Blue R-250-Gel geladen und anschließend wurden die drei, mit einem Pfeil markierten Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Proben-Vorbereitung wurde von mir, Sabrina Schleibinger, durchgeführt. **B-D** Die Banden wurden vom Bayerischen Zentrum für Biomolekulare Massenspektrometrie im MS analysiert und ausgewertet. Dabei konnte dann nachgewiesen werden, dass die erste Bande (**B**) nur einen His-chTMPRSS2-Exon8-14 Anteil von 0,04 %, die zweite Bande einen Anteil von 16,4 % (**C**) und die dritte Bande einen Anteil von 1,9 % hatte (**D**).

#### 4.4. Immunhistologische Detektion von chTMPRSS2

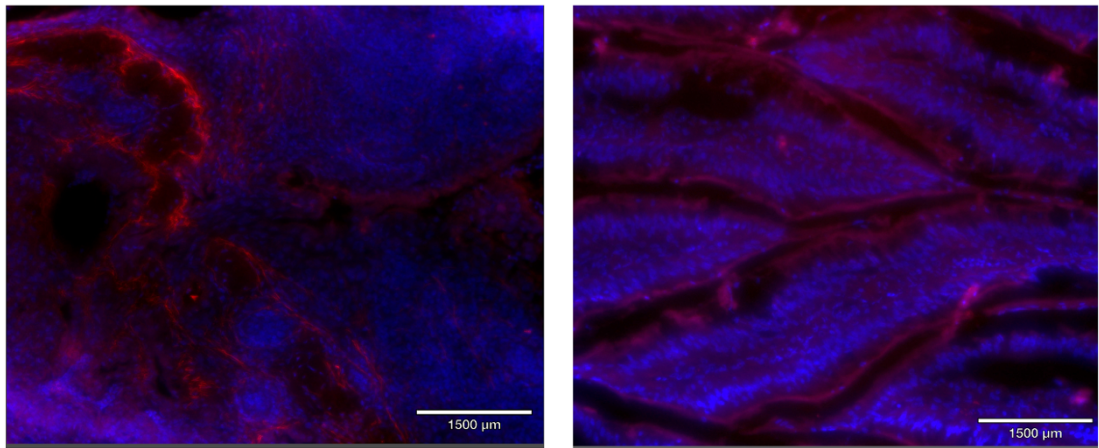
Da die Proteinproduktion des chTMPRSS2 bzw. chTMPRSS-Exon8-14 nicht erfolgreich war (siehe 4.3.2, 4.3.4) und kein polyklonales anti-chTMPRSS2-Serum in Kaninchen produziert werden konnte, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein polyklonaler anti-hTMPRSS2-Antikörper in Doudenum, Lunge und Brustmuskel im Huhn getestet. Die Organe wurden von einem männlichen WT-Tier in einem Alter von 14 Tagen für die Cryohistologie gesammelt. In diesem Zusammenhang diente der Brustmuskel als Negativkontrolle und in der Lunge und im Duodenum wurde eine positive Färbung erwartet, da TMRPRSS2 vor allem im Urogenital-, Verdauungs- und Atmungsapparat exprimiert ist [127], was auch in der RT-PCR fürs Huhn bestätigt werden konnte (siehe 4.1). Das verwendete Peptid des hTMPRSS2, welches für die Immunisierung der Ziegen genutzt wurde, wies zum chTMPRSS2 eine Homologie von 64 % auf (siehe Abbildung 38).



**Abbildung 38: Homologie des humanen Antigens zur Proteinsequenz im Huhn**

Das humane Peptid mit einer Länge von 12 AS wies eine Homologie zur Sequenz des chTMPRSS2 von 64 % auf. Die Sequenz des für die Immunisierung verwendete Peptid ist blau umrandet. Die AS, welche sich zwischen den beiden Spezies unterschieden, sind in grün hervorgehoben.

Dabei konnte gezeigt werden, dass ein goat-anti-hTMPRSS2-Antikörper in der Kombination mit dem mouse-anti-goat IgG-CFL 594 im Huhn (siehe Tabelle 53) in der Immunfluoreszenz-Färbung funktioniert. Die Zellkerne des jeweiligen Gewebes wurde mit DAPI gefärbt und die TMPRSS2-spezifische Färbung konnte in der Lunge und im Duodenum nachgewiesen werden. Die jeweils ungefärbte Probe und die Probe, welche nur mit dem sekundären mouse-anti-goat IgG-CFL 594 gefärbt wurde, wiesen kein positives Signal auf, wodurch ein falsch-positives Ergebnis ausgeschlossen werden kann (siehe Abbildung 39).

**A**

Lunge

Darm

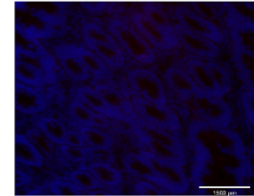
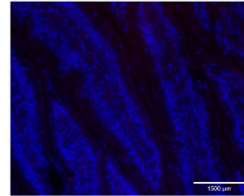
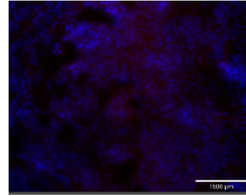
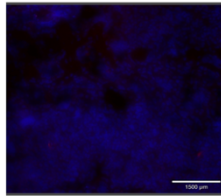
**B**

Sec. only

Negativkontrolle

Sec. only

Negativkontrolle



Lunge

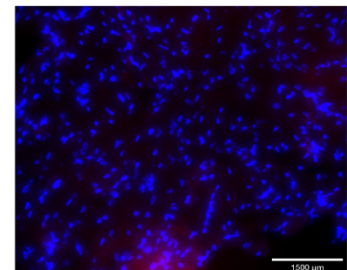
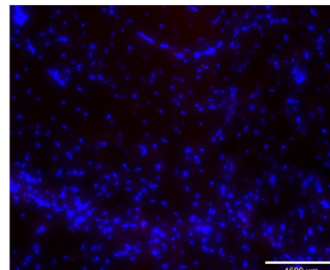
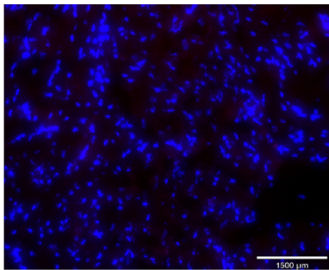
Darm

**C**

TMPRSS2

Sec. only

Negativkontrolle



Brustmuskel

**Abbildung 39: Immunfluoreszenz-Färbungen mit einem humanen TMPRSS2-Antikörper im Hühner-Gewebe**

**A** Die erfolgreiche Färbung des chTMPRSS2 konnte in der Lunge und im Duodenum erfolgreich über den goat-anti-hTMPRSS2 Antikörper und im zweiten Schritt über den mouse-anti-goat IgG-CFL 594 nachgewiesen werden. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. **B** Die verwendeten Kontrollen in Lunge und Brustmuskel (sec. only, ungefärbt) waren negativ. **C** Sowohl die Färbung des Brustmuskels, aber auch die verwendeten Kontrollen zeigte keine positive Färbung. Für das Testen des Antikörpers wurden die Organe eines Tiers genommen und für die Färbung verwendet.

#### 4.5. Blockieren der Serinprotease-Aktivität mittels der Inhibitoren Aprotinin und Camostatmesilat

##### 4.5.1. Herstellung von H1N1, H9N2 und H6N8-Virenstocks mit ungespaltenem HA0

Für die Herstellung eines Virus mit ungespaltenem HA0 wurden MDCK-Zellen verwendet, wie Böttcher-Friebertshauer *et. al* 2010 beschrieben haben [28] (siehe 3.5.1). Wie in Tabelle 92 zusammengefasst, konnte ein Titer von 27.800.000 FFU/ml für H1N1, von 210.000 FFU/ml für H9N2 und von 65.000 FFU/ml für H6N8 ermittelt werden.

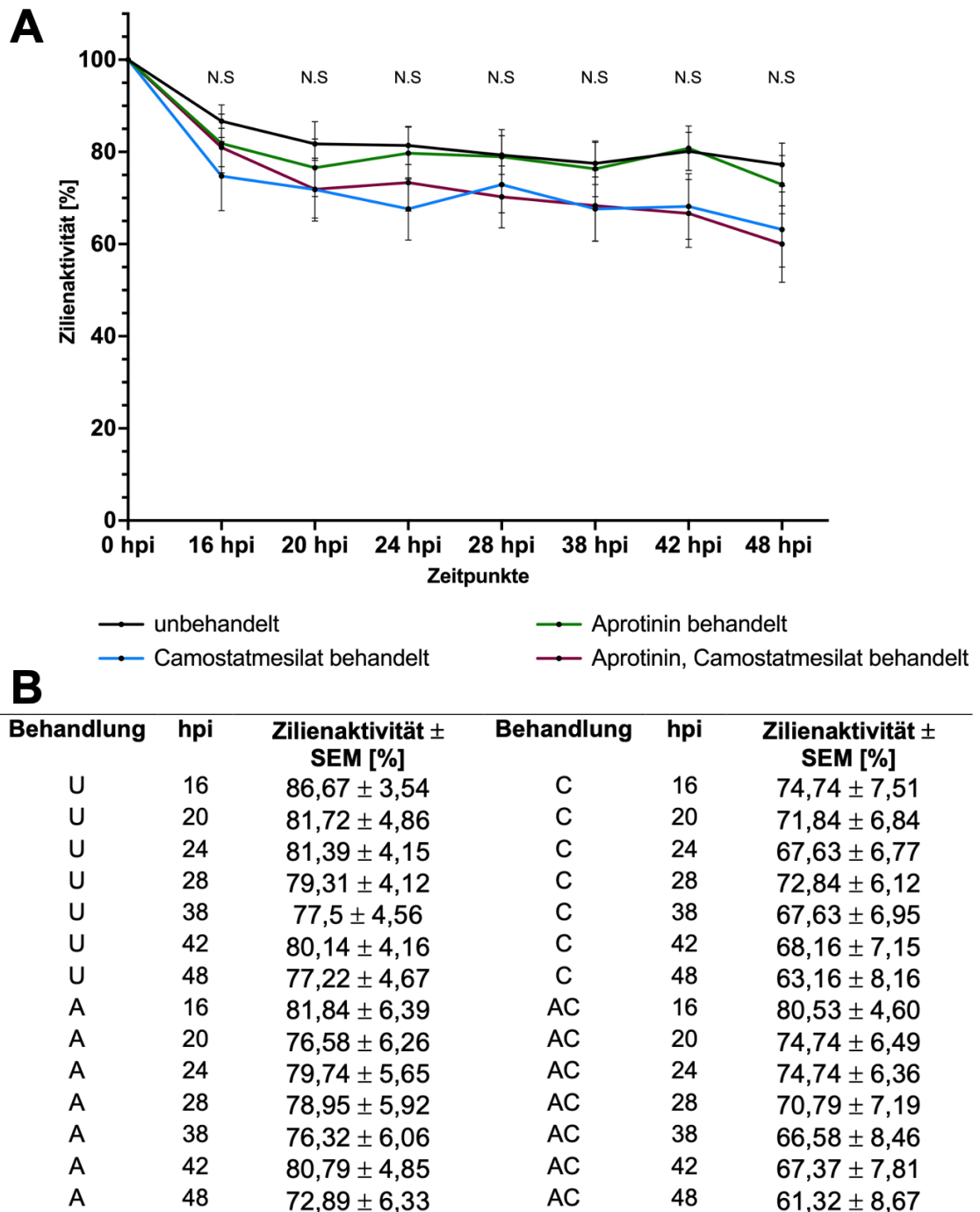
**Tabelle 92: Virustiter mit ungespaltenem HA0**

<b>Virus-Stamm</b>	<b>Titer [FFU/μl]</b>
H1N1	27.800.000
H9N2	210.000
H6N8	65.000

##### 4.5.2. Kein negativer Effekt auf die Zilienaktivität in den TOCs durch die Behandlung mit den Serinprotease-Inhibitoren Aprotinin und Camostatmesilat

Im ersten Schritt wurde der Effekt der Serinprotease-Inhibitoren Aprotinin und Camostatmesilat auf die Zilienaktivität 16, 20, 24, 28, 38, 42 und 48 h nach der Behandlung analysiert (siehe Abbildung 40). Dabei wiesen die unbehandelten TOCs im Mittelwert eine Zilienaktivität von 81,39 % ( $\pm 4,15$ ) 24 h und von 77,22 % ( $\pm 4,67$ ) 48 h nach der Behandlung auf. Die Aprotinin-behandelten Proben hatten eine Zilienaktivität von 79,74 % ( $\pm 5,65$ ) 24 h und von 72,89 % ( $\pm 6,33$ ) 48 h nach der Behandlung. Die Camostatmesilat-behandelten Proben zeigten nach 24 h eine Zilienaktivität von 67,63 % ( $\pm 6,77$ ) und 48 h nach der Behandlung eine von 63,16 % ( $\pm 8,16$ ). Die Proben, welche mit beiden Inhibitoren behandelt wurden, wiesen eine Zilienaktivität von 74,74 % ( $\pm 6,36$ ) 24 h und von 61,32 % ( $\pm 8,67$ ) 48 h nach der Behandlung auf. Dabei unterschied sich die Zilienaktivität der einzelnen Gruppen innerhalb eines Zeitpunktes nicht signifikant.



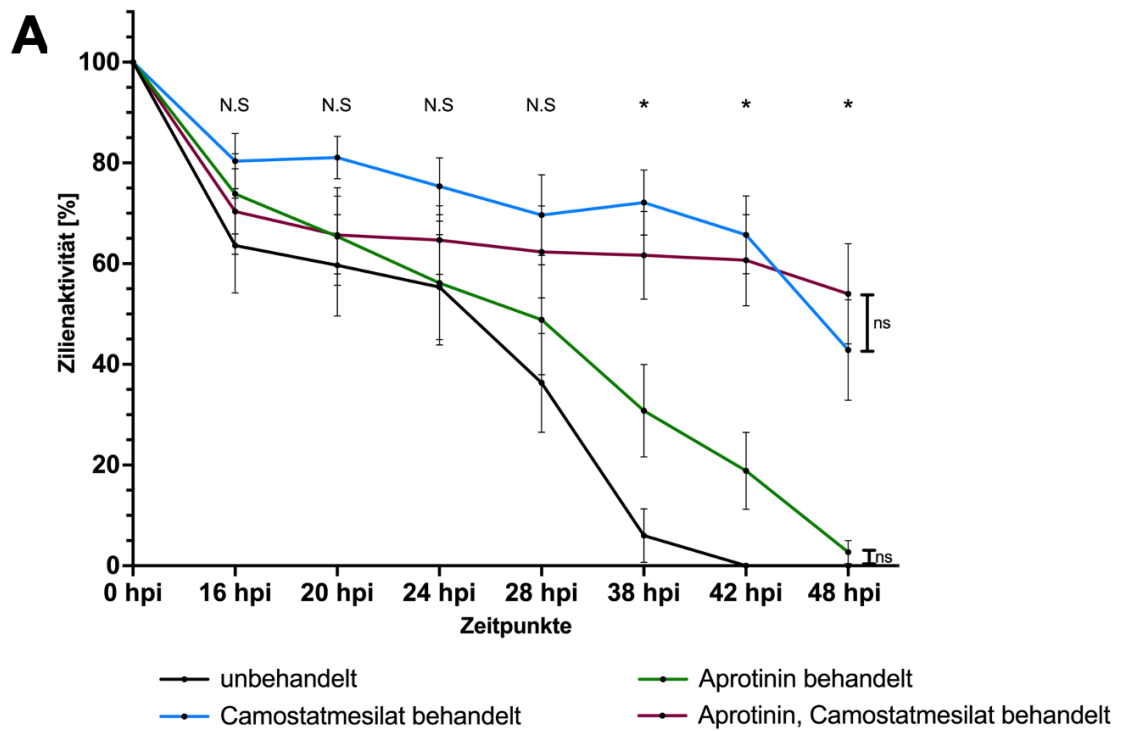


**Abbildung 40: Analyse der Zilienaktivität nicht-infizierter TOCs nach einer Aprotinin oder Camostatmesilat-Behandlung**

**A** Die Zilienaktivität zwischen den unbehandelten (schwarz), Aprotinin-behandelten (grün) und Camostatmesilat-behandelten (blau) TOCs sowie den Proben, welche mit beiden Inhibitoren behandelt (lila) wurden, wurde zwischen 16 und 48 h nach der Behandlung verglichen. Dabei waren keine signifikanten Unterschiede ( $n \geq 19$ , Kruskal-Wallis Test) nachweisbar. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. **B** In der Tabelle wurden die Zilienaktivitäten der unbehandelten (U), der Aprotinin-behandelten (A), der Camostatmesilat-behandelten (C) TOCs und der Proben, welche mit Aprotinin und Camostatmesilat (AC) behandelt wurden, mit den Standardfehlern in Prozent zusammengefasst.

#### 4.5.3. Camostatmesilat schützt die TOCs effektiver als Aprotinin während einer H9N2-Infektion mit ungespaltenem HA0

Nachdem bestätigt werden konnte, dass die Inhibitor-Behandlung keine negativen Effekte auf die Zilienaktivität der TOCs hat (siehe 4.5.2), wurde der Effekt von Aprotinin und Camostatmesilat im Zusammenhang einer H9N2 Infektion mit ungespaltenem HA0 (siehe 4.5.1, Tabelle 92) in TOCs analysiert. Die nachfolgende Abbildung 41 zeigt die Zilienaktivität 16, 20, 24, 28, 38, 42 und 48 hpi. Alle Proben wiesen eine Aktivität von 100 % zum Zeitpunkt der Infektion auf. Die unbehandelten Proben hatten eine Aktivität von 55,33 % ( $\pm 10,43$ ) 24 hpi und eine von 0 % 48 hpi. Die Proben, welche mit Aprotinin behandelt wurden, wiesen eine Zilienaktivität von 56,15 % ( $\pm 12,29$ ) 24 hpi und eine von 2,69 % ( $\pm 2,31$ ) 48 hpi auf. Die Camostatmesilat-behandelten Proben wiesen eine Aktivität von 75,36 % ( $\pm 5,66$ ) 24 hpi und eine von 42,86 % ( $\pm 10,0$ ) 48 hpi auf. Die Proben, welche mit beiden Inhibitoren behandelt wurden, hatten eine Zilienaktivität von 64,67 % ( $\pm 6,82$ ) 24 hpi und von 54,0 % ( $\pm 9,95$ ) 48 hpi. Dabei unterschied sich die Zilienaktivität der einzelnen Gruppen innerhalb der Zeitpunkte 16, 20, 24 und 28 hpi nicht signifikant. 38, 42 und 48 hpi wurde ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) in der Zilienaktivität der unbehandelten bzw. Aprotinin-behandelten TOCs und der Camostatmesilat-behandelten Proben bzw. der Proben, welche mit beiden Inhibitoren behandelt wurden, nachgewiesen (siehe Abbildung 41).



**B**

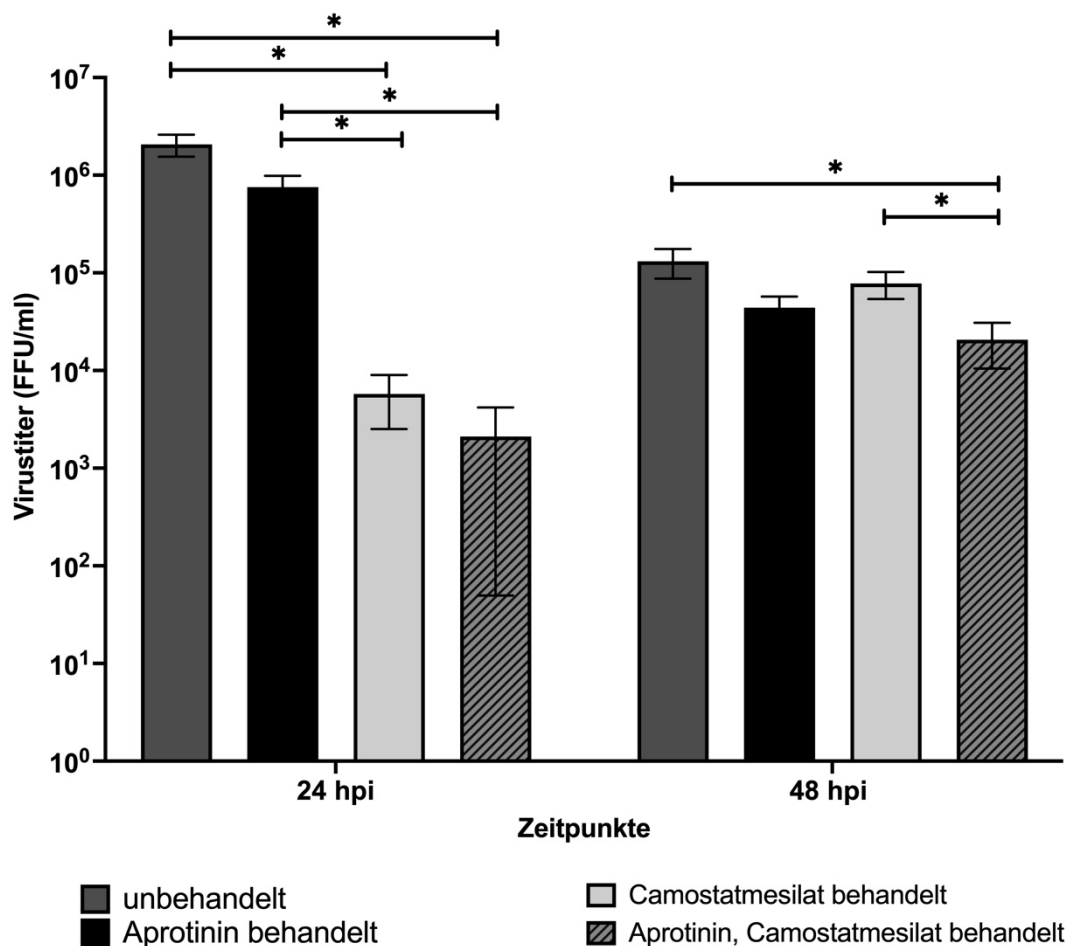
Behandlung	hpi	Zilienaktivität ± SEM [%]	Behandlung	hpi	Zilienaktivität ± SEM [%]
U	16	63,6 ± 9,42	C	16	80,36 ± 5,48
U	20	59,67 ± 10,04	C	20	81,07 ± 4,20
U	24	55,33 ± 10,43	C	24	75,36 ± 5,66
U	28	36,33 ± 9,81	C	28	69,64 ± 7,99
U	38	6,0 ± 5,30	C	38	72,14 ± 6,46
U	42	0	C	42	65,71 ± 7,72
U	48	0	C	48	42,86 ± 10,0
A	16	73,85 ± 7,95	AC	16	70,33 ± 8,50
A	20	65,38 ± 9,67	AC	20	65,67 ± 7,74
A	24	56,15 ± 12,29	AC	24	64,67 ± 6,82
A	28	48,85 ± 10,91	AC	28	62,33 ± 9,14
A	38	30,77 ± 9,18	AC	38	61,67 ± 8,72
A	42	18,85 ± 7,64	AC	42	60,67 ± 9,05
A	48	2,69 ± 2,31	AC	48	54,0 ± 9,95

Abbildung 41: Zilienaktivität bei der Infektion der TOCs mit H9N2 und ungespaltenem HA0

**A** Die Zilienaktivität zwischen den unbehandelten (schwarz), Aprotinin-behandelten (grün) und Camostatmesilat-behandelten (blau) TOCs sowie den Proben, welche mit beiden Inhibitoren behandelt (lila) wurden, wurde zwischen 16 und 48 hpi nach einer H9N2 Infektion mit ungespaltenem HA0 verglichen. Dabei waren keine signifikanten Unterschiede 16, 20, 24 und 28 hpi ( $n \geq 13$ , Kruskal-Wallis Test) nachweisbar. Die Zilienaktivität unterschied sich 38, 42 und 48 hpi signifikant ( $n \geq 13$ ,  $p < 0,05$ , Kruskal-Wallis Test) zwischen den unbehandelten bzw. Aprotinin-behandelten TOCs und den Camostatmesilat-behandelten Proben bzw. zwischen den Proben, welche mit beiden Inhibitoren behandelt wurden. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. **B** In der Tabelle wurden die Zilienaktivitäten der unbehandelten (U), der Aprotinin-

behandelten (A), der Camostatmesilat-behandelten (C) TOCs und der Proben, welche mit Aprotinin und Camostatmesilat (AC) behandelt wurden, mit den Standardfehlern in Prozent zusammengefasst.

Bei der Bestimmung des Virustiters im Überstand der Proben zeigten die unbehandelten Proben einen Titer von  $2,1 \times 10^6$  FFU/ml ( $\pm 5,2 \times 10^5$ ) 24 hpi und einen Titer von  $1,3 \times 10^5$  FFU/ml ( $\pm 4,4 \times 10^4$ ) 48 hpi. Die Aprotinin-behandelten Proben wiesen 24 hpi einen Titer von  $7,5 \times 10^5$  FFU/ml ( $\pm 2,3 \times 10^5$ ) und 48 hpi einen Titer von  $4,4 \times 10^4$  FFU/ml ( $\pm 1,3 \times 10^4$ ) auf. Bei den unbehandelten und Aprotinin-behandelten Proben sank der Titer nach 48 hpi im Vergleich zur Virustiter nach 24 hpi ab. Die Camostat-behandelten Proben und die Proben, welche mit beiden Inhibitoren behandelt wurden, zeigten ein gegenteiliges Muster. Dabei war der Titer 24 hpi bei den Camostat-behandelten Proben bei  $5,8 \times 10^3$  FFU/ml ( $\pm 3,2 \times 10^3$ ) und bei den Proben, welche mit beiden Inhibitoren behandelt wurden, bei  $2,1 \times 10^3$  FFU/ml ( $\pm 2,1 \times 10^3$ ). Anschließend stieg der Titer aber anders als bei den unbehandelten und Aprotinin-behandelten Proben auf  $7,8 \times 10^4$  FFU/ml ( $\pm 2,4 \times 10^4$ ) bei den Camostat-behandelten Proben und auf  $2,1 \times 10^4$  FFU/ml ( $\pm 1,0 \times 10^4$ ) 48 hpi bei den Aprotinin- und Camostatmesilat-behandelten Proben. Dabei unterschied sich 24 hpi der Titer zwischen den unbehandelten Proben und den Camostatmesilat-behandelten sowie den TOCs, welche mit beiden Inhibitoren behandelt wurden, signifikant ( $p < 0,05$ ). Außerdem war ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) zum gleichen Zeitpunkt zwischen den Aprotinin-behandelten Proben und den TOCs, welche entweder nur mit Camostatmesilat oder mit beiden Inhibitoren behandelt wurden, nachweisbar. 48 hpi konnte ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) in den Titern der unbehandelten Proben und der TOCs, welche mit beiden Inhibitoren behandelt wurden, bestimmt werden. Der Titer der Camostatmesilat-behandelten Proben unterschieden signifikant ( $p < 0,05$ ) von dem der Proben, welche mit beiden Inhibitoren behandelt wurde (siehe Abbildung 42).

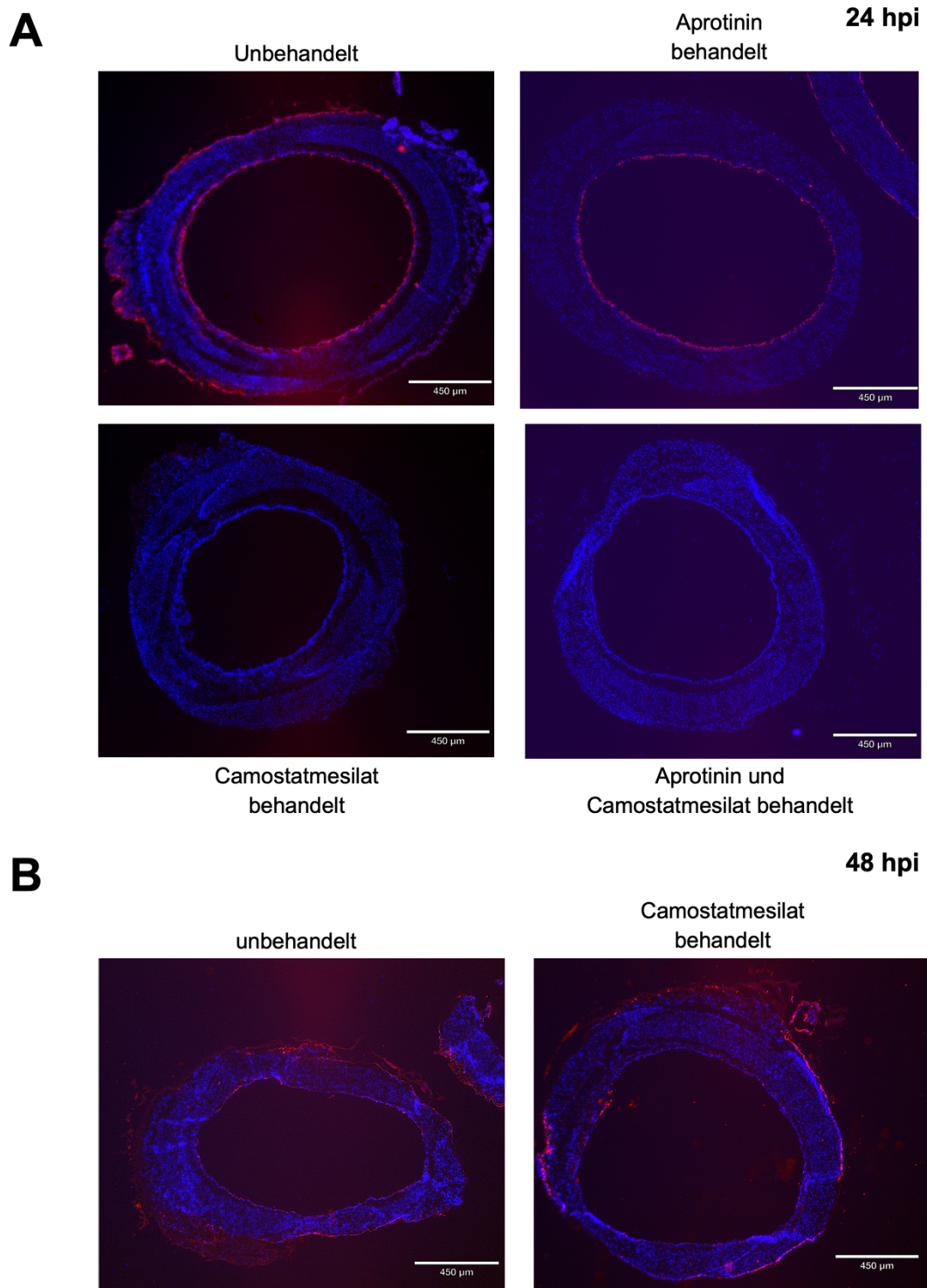


**Abbildung 42: Virustiter bei der Infektion der TOCs mit H9N2 und ungespaltenem HA0**

Der Virustiter zwischen den unbehandelten, Aprotinin-behandelten und Camostatmesilat-behandelten TOCs sowie den Proben, welche mit beiden Inhibitoren behandelt wurden, wurde 24 hpi und 48 hpi nach einer H9N2 Infektion mit ungespaltenem HA0 verglichen. Dabei konnte ein signifikanter Unterschied ( $n \geq 12$ ,  $p < 0,05$ , Kruskal-Wallis Test) zwischen den unbehandelten bzw. Aprotinin-behandelten TOCs und den Camostatmesilat-behandelten Proben sowie zwischen den Proben, welche mit beiden Inhibitoren behandelt wurden, 24 hpi nachgewiesen werden. Außerdem gab es einen signifikanten Unterschied ( $n \geq 12$ ,  $p < 0,05$ , Kruskal-Wallis Test) zwischen den unbehandelten TOCs und den TOCs, welche mit beiden Inhibitoren behandelt wurden und letzteren TOCs und den Camostatmesilat-behandelten Proben 48 hpi. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an.

Zusätzlich zur Analyse der Zilienaktivität und der Bestimmung des Virustiters im Überstand der TOCs wurden die Proben 24 und 48 hpi mit einer Immunfluoreszenz-Färbung auf das Influenza-A-Virus gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. In den unbehandelten und Aprotinin-behandelten Proben konnten 24 hpi virus-infizierte Zellen nachgewiesen werden, wohingegen keine oder nur vereinzelt virus-infizierte Zellen in den Camostatmesilat-behandelten Proben oder in den TOCs, welche mit beiden Inhibitoren behandelt wurden, detektiert wurden. 48 hpi waren ebenfalls die unbehandelten TOCs fast vollständig infiziert, wohingegen in den Camostatmesilat-behandelten Proben nur

einzelne Zellen positiv auf Influenza-A-Virus gefärbt werden konnten (siehe Abbildung 43).



**Abbildung 43: Immunfluoreszenz-Färbung der TOCs gegen das Influenza-A-Viren im Zusammenhang einer H9N2 Infektion mit ungespaltenem HA0**

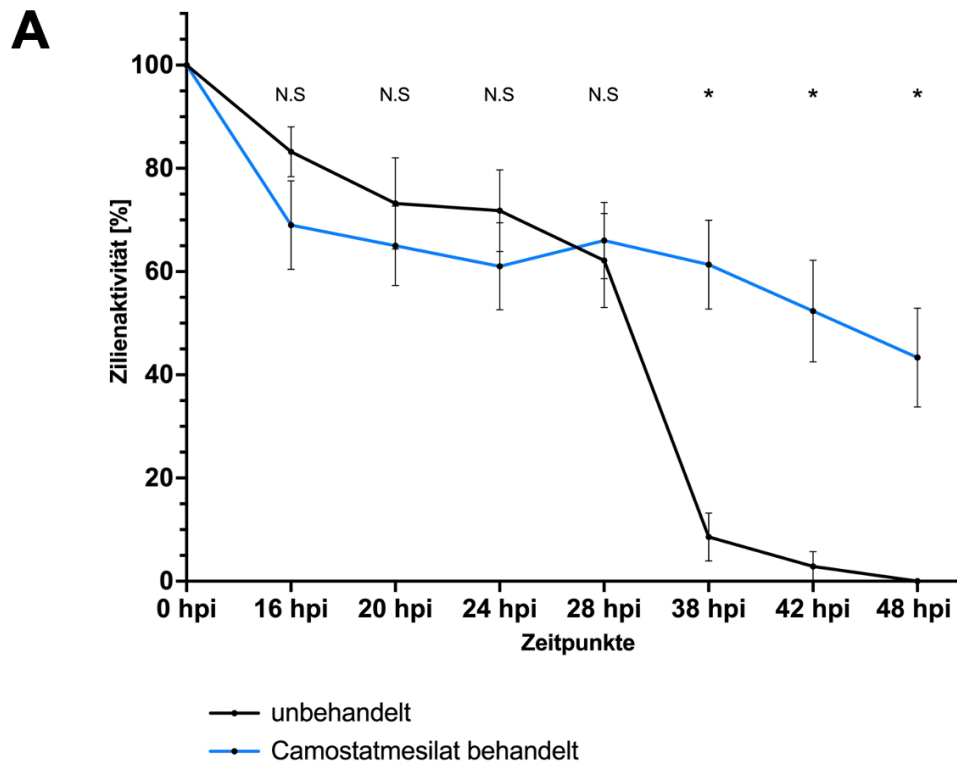
A 24 hpi wurden die unbehandelten, die Aprotinin-behandelten und die Camostatmesilat-behandelten TOCs sowie die Proben, welche mit Aprotinin und Camostatmesilat behandelt wurden, für die Cryohistologie weggefroren. Im Anschluss wurde die TOCs auf das Influenza-A-Virus in einer Immunfluoreszenz-

Färbung gefärbt. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI. **B** 48 hpi wurden die unbehandelten und Camostatmesilat-behandelten TOCs für die Cryohistologie weggefroren und anschließend in der Immunfluoreszenz-Färbung auf das Influenza-A-Virus gefärbt. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI. (für die unbehandelten TOCs, Camostatmesilat-behandelten TOCs – n = 3 (24, 48 hpi), für Aprotinin-behandelte TOCs und Proben, welche mit Aprotinin und Camostatmesilat behandelt wurden – n = 1 (24 hpi)). Die in dieser Abbildung verwendeten Bilder der unbehandelten und Camostatmesilat-behandelten TOCs 24 und 48 hpi wurden dabei repräsentativ für die weiteren biologischen Replikate ausgewählt.

Diese umfassende Analyse führt zu der Annahme, dass Aprotinin die TOCs nicht so effektiv gegen eine Influenza-A-Virus-Infektion schützte im Vergleich zu Camostatmesilat. Daher wurde sich in den folgenden Experimenten nur noch auf die unbehandelten Proben und die Proben, welche ausschließlich mit Camostatmesilat behandelt wurde, fokussiert.

#### 4.5.4. Camostatmesilat schützt die TOCs auch während einer H9N2 Infektionen mit gespaltenem HA

Im Anschluss wurde der Effekt des Inhibitors Camostatmesilat bei einer H9N2 Infektion mit gespaltenem HA untersucht. Auch in diesem Fall zeigte der Serinprotease-Inhibitor einen positiven Effekt auf die Zilienaktivität im Vergleich zur unbehandelten Gruppe. 16, 20, 24 und 28 hpi wies die Zilienaktivität der beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied auf. Im Gegensatz dazu unterschied sich die Zilienaktivität der behandelten TOCs 38 hpi, 42 hpi und 48 hpi signifikant ( $p < 0,05$ ) von den unbehandelten Proben. Wohingegen diese eine Zilienaktivität von 71,76 % ( $\pm 7,91$ ) 24 hpi und von 0 % 48 hpi hatten, wiesen die Camostatmesilat-behandelten Proben eine Aktivität von 65,36 % ( $\pm 7,95$ ) 24 hpi und von 46,42 % ( $\pm 9,74$ ) 48 hpi auf (siehe Abbildung 44).



**B**

Behandlung	hpi	Zilienaktivität ± SEM [%]	Behandlung	hpi	Zilienaktivität ± SEM [%]
U	16	83,21 ± 4,82	C	16	73,93 ± 7,54
U	20	73,21 ± 8,83	C	20	69,64 ± 6,56
U	24	71,76 ± 7,91	C	24	65,36 ± 7,95
U	28	62,14 ± 9,12	C	28	70,71 ± 6,13
U	38	8,57 % ± 4,64	C	38	65,71 ± 7,95
U	42	2,86 % ± 2,86	C	42	56,07 ± 9,81
U	48	0	C	48	46,42 ± 9,74

**Abbildung 44: Zilienaktivität bei der Infektion der TOCs mit H9N2 mit gespaltenem HA**

**A** Die Zilienaktivität zwischen den unbehandelten (schwarz) und Camostatmesilat-behandelten (blau) TOCs wurde zwischen 16 und 48 hpi nach einer H9N2 Infektion mit gespaltenem HA verglichen. Dabei waren keine signifikanten Unterschiede 16, 20, 24 und 28 hpi ( $n \geq 14$ , Mann-Whitney-U Test) nachweisbar. Die Zilienaktivität unterschied sich signifikant ( $n \geq 14$ ,  $p < 0,05$ , Mann-Whitney-U Test) zwischen den unbehandelten und Camostatmesilat-behandelten Proben 38, 42 und 48 hpi. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. **B** In der Tabelle wurden die Zilienaktivitäten der unbehandelten (U) und der Camostatmesilat-behandelten (C) TOCs mit den Standardfehlern in Prozent zusammengefasst.

Anschließend wurde ebenfalls der Titer der virus-infizierten TOCs der unbehandelten Proben und der TOCs, welche mit Camostatmesilat behandelt wurde, im Medium 24 und 48 hpi nach einer H9N2 Infektion mit gespaltenem HA bestimmt. Die unbehandelten TOCs wiesen einen Titer von  $4,3 \times 10^6$  FFU/ml ( $\pm 1,3 \times 10^6$ ) 24 hpi und von  $2,1 \times 10^5$  FFU/ml ( $\pm 4,7 \times 10^4$ ) 48 hpi auf. Im Gegensatz dazu hatten die TOCs, welche mit Camostatmesilat behandelt wurden, eine Virustiter von  $2,2 \times 10^4$  FFU/ml ( $\pm 1,7 \times 10^4$ ) 24 hpi und von



$1,2 \times 10^5$  FFU/ml ( $\pm 4,8 \times 10^4$ ). Dabei unterschied sich der Virustiter 24 hpi und 48 hpi zwischen den beiden Gruppen signifikant ( $p < 0,05$ ) voneinander (siehe Abbildung 45).

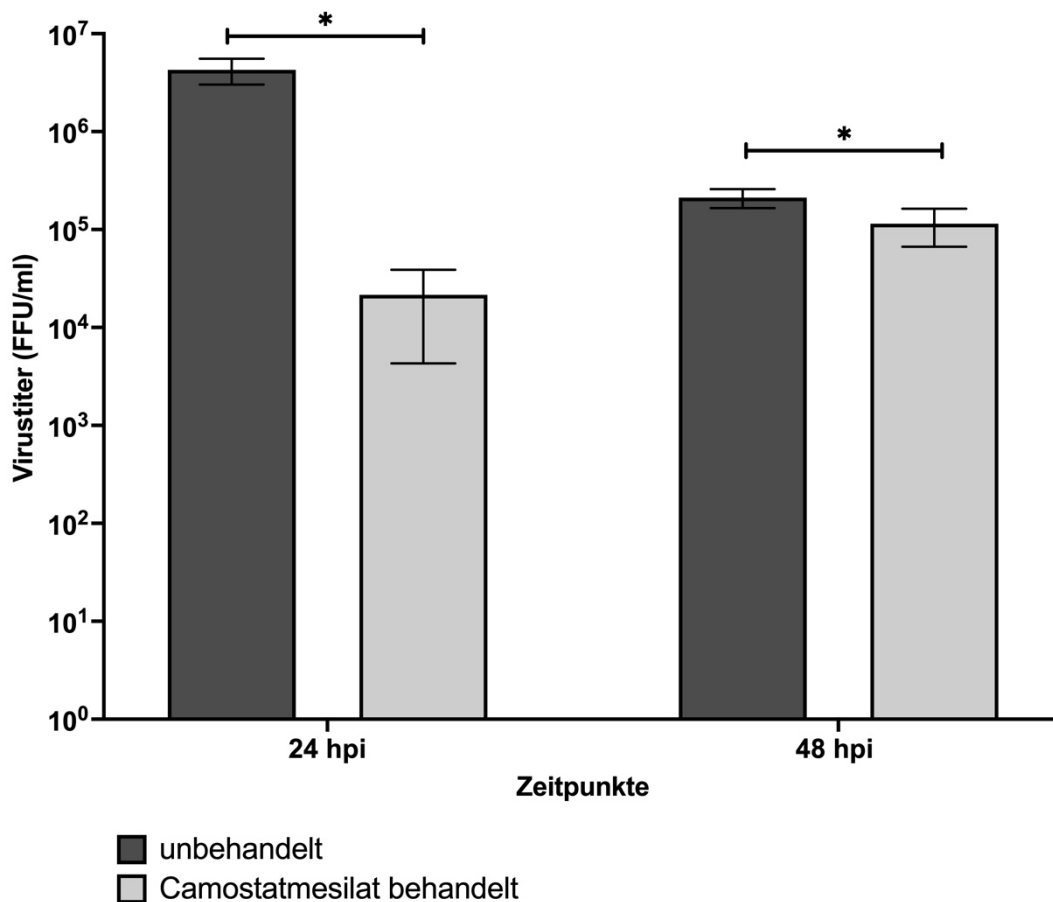


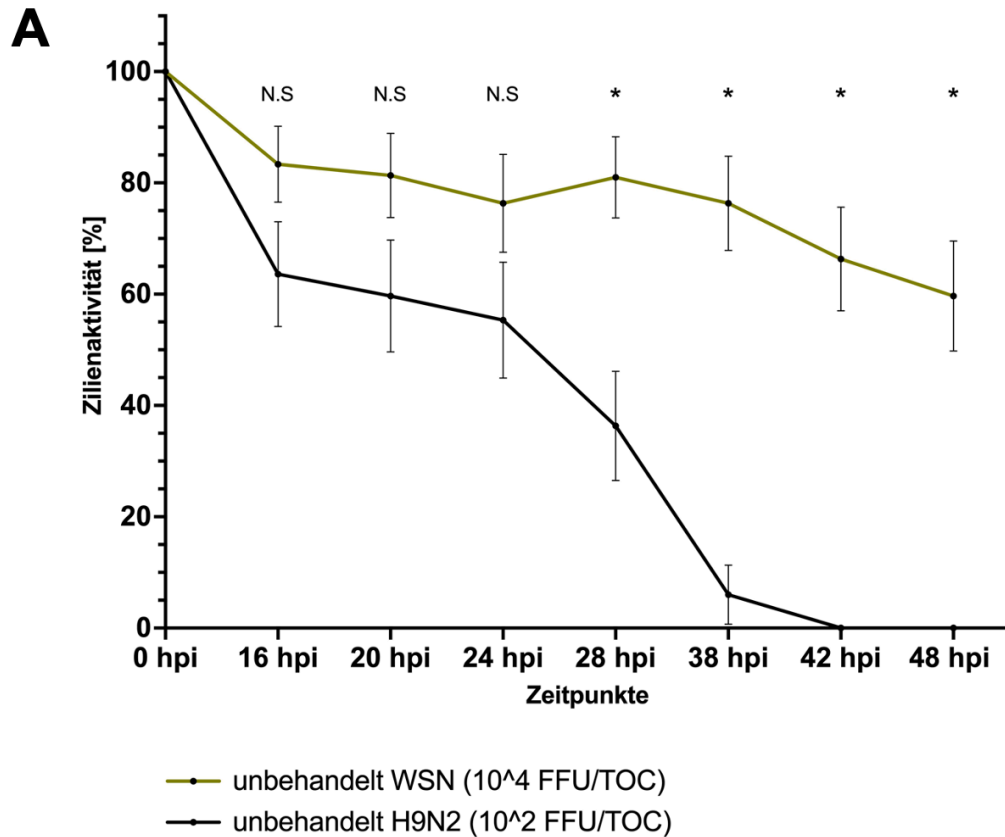
Abbildung 45: Virustiter bei der Infektion der TOCs mit H9N2 und gespaltenem HA

Der Virustiter zwischen den unbehandelten und Camostatmesilat-behandelten TOCs wurde 24 hpi und 48 hpi nach einer H9N2 Infektion mit gespaltenem HA verglichen. Dabei konnte ein signifikanter Unterschied ( $n \geq 13$ ,  $p < 0,05$ , Mann-Whitney-U Test) zwischen den unbehandelten und den Camostatmesilat-behandelten Proben zu beiden Zeitpunkten nachgewiesen werden. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an.

#### 4.5.5. H1N1 mit ungespaltenem HA0 kann die TOCs nicht so effektiv infizieren wie H9N2

In einem ersten Experiment mit H1N1, bei dem nur unbehandelte TOCs mit einer Virusdosis von  $10^4$  FFU/TOC infiziert wurden, sollte überprüft werden, ob und wie effektiv die Infektion stattfinden kann. Da H1N1 ein humaner Virus-Stamm im Gegensatz zu H9N2 und H6N8 ist, wurde auch diese höhere Infektionsdosis gewählt. Die untenstehende Abbildung 46 zeigt die Zilienaktivität unbehandelter TOCS zwischen 16 und 48 hpi nach einer H1N1-Infektion bzw. im Vergleich dazu nach einer H9N2 Infektion (siehe 4.5.3). Die unbehandelten TOCs, welche mit H1N1 mit der höheren Infektionsdosis infiziert wurden, wiesen eine Zilienaktivität von 76,33 % ( $\pm 8,79$ ) 24 hpi und eine von 59,67 %

( $\pm 9,87$ ) 48 hpi. Die Zilienaktivität der H1N1- bzw. H9N2 infizierten TOCs wies zwischen 16 und 24 hpi keinen signifikanten Unterschied auf, wobei die Zilienaktivität der H9N2-infizierten Proben 28, 38, 42 und 48 hpi signifikant niedriger ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zu den H1N1-infizierten TOCs war (siehe Abbildung 46).



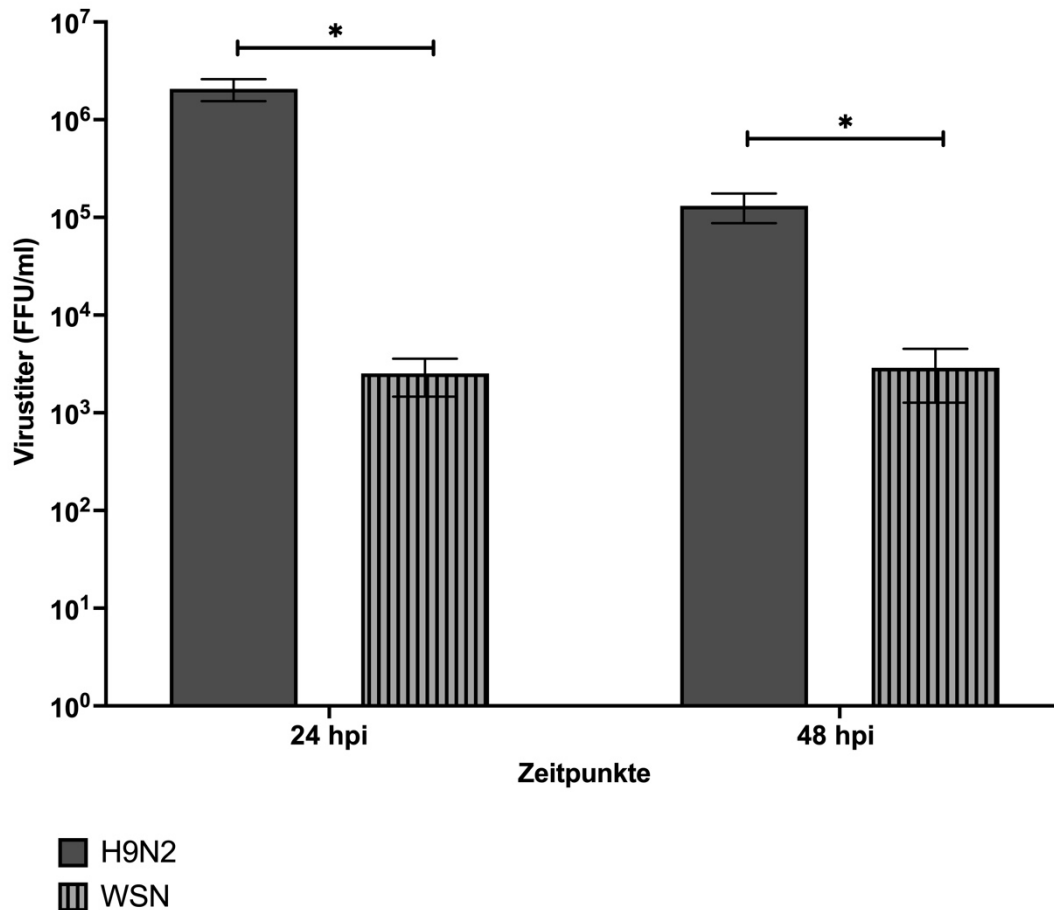
**B**

Behandlung	hpi	Zilienaktivität $\pm$ SEM [%]	Behandlung	hpi	Zilienaktivität $\pm$ SEM [%]
WSN	16	83,33 $\pm$ 6,83	WSN	38	76,33 $\pm$ 8,56
WSN	20	81,33 $\pm$ 7,55	WSN	42	66,33 $\pm$ 9,33
WSN	24	76,33 $\pm$ 8,79	WSN	48	59,67 $\pm$ 9,87
WSN	28	81,0 $\pm$ 7,31			

**Abbildung 46: Zilienaktivität bei der Infektion der TOCs mit 10<sup>4</sup> FFU/TOC WSN**

Die Zilienaktivität zwischen den H9N2 (schwarz) und H1N1 (olivgrün) -infizierten TOCs wurde zwischen 16 und 48 hpi aufgetragen. Die Virenstocks hatten dabei ungespaltenes HA0. Trotz der unterschiedlichen Infektionsdosis wurden die beiden Gruppen statistisch untersucht. Dabei waren kein signifikanter Unterschied 16, 20 und 24 hpi ( $n = 15$ ,  $p > 0,05$ , Mann-Whitney-U Test) nachweisbar. Die Zilienaktivität unterschied sich signifikant ( $n = 15$ ,  $p < 0,05$ , Mann-Whitney-U Test) zwischen den beiden Gruppen 28, 38, 42 und 48 hpi. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. **B** In der Tabelle wurden die Zilienaktivitäten der TOCs, welche mit 10<sup>4</sup> FFU/TOC H1N1 infiziert wurden, mit den Standardfehlern in Prozent zusammengefasst.

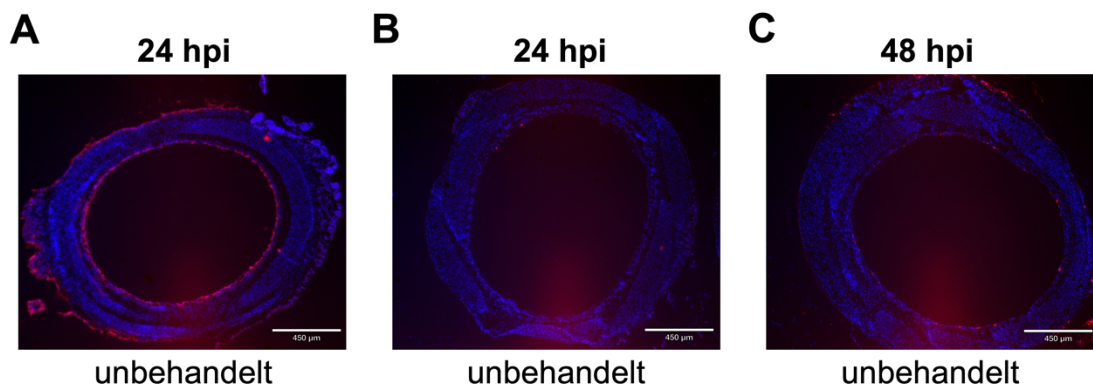
Im nächsten Schritt wurde der Virustiter der H1N1-infizierten Proben im Überstand ermittelt und mit denen der H9N2-infizierten Proben (siehe 4.5.3) verglichen. Für die H1N1-infizierten TOCs wurde ein Virustiter von  $2,5 \times 10^3$  FFU/ml ( $\pm 1,1 \times 10^3$ ) 24 hpi und von  $2,9 \times 10^3$  FFU/ml ( $\pm 1,6 \times 10^3$ ) ermittelt. Dabei war der Virustiter der H1N1-infizierten Proben zu beiden Zeitpunkten signifikant niedriger ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zu den unbehandelten Proben, welche mit H9N2 und mit ungespaltenen HA0 infiziert wurden (siehe Abbildung 47).



**Abbildung 47: Virustiter bei der Infektion der TOCs mit  $10^4$  FFU/TOC H1N1**

Der Virustiter zwischen den unbehandelten Proben, welche mit H1N1 bzw. mit H9N2 mit ungespaltenem HA0 infiziert wurde, wurden 24 und 48 hpi verglichen. Dabei konnte ein signifikanter Unterschied ( $n \geq 12$ ,  $p < 0,05$ , Mann-Whitney-U Test) zwischen den H1N1- und H9N2-infizierten Proben zu beiden Zeitpunkten nachgewiesen werden. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an.

Abschließend wurden die H1N1-infizierten TOCs auf das Influenza-A-Virus gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. 24 hpi und 48 hpi konnten bei diesen Proben vereinzelt virus-infizierte Zellen nachgewiesen werden, wohingegen die Proben fast vollständig 24 h nach einer H9N2-Infektion bei einer niedrigeren Infektionsdosis positiv auf das Influenza-A-Virus gefärbt wurden (siehe Abbildung 48).



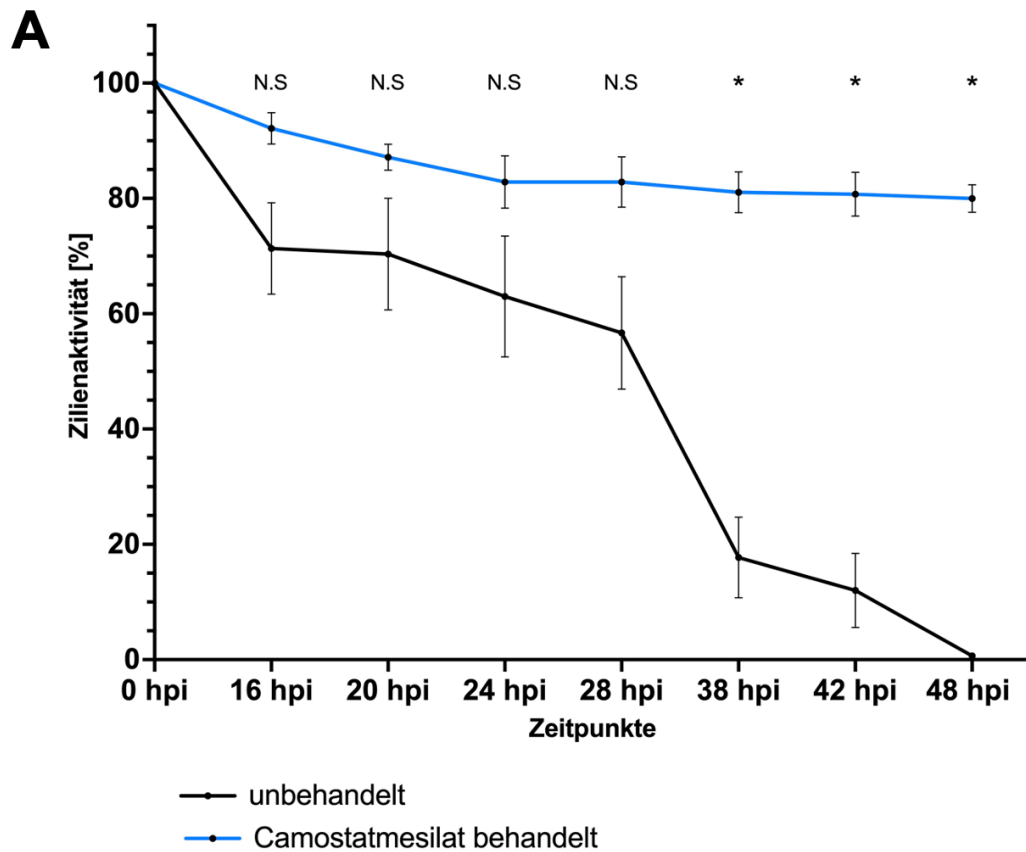
**Abbildung 48: Immunfluoreszenz-Färbung der TOCs gegen das Influenza-A-Virus im Zusammenhang einer H1N1 Infektion mit ungespaltenem HA0**

Die unbehandelten, mit H9N2 mit ungespaltenem HA0 infizierten TOCs (A) und die unbehandelten, mit H1N1 mit ungespaltenem HA0 infizierten TOCs (B) wurden nach 24 hpi für die Cryohistologie weggefroren. 48 hpi wurden die unbehandelten, mit H1N1 mit ungespaltenem HA0 infizierten TOCs (C) ebenfalls für die Cryohistologie weggefroren. Im Anschluss wurde die TOCs auf das Influenza-A-Virus in einer Immunfluoreszenz-Färbung gefärbt. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI. (für die unbehandelten TOCs, welche mit H1N1 bzw. mit H9N2 mit ungespaltenem HA0 infiziert wurden, 24 bzw. 48 hpi: n = 3). Die in dieser Abbildung verwendeten Bilder der H9N2 bzw. H1N1 infizierten TOCs wurden dabei repräsentativ für die weiteren biologischen Replikate ausgewählt.

Dadurch, dass keine erfolgreiche Infektion mit H1N1 im Vergleich zu H9N2 (siehe Abbildung 43) und H6N8 (siehe Abbildung 51) in der Immunfluoreszenz-Färbung, aber auch bei der Analyse der Zilienaktivität (siehe Abbildung 46) und bei der Bestimmung der Virustiter (siehe Abbildung 47), nachgewiesen werden konnte, wurden keine weiteren Experimente mit H1N1 mit ungespaltenem HA0 durchgeführt.

#### 4.5.6. Camostatmesilat schützt die TOCs während einer H6N8 Infektion mit ungespaltenem HA0

H6N8 ist ebenso wie H9N2 ein aviärer Virus-Stamm. Die nachfolgende Abbildung 49 zeigt die Zilienaktivität der TOCs, welche mit H6N8 mit ungespaltenem HA0 infiziert wurden, zwischen 16 und 48 hpi. Die unbehandelten Proben wiesen eine Zilienaktivität von 63,0 % ( $\pm 10,49$ ) 24 hpi und eine von 0,67 % ( $\pm 0,45$ ) 48 hpi. Im Gegensatz dazu hatten die TOCs, welche mit Camostatmesilat behandelt wurden, eine Zilienaktivität von 82,86 % ( $\pm 4,56$ ) 24 hpi und eine von 80,0 % ( $\pm 2,40$ ) 48 hpi. Dabei war die Zilienaktivität der unbehandelten Proben 38, 42 und 48 hpi signifikant niedriger ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zu den Camostatmesilat-behandelten TOCs. Zwischen 16 und 28 hpi unterschieden sich die Zilienaktivität der unbehandelten und der Camostatmesilat-behandelten Proben nicht signifikant (siehe Abbildung 49).



**B**

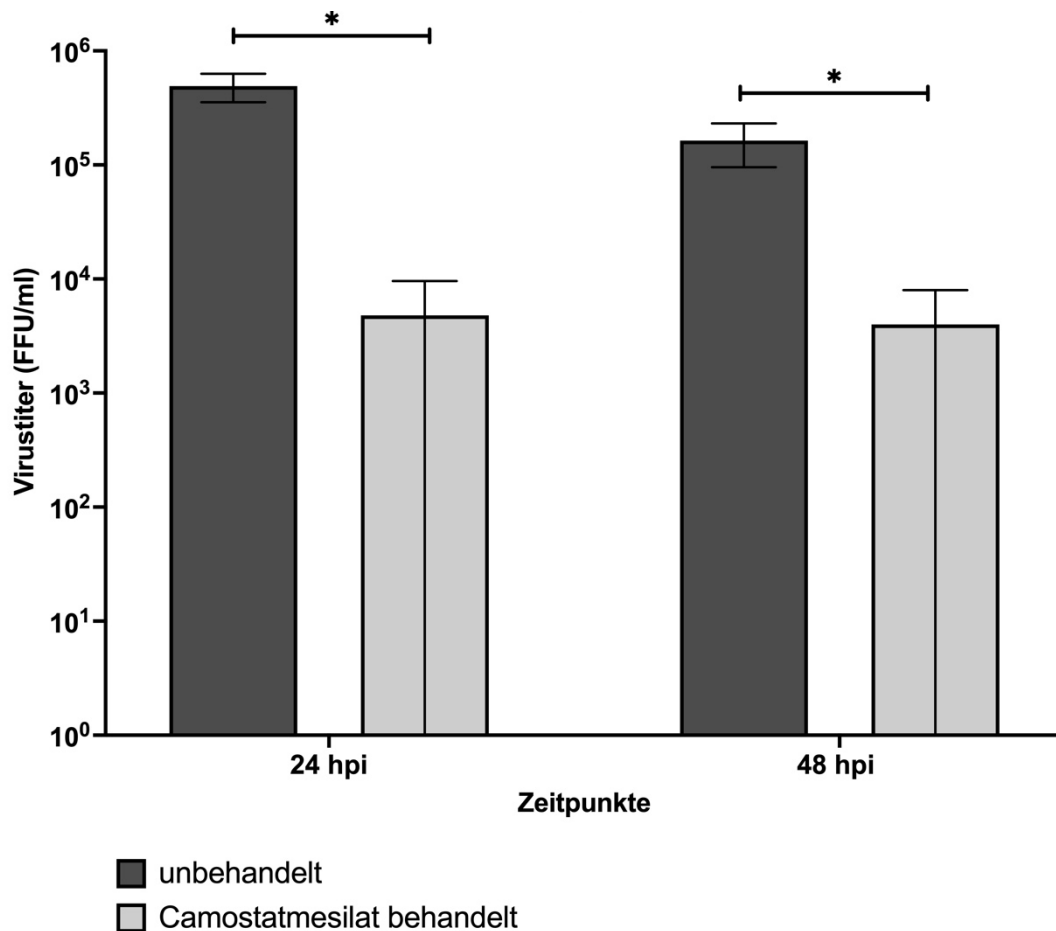
Behandlung	hpi	Zilienaktivität ± SEM [%]	Behandlung	hpi	Zilienaktivität ± SEM [%]
U	16	71,33 ± 7,92	C	16	92,14 ± 2,91
U	20	70,33 ± 9,68	C	20	87,14 ± 2,27
U	24	63,0 ± 10,49	C	24	82,86 ± 4,56
U	28	56,67 ± 9,74	C	28	82,86 ± 4,56
U	38	17,73 ± 6,70	C	38	81,07 ± 3,52
U	42	12,0 ± 6,43	C	42	80,71 ± 3,81
U	48	0,67 ± 0,45	C	48	80,0 ± 2,40

**Abbildung 49: Zilienaktivität bei der Infektion der TOCs mit H6N8 und ungespaltenem HA0**

**A** Die Zilienaktivität zwischen den unbehandelten (schwarz) und Camostatmesilat-behandelten (blau) TOCs wurde zwischen 16 und 48 hpi nach einer H6N8 Infektion mit ungespaltenem HA0 verglichen. Dabei waren keine signifikanten Unterschiede 16, 20, 24 und 28 hpi ( $n \geq 14$ , Mann-Whitney-U Test) nachweisbar. Die Zilienaktivität unterschied sich signifikant ( $n \geq 14$ ,  $p < 0,05$ , Mann-Whitney-U Test) zwischen den unbehandelten und Camostatmesilat-behandelten Proben 38, 42 und 48 hpi. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. **B** In der Tabelle wurden die Zilienaktivitäten der unbehandelten (U) und der Camostatmesilat-behandelten (C) TOCs mit den Standardfehlern in Prozent zusammengefasst.

Der Virustiter im Überstand der H6N8 infizierten Proben mit ungespaltenem HA0 wurde zwischen den unbehandelten und Camostatmesilat-behandelten Proben nach 24 und 48 hpi verglichen. Die unbehandelten Proben wiesen nach 24 hpi einen Titer von  $4,9 \times 10^5$  FFU/ml ( $\pm 1,4 \times 10^5$ ) und nach 48 hpi einen Titer von  $1,6 \times 10^5$  FFU/ml ( $\pm 6,8 \times 10^4$ )

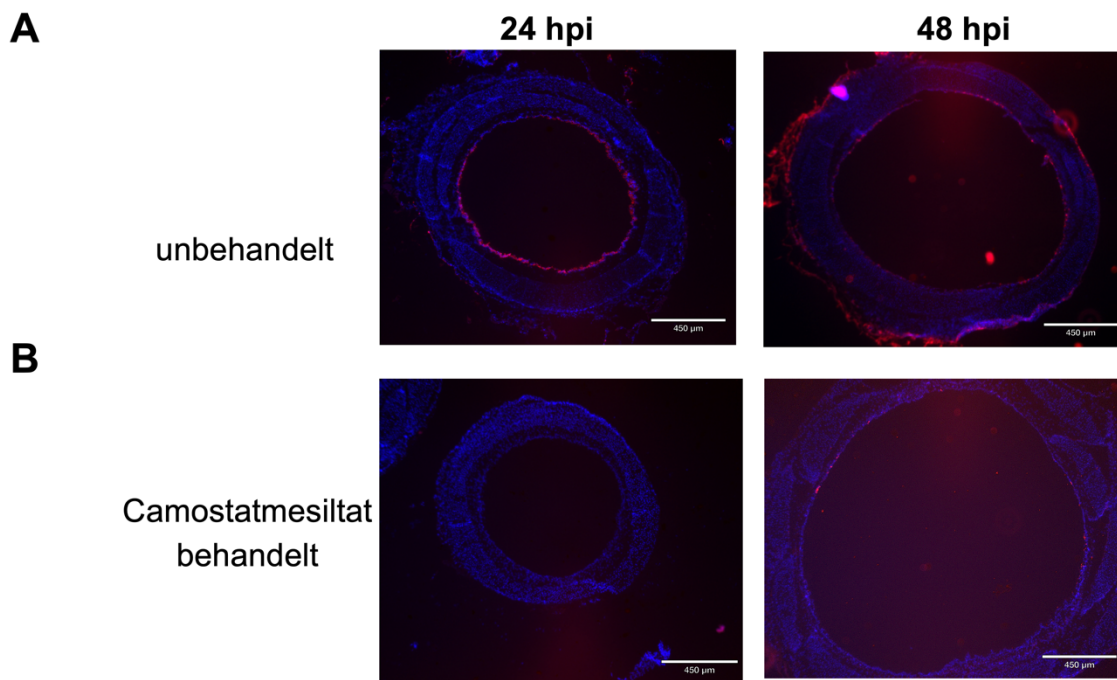
auf. Im Gegensatz dazu konnte für die Camostatmesilat-behandelten Proben ein Titer von  $4,8 \times 10^3$  FFU/ml ( $\pm 4,8 \times 10^3$ ) und 48 hpi eine Virustiter von  $4,0 \times 10^3$  FFU/ml ( $\pm 4,0 \times 10^3$ ) ermittelt werden. Dabei war zu beiden Zeitpunkten der Virustiter bei den Camostatmesilat-behandelten Proben signifikant niedriger ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zu den unbehandelten Proben (siehe Abbildung 50).



**Abbildung 50: Virustiter bei der Infektion der TOCs mit H6N8 mit ungespaltenem HA0**

Der Virustiter zwischen den unbehandelten und Camostatmesilat-behandelten TOCs wurde 24 hpi und 48 hpi nach einer H6N8 Infektion mit ungespaltenem HA0 verglichen. Dabei konnte ein signifikanter Unterschied ( $n \geq 10$ ,  $p < 0,05$ , Mann-Whitney-U Test) zwischen den unbehandelten und den Camostatmesilat-behandelten Proben bei beiden Zeitpunkten nachgewiesen werden. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an.

Die Immunfluoreszenz-Färbung der Zellkerne mit DAPI und der virus-infizierten Zellen der TOCs auf Influenza-A-Virus stützten die Ergebnisse der Analyse der Zilienaktivität und der Bestimmung des Virustiters in den unbehandelten und Camostatmesilat-behandelten Proben. Die unbehandelten TOCs zeigten 24 und 48 hpi eine beinahe vollständige Infektion der Zellen, wohingegen keine oder nur vereinzelte, infizierte Zellen in den Camostat-behandelten Proben nachgewiesen werden konnten (siehe Abbildung 51).

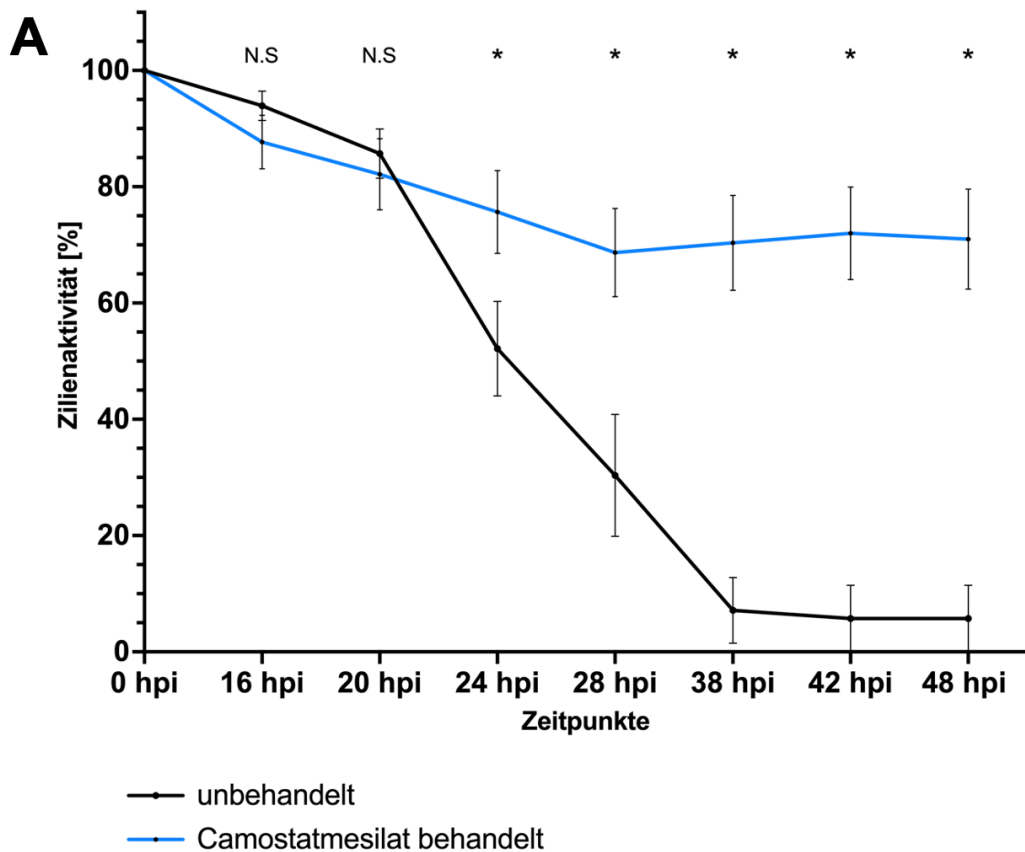


**Abbildung 51: Immunfluoreszenz-Färbung der TOCs gegen das Influenza-A-Virus im Zusammenhang einer H6N8 Infektion mit ungespaltenem HA0**

Die unbehandelten und Camostatmesilat-behandelten TOCs wurden 24 hpi (**A**) und 48 hpi (**B**) für die Cryohistologie weggefroren und anschließend auf das Influenza-A-Virus in einer Immunfluoreszenz-Färbung gefärbt. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI. (für die unbehandelten TOCs, Camostatmesilat-behandelten TOCs – n = 3 (24, 48 hpi)). Die in dieser Abbildung verwendeten Bilder der unbehandelten und Camostatmesilat-behandelten TOCs 24 und 48 hpi wurden dabei repräsentativ für die weiteren biologischen Replikate ausgewählt.

#### 4.5.7. Camostatmesilat schützt die TOCs auch während einer H6N8 Infektion mit gespaltenem HA

Abschließen wurde der Effekt von Camostatmesilat bei einer H6N8 Infektion mit gespaltenem HA untersucht. Auch in diesem Fall zeigte Camostatmesilat einen positiven Effekt auf die Zilienaktivität, welche bei den unbehandelten Proben auf 52,14 % ( $\pm 8,13$ ) 24 hpi und auf 5,71 % ( $\pm 5,71$ ) 48 hpi fiel. Im Gegensatz dazu wiesen die Inhibitor-behandelten Proben eine Aktivität von 74,29 % ( $\pm 7,52$ ) 24 hpi und eine von 69,29 % ( $\pm 9,05$ ) 48 hpi auf. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied 16 und 20 hpi zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden. Die Zilienaktivität der unbehandelten Proben war jedoch 24, 28, 38, 42 und 48 hpi signifikant niedriger ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zu den Camostatmesilat-behandelten TOCs (siehe Abbildung 52).



**B**

Behandlung	hpi	Zilienaktivität ± SEM [%]	Behandlung	hpi	Zilienaktivität ± SEM [%]
U	16	93,93 ± 2,52	C	16	86,79 ± 4,88
U	20	85,71 ± 4,25	C	20	80,77 ± 6,43
U	24	52,14 ± 8,13	C	24	74,29 ± 7,52
U	28	30,36 ± 10,50	C	28	66,79 ± 7,91
U	38	7,14 ± 5,66	C	38	68,57 ± 8,57
U	42	5,71 ± 5,71	C	42	70,36 ± 8,36
U	48	5,71 ± 5,71	C	48	69,29 ± 9,05

**Abbildung 52: Zilienaktivität bei der Infektion der TOCs mit H6N8 mit gespaltenem HA**

**A** Die Zilienaktivität zwischen den unbehandelten (schwarz) und Camostatmesilat-behandelten (blau) TOCs wurde zwischen 16 und 48 hpi nach einer H6N8 Infektion mit gespaltenem HA verglichen. Dabei waren keine signifikanten Unterschiede 16 und 20 hpi ( $n \geq 14$ , Mann-Whitney-U Test) nachweisbar. Die Zilienaktivität unterschied sich signifikant ( $n \geq 14$ ,  $p < 0,05$ , Mann-Whitney-U Test) zwischen den unbehandelten und Camostatmesilat-behandelten Proben 24, 28, 38, 42 und 48 hpi. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. **B** In der Tabelle wurden die Zilienaktivitäten der unbehandelten (U) und der Camostatmesilat-behandelten (C) TOCs mit den Standardfehlern in Prozent zusammengefasst.

Anschließend wurde ebenfalls der Titer der virus-infizierten TOCs der unbehandelten Proben und der TOCs, welche mit Camostatmesilat behandelt wurde, im Medium 24 und 48 hpi nach einer H6N8 Infektion mit gespaltenem HA bestimmt. Die unbehandelten TOCs wiesen einen Titer von  $3,9 \times 10^5$  FFU/ml ( $\pm 1,4 \times 10^5$ ) 24 hpi und von  $1,0 \times 10^5$  FFU/ml



( $\pm 4,6 \times 10^4$ ) 48 hpi auf. Im Gegensatz dazu konnte bei den TOCs, welche mit Camostatmesilat behandelt wurden, kein Virustiter 24 und 48 hpi ermittelt werden. Dabei unterschied sich der Virustiter 24 hpi und 48 hpi zwischen den beiden Gruppen signifikant ( $p < 0,05$ ) voneinander (siehe Abbildung 53).

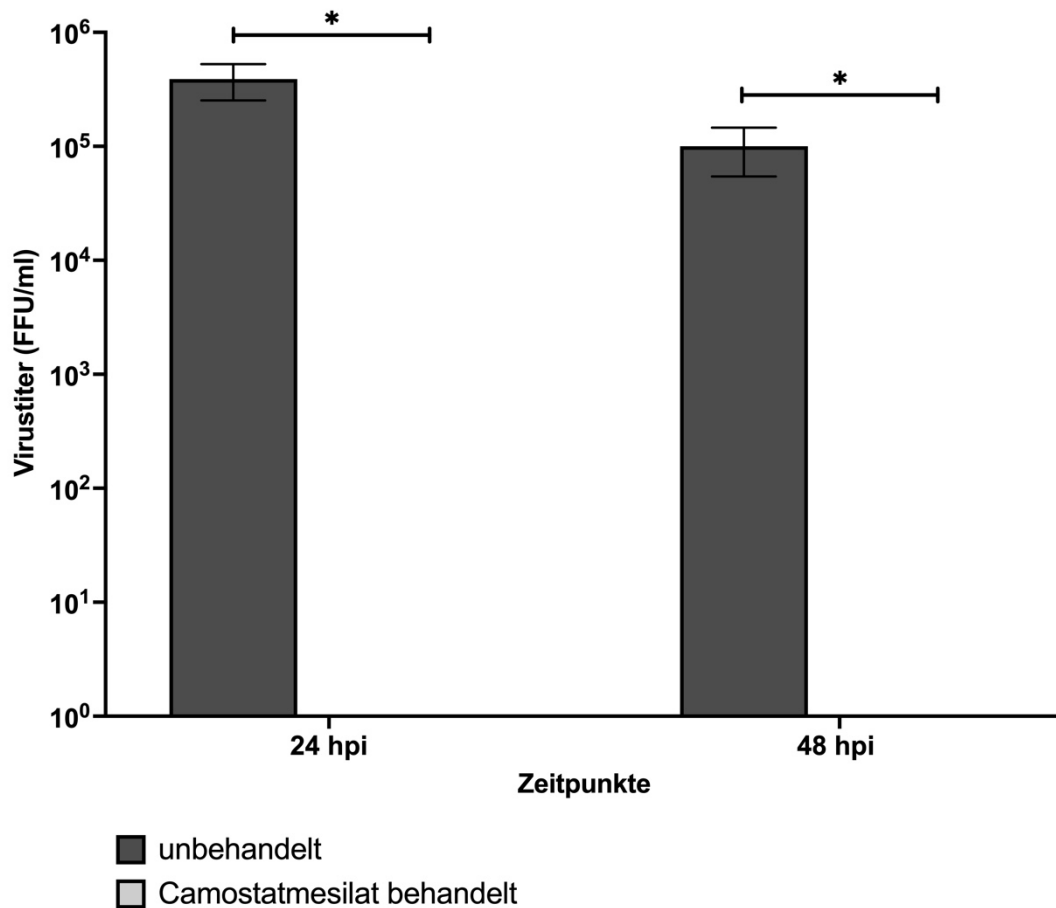


Abbildung 53: Virustiter bei der Infektion der TOCs mit H6N8 mit gespaltenem HA0

Der Virustiter zwischen den unbehandelten und Camostatmesilat-behandelten TOCs wurde 24 hpi und 48 hpi nach einer H6N8 Infektion mit gespaltenem HA verglichen. Dabei konnte ein signifikanter Unterschied ( $n \geq 8$ ,  $p < 0,05$ , Mann-Whitney-U Test) zwischen den unbehandelten und den Camostatmesilat-behandelten Proben für beide Zeitpunkte nachgewiesen werden. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an.

## 5. Diskussion

Influenza-A-Viren stellen im Allgemeinen ein großes Problem dar, gefährden das Wohl von Mensch sowie Tier [188-190] und verursachen außerdem hohe wirtschaftliche Einbußen [9]. Das Huhn nimmt als essenzielle Proteinquelle für die Ernährung der wachsenden Weltbevölkerung eine wichtige Rolle ein [1, 2]. Der Vorteil der Hühner ist auch die Ressourcen-sparende Haltung der Tiere [5] und die sehr gute Futterumwandlungsrate [6] im Vergleich zu anderen Nutztieren, wie beispielsweise dem Rind. Daher ist es umso wichtiger, nachhaltige und effektive Lösungsstrategien gegen Influenza-A-Viren zu entwickeln.

In dieser Doktorarbeit wurde die Serinprotease TMPRSS2, welche die posttranslationale Modifikation des viralen HAs [31] und daher die Influenza-A-Virus-Infektion erst ermöglicht [9], im Huhn untersucht. Frühere Studien konnten zeigen, dass TMPSS2 im Zusammenhang mit niedrigpathogenen aviären Influenza-Virus-Infektionen eine entscheidende Rolle einnimmt, weshalb dieses Protein ein vielversprechendes Target in der Bekämpfung von Influenza-A-Virus-Infektionen darstellt [37-39, 119, 127].

### 5.1. Erfolgreiche Detektion eines *TMPRSS2*<sup>+/-</sup> Genotypen in den Sperma-Proben der Chimären

Die Möglichkeit genetisch-modifizierte Hühner zu erzeugen, erlaubte es unter anderem, das Immunsystem der Tiere noch besser verstehen zu können [154], das Huhn als Produzent für die Herstellung von therapeutischen Proteinen *in ovo* zu nutzen [223] sowie Hühner mit einer verringerten Empfänglichkeit – zum Beispiel gegenüber Influenza-A-Viren – zu entwickeln [155, 157, 224]. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte ebenfalls ein Huhn erzeugt werden, welches durch den KO der TMPRSS2 Serinprotease-Domäne, weniger sensitiv auf niedrigpathogene aviäre Influenza-Viren reagiert. Dennoch gelang die Etablierung der *TMPRSS2*<sup>+/-</sup> Linie nicht und ein heterozygoter KO konnte nicht in den Tieren nachgewiesen werden.

Nach bereits veröffentlichten Studien sind individuelle Unterschiede in den Keimbahntransmissionsraten zwischen verschiedenen Zellklonen beobachtet worden [154, 163, 164]. Van de Lavoie *et al.* etablierten den Einsatz von PGCs für die Erstellung genetisch veränderter Hühner und revolutionierten damit die Forschung in diesem Bereich. In diesem Zusammenhang wurden auch die Transmissionsraten von 10 PGC-Linien miteinander verglichen. Die männlichen Klone wiesen Transmissionsraten zwischen <0,1 und 87 % auf, wohingegen die weiblichen Klone auf der einen Seite bis zu 69 % den Phänotyp der injizierten PGCs vererbten und auf der anderen Seite überhaupt keine

nachweisbare Transmissionsrate hatten. Aus dieser Studie geht folglich hervor, dass die Keimbahntransmission sowohl für die unterschiedlichen Klone, aber auch für die Chimären mit dem gleichen PGC-Klon stark variieren kann. Eine unterschiedlich hohe Keimbahntransmissionsrate der PGCs kann davon abhängen, wie viele Zellen die Gonaden überhaupt besiedeln und wie effektiv sich diese dann in den Keimdrüsen vermehren können [164]. Woodcock *et al.* beschreibt einen Verlust der Keimbahntransmission, wenn die Zellen älter als 90 Tage sind [168]. Ein möglicher Ansatzpunkt für die Erstellung einer *TMPRSS2*<sup>+/-</sup> Hühnerlinie besteht darin, die zwei weiteren positiv getesteten Klone in WT-Embryos zu injizieren und die Keimbahntransmission dieser zu testen.

Ein großer Vorteil besteht darin, parentale PGC-Linien zu verwenden, deren hohe Keimbahntransmission bereits bestätigt werden konnte. Die Linie 9-2020, welche auch für die Erstellung der *TMPRSS2*<sup>+/-</sup> Tiere verwendet wurde, wurde im Laufe dieser Arbeit für die Erstellung weiterer genetisch-veränderter Hühner genutzt. Dabei konnte eine generell fehlende Keimbahntransmission der Linie nicht bestätigt werden (Daten nicht publiziert). Der Vorteil bei einem Knock-in anders als bei einem KO besteht generell darin, dass eGFP<sup>+</sup> PGCs, wie zum Beispiel bei der Erstellung der Cas9-Hühner [225], bedenkenlos genutzt werden können. Bei einer Etablierung eines KOs in eGFP<sup>+</sup> Zellen müsste garantiert werden, dass die Vererbung des Fluoreszenz-Markers und der genetischen Modifikation unabhängig voneinander erfolgt. Wenn es aber keine unabhängige Vererbung der genetischen Veränderung und des Fluoreszenzmarkers gibt, kann aus den heterozygoten, eGFP<sup>+</sup> Tieren erneut PGCs isoliert werden, sodass der Fluoreszenzmarker über die loxP-Stellen mit der Cre-Rekombinase entfernt wird. Die eGFP<sup>-</sup> Zellen können dann für die erneute Erstellung der Chimären verwendet werden [226]. Vermutlich hat das *eGFP* auf beiden Allelen negative Auswirkungen auf die Gesundheit der Tiere. Schusser *et al.* beschrieb erstmals einen eGFP<sup>+</sup>- Anteil aller somatischen Zellen von 30 bis 50 % in den lebensfähigen Tieren mit einem hetero- oder homozygoten KO der *JH*-Region, obwohl das verwendete Plasmid für die Erzeugung der genetischen Modifikation neben der *Puromycin*-Resistenz auch eine *eGFP*-Kassette enthält. Dieser Effekt wurde durch die Methylierung auf dem Fluoreszenz-Marker erklärt [154]. Da das GFP systemisch im Embryo exprimiert wird und unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden kann [164], erlaubt der Fluoreszenzmarker der injizierten PGCs ein noch einfacheres Screening der Embryonen auf Keimbahntransmission.

Zum aktuellen Zeitpunkt ist die genetische Veränderung der PGCs die Methode der Wahl als Grundlage für die Erstellung genetisch veränderter Hühner [154, 157, 163, 164, 225]. Diese Herangehensweise bietet viele Vorteile im Vergleich zu den ALV [160]

oder Lentivirus basierten Ansätzen [153]. Ein Nachteil von beiden Methoden ist zum Beispiel die begrenzte Größe des Transgens [162, 227]. Ebenso hat CRISPR/Cas9 die Forschung durch das erleichterte Gene-Editing maßgeblich geprägt [46]. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Herangehensweise aus der Maus von Kim *et al.* auf das Huhn übertragen und Exon 10 bis 13, welche die Serinprotease-Domäne codieren, entfernt. Anders als bei Kim *et al.* wurde in dieser Arbeit jedoch die genetische Modifikation mit CRISPR/Cas9 anstatt über die homologe Rekombination generiert. Dabei zeigten die genetisch-veränderten Mäuse keinen vom WT abweichenden Phänotyp [36]. Bei einer erneuten Erstellung von PGCs mit einem KO der TMPRSS2 Serinprotease-Domäne könnten PGCs einer anderen parentalen Linie mit einer modifizierten Targeting-Strategie verwendet werden. Eine mögliche Alternative besteht darin, TMPRSS2 im Huhn beinahe vollständig über CRISPR/Cas9 über einen KO zu entfernen oder ein Stopcodon nach Exon 2 einzufügen, um so die Transkription zu beenden. Erstere Strategie wurde ebenfalls bereits in Mäusen über homologe Rekombination verwendet. Sakai *et al.* nutzte für die Selektion eine Puromycin-Resistenz zwischen zwei loxP-Stellen und brachte zusätzlich noch *lacZ* in das Mausgenom ein. Auch diese Modifikation wirkte sich nicht auf den Phänotypen der Tiere aus [37]. Daher könnte bei einer erneuten Erstellung von PGCs mit einem KO der TMPRSS2 Serinprotease-Domäne die homologe Rekombination anstatt CRISPR/Cas9 verwendet werden, sodass die Targeting-Strategie von Sakai *et al.* aus der Maus [37] direkt auf das Huhn übertragen werden würde.

## 5.2. *In vitro* Produktion und Aufreinigung des chTMPRSS2 bietet viele Möglichkeiten zur Optimierung der Proteinausbeute

Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es auf dem Markt keinen kommerziell erwerblichen Antikörper gegen das chTMPRSS2. Daher war es das Ziel, ein polyklonales anti-chTMPRSS2-Serum im Kaninchen zu produzieren. Die Produktion dieses Serums konnte nicht durchgeführt werden, da die Proteinproduktion und -aufreinigung in *E. Coli* nicht zufriedenstellend gelang. Der Anteil des rekombinanten Proteins in der entsprechenden Bande mit einem Gewicht von 31,51 kDa auf der SDS-PAGE, welche mit Coomassie-Brilliant Blue R-250 zur Visualisierung der Proteine gefärbt wurde, war bei 16,4 %. Die kontaminationsfreie Produktion des Antigens ist jedoch von höchster Bedeutung, da die Tiere, welche für die Immunisierung verwendet werden, oft mehr Antikörper gegen die verunreinigenden, hauptsächlich vorliegenden Antigene bilden, anstatt gegen das gewünschte [228].

Die Herstellung eines polyklonalen Serums unterteilt sich in mehrere Schritte. Der erste Schritt ist die Antigen-Produktion [212]. Das erfolgt unter anderem typischerweise in

einer *E. Coli* Kultur [229], mithilfe von Säugetier-Zellkultursystemen, wie beispielsweise den human embryonic kidney 293 (HEK293) [230] oder den chinese hamster ovary (CHO) Zellen [231], in Insektenzellen [232] oder mit einem zell-freiem System [233]. Im Fall von chTMPRSS2 war die Proteinproduktion in *E. Coli* im Vergleich zur Produktion in HEK293T Zellen sowie mit einem zell-freiem System am vielversprechendsten, da mit dieser Methode chTMPRSS2 über den N-terminalen His-Tag im Western Blot in einer spezifischen und deutlichen Bande nachgewiesen werden konnte. Im Allgemeinen ist die Produktion von Transmembranproteinen aber besonders schwierig, was unter anderem an deren Stabilität liegt [234]. Neben den *E. Coli BL21(DE3)* wurden außerdem noch *E. Coli M15* Bakterien getestet, welche nur bei 28 °C kultiviert wurden [235]. In diesem Fall war die Bande im Western Blot jedoch schwächer (Daten nicht gezeigt). In der Literatur wird generell beschrieben, dass eine Absenkung der Temperatur während der Kultivierung oft Vorteile mit sich bringt und dadurch unter anderem das Verklumpen der Proteine verhindert oder minimiert, die korrekte Proteinfaltung begünstigt und sogar größere Mengen an Protein produziert werden kann. Die Löslichkeit der Proteine soll dadurch verbessert werden [236]. Der Wechsel des Bakterienstamms mit einem anderen Expressionsvektor und einer abgesenkten Temperatur während der Kultivierung führte jedoch im Fall des chTMPRSS2 zu keinem vielversprechenden Ergebnis. His-chTMPRSS2, das in *E. Coli M15* Bakterien produziert wurde, konnte im Western Blot anteilmäßig mehr in der unlöslichen Fraktion als im Lysat - anders als bei der Produktion in *E. Coli BL21(DE3)* – detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Die Effizienz der Proteinproduktion kann deutlich verbessert werden, indem nur eine Domäne des gewünschten Proteins hergestellt wird [237-239], was auch für chTMPRSS2 bestätigt werden konnte. Da jedoch der Anteil des chTMPRSS2 in der entsprechenden Bande auf der SDS-PAGE, welche mit Coomassie-Brilliant Blue R-250 gefärbt wurde, nur bei 16,4 % lag, wurden die Kaninchen nicht immunisiert.

Die *E. Coli* sind in diesem Zusammenhang oft der Organismus der Wahl [240, 241]. Ein großer Vorteil dieser ist das sehr schnelle Wachstum der Bakterien, die sich in etwa alle 20 min teilen [242]. Speziell die *E. Coli BL21(DE3)* haben außerdem die beiden Proteine OmpT und Lon nicht, welche ansonsten zu einem Abbau der Proteine – unter anderem während der Isolierung – führen könnten [220, 240, 243]. Die *E. Coli BL21(DE3)* verwenden oft Systeme, bei denen das gewünschte Protein unter dem T7 Promotor exprimiert wird [240, 244]. In diesem System wird die Expression der T7-RNA-Polymerase durch den lacUV5-Promotor gesteuert. Die Expression der Polymerase wird wiederum durch die Zugabe von IPTG ermöglicht, die wiederum die Expression des Zielgens über den zugehörigen Promotor steuert [240]. Ist das exponentielle Wachstum mit einer  $OD_{600} =$

0,4 - 0,6 abgeschlossen, wird IPTG hinzugegeben, um folglich die Produktion des rekombinanten Proteins zu starten [242, 245]. Eine Alternative dazu wäre ein Medium, welches die Induktion der Proteinproduktion automatisch steuert [246, 247]. Insgesamt gibt es viele Optionen, die Proteinproduktion zu optimieren. Eine Möglichkeit besteht auch darin, den Tag, welcher für die Aufreinigung benötigt wird, am C-terminalen, anstatt dem N-terminalen Ende des Proteins zu knüpfen. Die Position des Tags hat unter anderem Auswirkungen auf die Löslichkeit sowie die Protein-Faltung, weshalb ein C-terminaler Tag oft nützlich sein kann [248]. Außerdem könnten auch noch andere Tags und dadurch dann verschiedene Methoden der Aufreinigung getestet werden. Alternativen zum His-Tag, welcher über die Affinitätschromatographie, genauer gesagt über die immobilized metal affinity chromatography (IMAC) [249], mit der Ni-NTA-Agarose interagiert und über einen Imidazol-Gradienten eluiert werden kann [245], sind zum Beispiel der GST-Tag, der FLAG-Tag, der Arg-Tag oder der Strep-Tag [250]. Die Aufreinigung über den GST-Tag basiert auf der Wechselwirkung mit Glutathion-Matrix [251] und über den FLAG-Tag auf der kovalenten Bindung mit einem anti-FLAG-Antikörper [252]. Der Arg-Tag bindet über das Prinzip des Kationen-Austausches an die Säule [253] und der Strep-Tag wechselwirkt mit der Streptavidin-gekoppelten Matrix [254].

Nachdem die Proteinproduktion in *E. Coli* nicht ausreichend effektiv war und dadurch kein polyklonales anti-chTMPRSS2-Serum in Kaninchen hergestellt werden konnte, wurde ein polyklonales anti-hTMPRSS2-Serum im Huhn getestet. TMPRSS2 bekam auch aufgrund der Corona-Problematik in den letzten Jahren viel Aufmerksamkeit [23, 255-257], sodass einige humane und murine Antikörper, sowie Antikörper für das Schwein verfügbar sind. Einer der anti-hTMPRSS2-Antikörper nutzte als Antigen die letzten 12 AS [258] der humanen Isoform X1 (NP\_005647.2.). Diese Polypeptid-Sequenz weist eine hohe Homologie zu der des Huhns (XP\_015156666.1 [140]) auf. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass dieser Antikörper auch im Gewebe des Huhns für Immunfluoreszenz-Färbungen verwendet werden kann. Zusätzlich zu dem verfügbaren humanen Antikörper könnte auch das analoge Polypeptid aus dem Huhn zum Beispiel in *E. Coli BL21(DE3)* produziert, isoliert und schließlich für die Immunisierung verwendet werden.

### 5.3. Organkulturen als Tool zum Testen von Virus-Wirt-Wechselwirkungen

TOCs werden schon seit vielen Jahren verwendet, um Virus-Wirt-Wechselwirkungen *ex vivo* genauer zu verstehen [259]. Diese Organkultur findet zum Beispiel Einsatz im Zusammenhang mit Influenza-A-Viren [260-264], IBVs [11, 265], New Castle Disease Viren (NDV) [266], Metapneumoviren [267], aber auch mit Mycoplasma-Stämmen, wie

beispielsweise *Mycoplasma gallisepticum* (*M. gallisepticum*) [47, 268]. TOCs, und Organkulturen allgemein, werden in der Forschung eine immer noch wichtigere Bedeutung bekommen, da die Verwendung von Versuchstieren auf das nötige Minimum reduziert werden soll. Das 3R Prinzip steht dabei im Vordergrund [269].

TOCs wurden jedoch noch nie im Zusammenhang mit der Untersuchung der Wirksamkeit von Medikamenten und deren Auswirkung auf die Interaktion mit dem Erreger verwendet. Die TOCs boten ein wertvolles Tool, um die beiden Medikamente Aprotinin und Camostatmesilat im Zusammenhang einer Influenza-A-Virus-Infektion zu vergleichen. Voraussetzung dafür war, dass die Inhibitor-Gabe keine negativen Auswirkungen auf die Kultivierung der nicht-infizierten Proben hatte. Die Zilienaktivität der behandelten TOCs im Vergleich zu den unbehandelten Proben unterschied sich nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Daher kann diese *ex-vivo*-Kultur als Vorstufe von *in-vivo*-Infektionsexperimenten im Huhn agieren, wenn im nächsten Schritt die Wirkung der Serinprotease-Inhibitoren im Tier getestet werden sollen. In der virologischen Forschung wird die Verwendung von *ex vivo* Kulturen [270, 271], aber auch von – v. a. humanen – Organoiden [272, 273] allgemein immer bedeutender.

Bei dem Infektionsexperiment mit H9N2 mit ungespaltenem HA konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den unbehandelten und Aprotinin-behandelten Proben beobachtet werden. Die Aprotinin-Konzentration war in den Experimenten identisch zu der verwendeten Dosis von Camostatmesilat [22]. Ein möglicher Grund dafür ist, dass die verwendete Konzentration für die TOCs zu niedrig war. Ein potenzieller Ansatzpunkt, um die Wirkung von Aprotinin in TOCs im Rahmen eines Influenza-A-Virus-Infektionsexperiments zu testen, wäre eine Titration des Inhibitors. Kawase *et al.* untersuchte im Zusammenhang mit Henrietta Lacks (HeLa) Zellen, welche das Angiotensin-konvertierendes Enzym 2 (ACE2) und/oder TMPRSS2 exprimierten und mit dem humanen Coronavirus NL63 infiziert wurden, die inhibitorische Wirkung von verschiedenen Inhibitoren – unter anderem auch von Aprotinin und Camostatmesilat – mit einer höheren Inhibitor-konzentration von 10  $\mu$ M. Aber auch in dieser Studie führte Aprotinin nicht zu einem verminderten Viruseintritt in die Zelle [274]. In einer vergleichbaren Studie verwendeten Yamaya *et al.* HTE, um den Effekt von Camostatmesilat, Silvestat, Gabexatmesilat sowie Aprotinin zu untersuchen. Die verwendeten Zellen wurden aus verstorbenen Patienten gewonnen. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Inhibitoren Camostatmesilat, Aprotinin und Gabexatmesilat in der gleichen Konzentration die Viruslast im Überstand sowie die vRNA-Levels in der Zelle reduziert, die Behandlung von Camostatmesilat und Aprotinin zu weniger Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) im Überstand führt und Camostatmesilat zusätzlich noch die Interleukin-6 (IL-6) Levels ebenfalls

herabsetzt. In diesem Zusammenhang war Camostatmesilat der vielversprechendste Inhibitor [41], wodurch erneut die Ergebnisse von Hosoya *et al.* bestätigt werden konnte. In der Studie aus dem Jahr 1992 wurde die Inhibitorwirkung von Camostatmesilat, Aprotinin und Gabexatmesilat *in ovo* gegenüber gestellt [42].

Eine Frage, die wiederum im Rahmen dieser Doktorarbeit aufkam, ist Folgende - warum hat Camostatmesilat eine höhere inhibitorische Wirkung als Aprotinin? Generell ist diese Frage jedoch noch nicht geklärt, dabei darf aber auch der Effekt der unterschiedlichen Zelltypen nicht vernachlässigt werden [41]. Das zentrale Thema dieser Doktorarbeit war es, die Rolle von TMPRSS2 – unter anderem während einer Influenza-A-Virus-Infektion genauer im Huhn zu verstehen. Daher soll besonders hervorgehoben werden, dass Camostatmesilat die stärkste Bindung mit TMPRSS2 im Vergleich zu Nafamostat oder Bromhexid eingeht [275]. Das hat auch die Auswahl des Inhibitors für die Experimente mit den TOCs erneut bestärkt. Diese Bindung mit dem aktiven Zentrum der Protease ist bei Camostatmesilat und bei Nafamostat über die Guanidin-Seitenkette vermittelt. Dabei entstehen sowohl Wasserstoff-Brücken-Bindungen und hydrophobe Wechselwirkungen. Der Inhibitor wechselwirkt mit dem Histidin und dem Serin im aktiven Zentrum von TMPRSS2 [275]. Ramakrishnan *et al.* konnte jedoch die Wechselwirkung mit den drei AS des aktiven Zentrums des TMPRSS2 nachweisen [276]. Neben Camostatmesilat ist unter Umständen Leupeptin ein noch vielversprechender Inhibitor, da die Bindung zum Histidin, Serin und zur Asparaginsäure noch stärker ist als bei Camostatmesilat [276].

Bei der Infektion mit H1N1 war die Zilienaktivität – trotz der um den Faktor 100 höheren Infektionsdosis – zwischen 28 hpi und 48 hpi signifikant ( $p < 0,05$ ) höher als die der TOCs, welche mit H9N2 infiziert wurde. Im Umkehrschluss war der Titer der H1N1-infizierten Proben zu beiden Zeitpunkten signifikant ( $p < 0,05$ ) niedriger als der der H9N2-infizierten TOCs. Die Immunfluoreszenz-Färbung bestärkte die Erkenntnisse aus den vorhergegangenen Analysen, dass die Infektion mit dem humanen Subtyp H1N1 [14, 277] nicht so erfolgreich wie mit den beiden aviären Viren H9N2 und H6N8 [14] war. Die unterschiedlichen Influenza-A-Virus-Varianten binden entweder bevorzugt an  $\alpha$ -2,6- oder an  $\alpha$ -2,3-Sialinsäure, wobei erstere von den humanen Influenza-A-Viren bevorzugt wird [14, 278]. Der Anteil der  $\alpha$ -2,3-Bindung ist im Epithel der TOCs vorherrschend, wohingegen die  $\alpha$ -2,6-Glykosylierung in den tieferen Schichten zu finden ist [11].

Das erklärt auch im Umkehrschluss die unterschiedliche Effizienz bei der Produktion der Virenstocks mit ungespaltenem HA0 in MDCK-Zellen für H1N1 im Gegensatz zu H9N2 sowie H6N8, wobei diese Ergebnisse nicht mit der Literatur übereinstimmen.



Barnard *et al.* verglich die Bindungen zur Sialinsäure in verschiedenen MDCK-Linien. Diese wurden in  $\alpha$ -2,6- bzw.  $\alpha$ -2,3- sowie in Neu5AC- und in N-Glycolylneuraminsäure-Populationen unterteilt. Dabei ist der Anteil der  $\alpha$ -2,3-Bindungen in vier der fünf untersuchten Linien häufiger vorhanden. Die Linie, in der mehr  $\alpha$ -2,6-Bindungen nachgewiesen werden konnte, wurde mit einem Plasmid transfiziert [279]. Nelson *et al.* konnte zeigen, dass die Zusammensetzung des Mediums sich ebenfalls auf den Anteil der Zellen mit beiden Glykosylierungen bzw. mit einer  $\alpha$ -2,3- oder mit einer  $\alpha$ -2,6-Bindung auswirkt. Außerdem analysierte Nelson *et al.* die Expression der Glykosylierungen im Verlauf verschiedener Zell-Passagen und konnte zeigen, dass diese sich stark von der letzten Passage unterscheiden kann [280].

Bei den Experimenten mit H9N2 und H6N8 war kein deutlicher Unterschied zwischen der Infektion mit ungespaltenem und gespaltenem HA zu sehen. In beiden Fällen zeigte Camostatmesilat einen positiven Effekt auf das Überleben der TOCs, was sich in der Zilienaktivität äußert, und einen signifikant niedrigeren Titer ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zu den unbehandelten Proben. Die ursprüngliche Hypothese war, dass Camostatmesilat keinen Effekt bei der Infektion mit gespaltenem HA haben würde. Ein möglicher Grund dafür ist die Infektionsdosis, welche basierend auf der Studie von Sid *et al.* unabhängig von der HA-Spaltung gewählt wurde [280]. Einige Studien, welche ebenfalls TMPRSS2 oder Serinproteasen allgemein adressierten, verwendeten Virusstämme mit bereits gespaltenem HA in einer niedrigen Infektionsdosis [9, 34, 57]. Daher ist es im nächsten Schritt interessant, den Effekt der Virenstocks mit ungespaltenem und gespaltenem HA in einer höheren Infektionsdosis zu vergleichen, sodass dann möglicherweise ein Effekt zu erkennen ist. Außerdem sollte die Reinheit des Stocks, bzw. das Verhältnis zwischen ungespaltenem und gespaltenem HA, überprüft werden. Böttcher-Friebertshäuser *et al.* wies zum Beispiel HA0, HA1 und HA2 im Zellkulturüberstand mithilfe eines Western Blots mit Antikörper gegen das HA nach [28]. Eine Alternative zum Western Blot ist die Analyse im MS [281]. Dabei können die verschiedenen Varianten des HAs quantifiziert werden [282].

Auch wenn ein signifikanter Effekt bei der Zilienaktivität, bei der Bestimmung des Titers sowie bei der Immunfluoreszenz-Färbung aufgrund der Camostatmesilat-Behandlung während der Influenza-A-Virus-Infektion zu erkennen war, gab es zum Teil eine deutliche Streuung der Werte bei der Motilität der Zilien und bei der Viruslast. Auch bei der Immunfluoreszenz-Färbung gab es Unterschiede im Anteil der positiv auf das Influenza-A-Virus-gefärbte Zellen. In einer *in vivo*-Infektionsstudie detektierte Reemers *et al.* in den infizierten Küken 24 und 72 hpi signifikant mehr vRNA im oberen Bereich der Trachea als im unteren Abschnitt [283]. In einer weiteren Studie optimierte Reemers *et*

*al.* die TOC-Kultur während der Infektion. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Unterschiede in der Viruslast abhängig von der ursprünglichen Lokalisation innerhalb der Trachea und auch zwischen den Proben durch eine höhere Infektionsdosis minimiert werden kann [264]. In der Studie von Reuter *et al.* wurden pro Gruppe 7 TOCs, welche von 7 unterschiedlichen Embryos isoliert wurden, analysiert [284]. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden typischerweise 100 TOCs für ein Experiment initial isoliert, von denen dann die TOCs mit einer Zilienaktivität von 100 % zufällig den einzelnen Gruppen zugeteilt wurden. Die Embryos, welche für die Isolierung der TOCs verwendet wurden, wiesen dabei den gleichen genetischen Hintergrund auf. Dabei wurde nicht zwischen dem oberen und unteren Bereich der Trachea, aber auch nicht zwischen den Embryos, aus denen die Trachea für die Präparation der TOCs gewonnen wurde, unterschieden. Diese zufällige Auswahl der Proben zu den verschiedenen Gruppen kann eine Erklärung für die Streuung der Werte sein.

Basierend auf der Studie von Reuter *et al.* [284] ist es auch interessant, die Interferon (IFN)-Levels der TOCs während einer Infektion mit und ohne eine Camostatmesilat-Behandlung zu analysieren und vergleichen. Dabei unterscheidet man zwischen Typ I IFN, wozu IFN $\alpha$  oder IFN $\beta$  zählt [284, 285], und Typ III, nämlich IFN $\lambda$  [284]. Reuter *et al.* konnte zeigen, dass Embryos, welche bereits vor der Infektion mit einem rekombinanten H5N1 Stamm chIFN $\lambda$  exprimierten, eine signifikant niedrigeren Viruslast aufwiesen. Des Weiteren wurden Embryos mit dem RCAS-chIFN $\lambda$  transfiziert und TOCs aus diesen Embryos isoliert. Diese Proben wurden nachfolgend ebenfalls unter anderem mit dem rekombinanten H5N1 Stamm infiziert und hatten auch eine deutlich reduzierte Viruslast im Vergleich zu den Kontroll-Proben [284]. In der Immunabwehr der Wirbeltiere gegen Virusinfektionen sind IFNs von höchster Bedeutung [284, 286, 287]. Sobald vRNA in der Zelle detektiert wird, wird IFN produziert und ausgeschüttet [284, 288]. Eine mögliche Hypothese besteht darin, dass Camostatmesilat die Infektion eindämmt, daher weniger vRNA in der Zelle ist, das Immunsystem kaum bzw. nicht so stark stimuliert wird, sodass im Umkehrschluss niedrigere IFN-Levels zu detektieren sind.

Im nächsten Schritt können Cas9-Embryos [225] mit der gleichen Strategie wie Reuter *et al.* [284] mit einem RCAS-Konstrukt, welche die beiden sgRNAs zum KO der TMPRSS2 Serinprotease-Domäne enthalten, transfiziert werden, damit von diesen Embryos TOCs präpariert und in Infektionsexperimenten getestet werden. In diesem Fall müsste allerdings die erfolgreiche genetische Modifikation bestätigt, bzw. der Anteil der genetisch veränderten Zellen quantifiziert werden. Kothlow *et al.* untersuchte die Transgen-Expression durch RCAS-Konstrukts von zwei Wochen alten Küken in der qRT-PCR und detektierte die höchsten Levels in der Haut, im Herz und in den Nieren

der Küken. In dieser Studie wurde die Transgen-Expression in Trachea nicht analysiert [289]. Da Embryos mit dem RCAS-System genetisch modifiziert und die TOCs aus diesen genetisch modifizierten Embryos isoliert werden können [284], kann die Organkultur ein essenzielles Tool darstellen, um verschiedene genetische Modifikationen im Zusammenhang von Virus- oder auch Bakterien-Infektionen [47] zu testen, bevor die jeweiligen Tiere erzeugt werden. Die Erstellung genetisch veränderter Hühner ist ein arbeitsaufwendiger und langwieriger Prozess, da die Tiere erst die Geschlechtsreife erreichen und dann in einem Alter von ca. 16 Wochen mit der Züchtung der nächsten Generation begonnen werden kann [290]. Außerdem wird es auch immer noch wichtiger, die Zahl der verwendeten Versuchstiere auf das benötigte Minimum zu reduzieren [269]. Die TOCs als Organkultur stehen zwischen der *in vitro* und *in vivo* Forschung und nehmen daher in der jetzigen Zeit eine wichtige Funktion ein.

Das Adressieren von Serinproteasen des Wirtsorganismus hat in der Bekämpfung von Krankheitserregern viel Potenzial [9, 28, 120]. Durch den Antigen-Drift [291] haben die Influenza-A-Viren eine hohe genetische Fitness [58], weshalb jährlich spezifische Impfstoffe entwickelt werden müssen [292]. Da aber jeder Subtyp die posttranslationale Aktivierung des HAs durch die Wirtszellproteasen benötigt [31], bringt diese Strategie viele Vorteile mit sich. Beispielsweise konnte Song *et al.* *in vitro* zeigen, dass ein Subtyp, welcher nicht mehr auf die Therapie mit Oseltamivir – ein Wirkstoff der NA adressiert [293] – anspricht, durch die Behandlung mit Aprotinin inhibiert werden kann [34].

Neben der Impfstoff-Entwicklung [294, 295] gewann auch TMPRSS2 als möglicher Angriffspunkt in der Bekämpfung von Covid-19 im Zuge der SARS-CoV 2 Pandemie seit März 2020 nochmals an Bedeutung [23, 296]. TMPRSS2 ist nicht nur an der posttranslationale Modifikation des HA der Influenza-A-Viren beteiligt [31], sondern spaltet auch das Spike (S)-Proteine der Coronaviren [22]. In diesem Zusammenhang wurden auch viele Serinprotease-Inhibitoren, darunter auch Camostatmesilat [22], aber auch Aprotinin [149], getestet. Camostatmesilat zeigte jedoch auch keinen positiven und beschleunigenden Effekt auf die Genesung der Patienten [128]. Daher ist es unerlässlich, den Camostatmesilat in einem *in vivo*-Infektionsexperiment mit verschiedenen niedrigpathogenen Stämmen zu untersuchen, da sich die Erkenntnisse im Huhn nur auf *in ovo*- und die in dieser Studie gewonnenen *ex-vivo*-Experimente beschränkt.

Aufgrund der Entwicklung von Resistenzen gegenüber Therapien, welche virale Proteine angreifen [120, 297], ist es umso wichtiger, nachhaltige, langfristige und effektive Herangehensweisen und Lösungen in der Eindämmung von Krankheitserregern zu entwickeln.

Die Verwendung von Camostatmesilat bei der Behandlung von niedrigpathogenen aviären Influenza-Virus-Infektionen ist bei exotischen Vögeln, bei Vögeln, die als Haustiere gehalten und deren Produkte nicht für den menschlichen Verzehr verwendet werden, und in der Einzelfallmedizin prinzipiell denkbar. Die Voraussetzung dafür ist selbstverständlich, dass die positiven Effekte aufgrund der Therapie mit Camostatmesilat *in vivo* bestätigt werden konnten und der Wirkstoff zugelassen ist. Generell ist der Einsatz gewisser Medikamente in der Geflügelindustrie verboten oder bedingt eine gewisse Karenzzeit, bis die tierischen Produkte wieder verwendet werden dürfen [298]. Außerdem würde die Inhibitorgabe in der Geflügelindustrie aufgrund der geringen Halbwertszeit des Serinprotease-Inhibitors mit 2 h 20 min [151] auch hohe finanzielle Kosten mit sich bringen. Der bedeutendste Grund, warum oft antivirale Medikamente nicht in der Geflügelindustrie verwendet werden dürfen, ist die Gefahr von Escape-Mutationen, welche Resistenzen gegenüber bestimmten Wirkstoffen ausgebildet haben. Ein Beispiel dafür ist der M2-Ionenkanal-Inhibitor Amantadin. Beard *et al.* beobachtete im Jahr 1986 während eines Infektionsexperiments mit Hühnern ein späteres Sterben der Tiere, welche mit dem Inhibitor am Tag der Infektion behandelt wurde, im Vergleich zu den unbehandelten Hennen. Es konnte gezeigt werden, dass nicht der ursprüngliche aviäre Influenza-Virus-Stamm, sondern die Mutante, welche eine Resistenz gegenüber Amantadin entwickelt hatte, für das Sterben der behandelten Tiere verantwortlich war [299]. Aufgrund der hohen genetischen Fitness kann sich das Virus gut adaptieren [58], so dass die Verwendung von anti-viralen Medikamenten in Geflügelbeständen aufgrund des Risikos einer Resistenz-Bildung auch eine große potenzielle Gefahr darstellt. Die Gesundheit der Bevölkerung ist von höchster Bedeutung.

Abschließend kann gesagt werden, dass die TOCs ein bedeutendes Tool in der virologischen Forschung darstellen und dadurch nicht nur die Interaktion zwischen Erreger und Wirt besser verstanden, sondern auch der Effekt von Medikamenten in der *ex vivo*-Kultur analysiert werden kann. In diesem Zusammenhang konnte auch noch die Bedeutung von Serinproteasen während einer Influenza-Infektion hervorgehoben werden. Das bietet eine vielversprechende Grundlage für die Erstellung eines *TMPRSS2<sup>-/-</sup>* Huhns, welches weniger sensitiv auf niedrigpathogene Influenza-Infektionen reagieren sollte.

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

Die natürliche Funktion der Serinprotease TMPRSS2 ist im Huhn unerforscht und sogar im Säugetier, wie der Maus, aber auch im Menschen, noch nicht bekannt [28, 130]. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle des TMPRSS2 im Huhn im Kontext einer Influenza-A-Virus-Infektion besser zu verstehen. Dafür wurde ein KO der TMPRSS2 Serinprotease-Domäne in einer Hühnerzelllinie sowie in PGCs erzeugt, mit dem Ziel eine Hühnerlinie ohne enzymatisch-aktivem TMPRSS2 zu etablieren. Des Weiteren wurde in Expressionsanalysen die physiologische Expression des TMPRSS2 im Gewebe des Huhns untersucht und ein polyklonaler Antikörper, der mit dem TMPRSS2 im Huhn kreuzreagiert, charakterisiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass TMPRSS2 in allen Geweben – besonders aber im Atmungs- und Gastrointestinaltrakt – exprimiert ist.

Außerdem wurde unter der Verwendung von TOCs die Wirksamkeit der beiden Serinprotease-Inhibitoren Aprotinin und Camostatmesilat getestet. Im Rahmen dieser Studie konnte ein positiver Effekt des Camostatmesilats im Zusammenhang von niedrigpathogenen aviären Influenza-Virus-Infektionen in TOCs gezeigt werden. Durch die Behandlung der TOCs mit dem Serinprotease-Inhibitor konnte eine längere Überlebensrate der TOCs, wie die Zilienaktivität zeigte, und eine reduzierte Virusreplikation im Vergleich zu den unbehandelten Proben nachgewiesen werden. In einem nächsten Schritt soll die optimale Konzentration des Inhibitors ermittelt werden, auch um nachfolgend die Wirkung des Camostatmesilats in *in vivo*-Infektionsstudien zu untersuchen.

Des Weiteren sollen – basierend auf den in dieser Arbeit erzeugten Keimzellen – *TMPRSS2*<sup>-/-</sup> Hühner generiert werden, um die Rolle dieser Serinprotease *in vivo* im Huhn im Detail zu analysieren. Die Hypothese ist, dass die genetisch veränderten Tiere eine reduzierte Empfänglichkeit gegenüber niedrig pathogenen aviären Influenza-Viren aufweisen.

Die Kombination aus der *in vivo*-Charakterisierung der natürlichen Rolle von TMPRSS2 im Huhn und den Infektionsexperimente mit *TMPRSS2*<sup>-/-</sup> Hühner bietet eine vielversprechende Grundlage, um das Potential von TMPRSS2 als therapeutisches Ziel für eine Strategie zur Reduzierung von Influenza-A-Virusinfektionen im Geflügel zu beurteilen.

# Abkürzungsverzeichnis

---

-	negativ für Marker
-/-	Homozygote genetische Veränderung
(-)ssRNA	einzelsträngige RNA, in der anti-sense Orientierung
(+)ssRNA	einzelsträngige RNA in sense-Orientierung
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	Ammoniumpersulfat
#	Nummer
%	Prozent
°C	Grad Celsius
+	positiv für Marker
+/-	Heterozygote genetische Modifikation
ACE2	Angiotensin-konvertierendes-Enzym 2
ALV	aviäre Leukose-Virus
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AUT	Österreich, Austria
BayBioMS Zentrum	Bayerisches Zentrum für Biomolekulare Massenspektrometrie
bp	Basenpaare
BPR	Barred Plymouth Rock
BSA	Bovines Serumalbumin
C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub>	Natriumacetat
ca.	circa
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
CAN	Canada
Cas9	CRISPR-associated protein 9
cDNA	komplementäre DNA
CEF	Hühner-Embryo-Fibroblasten, chicken embryonic fibroblasts
CH <sub>3</sub> COOH	Essigsäure
CHO	Chinese hamster ovary-Zellen
CH <sub>3</sub> OH	Methanol
chSerum	Hühner-Serum
chTMPRSS2	TMPRSS2 im Huhn
Cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CRISPR	clustered regularly interspaced palindromic repeat
cRNA	complementary (komplementäre) RNA
crRNA	CRISPR-RNA
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH <sub>2</sub> O	doppelt-destilliertes H <sub>2</sub> O
DESC	differentially expressed in squamous cell carcinoma
DF-1	Douglas Forstser
dH <sub>2</sub> O	destilliertes H <sub>2</sub> O
DMEM	Dublecco's Modified Eagle's Medium
DMSO, [(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO] <sub>2</sub>	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure/ deoxyribonucleic acid
DTT, C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	Dithiotreitol
ED	Embryonaltag, embryonic day
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	enhanced GFP
ERG	EST-related gene
EtOH	Ethanol

---

---

FACS	Durchflusszytometrie, Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS	fetales Kälberserum
FFU	Focus Forming Units
FFU/ml	Focus Forming Units pro Milliliter
FGF	Fibroblast-Growth-Factor
g	Gramm
GBA	4-Guanidinbenzoesäure
GBPA	4-(4-Guanidinbenzyloxy)-Phenyl-Essigsäure
gDNA	genomische DNA
GER	Deutschland, Germany
GFP	Grün fluoreszierendes Protein, green fluorescent protein
h	Stunde
HeLA	Henrietta Lacks
H&H	Hamburger Hamilton
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Borsäure
HA	Hämagglutinin
HAT	human airway trypsin-like protease
HCl	Salzsäure
HDR	homologe Rekombination, homology directed repair
HEK	humane embryonale Nierenzellen, human embryonic kidney cells
hpi	Stunden nach Infektion, hours post infection
HTE	humane Epithelzellen aus der Trachea
hTMPRSS2	humanes TMPRSS2
IBV	infektiöse Bronchitis-Viren
IFN	Interferon
IL-6	Interleukin 6
IMAC	immobilized metal affinity chromatography
INDEL	Insertion Deletion
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
JH	J-Segment der schweren Kette
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KO	Knock-out
L	Liter
LB	Lysogeny Broth
LDLRA	low-density lipoprotein receptor class A
LSL	Lohmann's selected Leghorn classic
M. gallisepticum	Mycoplasma gallisepticum
M1	Matrixprotein 1
M2	Matrixprotein 2
max.	maximal
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney Cells
MDV	Marek's Disease Viren
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
Mio.	Million
ml	Milliliter
MOI	Infektionsmultiplizität, Multiplicity of Infection
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometer
mTMPRSS2	murines TMPRSS2

---

---

NA	Neuramidase
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NDV	New Castle Disease Virus
NEAA	nicht essenzielle Aminosäuren
NeuAc α2,3Gal	N-Acetyl-Neuraminsäure-alpha2,3-Galaktose
NeuAc α2,6Gal	N-Acetyl-Neuraminsäure-alpha2,6-Galaktose
ng	Nanogramm
NHEJ	Nichthomologes Endjoining
Ni-NTA	Nitrilotriessigsäure
NP	Nukleoprotein
NS1	Nichtstrukturprotein 1
NS2	Nichtstrukturprotein 2
ORF	abweichender Leserahmen, open reading frame
PA	Polymerase acidic protein
PAM	Protospacer Adjacent Motif
PB1	Polymerase basic protein 1
PB2	Polymerase basic protein 2
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung/ Phosphate buffered saline
PC5/6	Proprotein Convertase 5/6
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pen/Srep	Penicillin/ Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PFU	Plaque forming Units
PGC	Primordiale Keimzelle, primordial germ cell
pmol	Pikomol
PPMO	peptide-conjugated phosphorodiamidate morpholino oligomers
RCAS	Replication competent ALV LTR with a splice
RNA	Ribonukleinsäure/ ribonucleic acid
RNP	Ribonukleoprotein
rpm	Umdrehungen pro Minute / rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
S-Protein	Spike-Protein
SCRC	Scavenger Receptor Cysteine-Rich
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Sek.	Sekunden
sgRNA	single-guide RNA
SOC	Super Optimal Broth mit Catabolit Unterdrückung
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TALENS	Transcription Activator-like Effector Nuclease
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED, C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub>	Tetramethylethylendiamin
TMPRSS2	Transmembran-Protease Serin S1 Subtyp 2
TNF <sub>α</sub>	Tumornekrosefaktor alpha
TOCs	tracheale Organkulturen
Tris, C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> xHCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTSP	Typ II Transmembran-Serinprotease
UK	Vereinigtes Königreich, United Kingdom
ÜN	über Nacht
USA	Vereinigte Staaten von Amerika, United States of America
V	Volt

---



---

vRNA	virale RNA
vRNP	virales RNP
WL	White Leghorn
WT	Wildtyp
X-Gal	(5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Beta-D-Galactopyranosid
$\alpha$	alpha
$\beta$	beta
$\lambda$	lambda
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mirkoliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer

---

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Influenza-A-Virus.....	10
Abbildung 2: Unterscheidung von niedrig- und hochpathogenen aviären Influenza-Viren .....	12
Abbildung 3: Replikationszyklus des Influenza-A-Virus .....	14
Abbildung 4: Spaltung des viralen HAs durch die Serinproteasen.....	15
Abbildung 5: Struktureller Aufbau des chTMPRSS2.....	18
Abbildung 6: 3D-Struktur des bovinen Aprotinin .....	21
Abbildung 7: Metabolisierung des Camostatmesilats.....	23
Abbildung 8: pX333-Hygro-sgRNA1458-sgRNA1459 (#243).....	51
Abbildung 9: pX333-Hygro-sgRNA1458-sgRNA1461 (#255).....	51
Abbildung 10: pX333-Hygro-sgRNA1460-sgRNA1459 (#256).....	51
Abbildung 11: pX333-Hygro-sgRNA1460-sgRNA1461 (#257).....	52
Abbildung 12: pX333-eGFP-sgRNA1460-sgRNA1461 (#303).....	52
Abbildung 13: pet45b(+)-chTMPRSS2 (#306) .....	52
Abbildung 14: pet45b(+)-chTMPRSS2-Exon 8-14 (#392).....	53
Abbildung 15: pGEM-T® Easy -TMPRSS2 LO #3-1 .....	53
Abbildung 16: Schematische Darstellung zur Bestimmung der Zilienaktivität.....	82
Abbildung 17: TOCs – Übersicht der Experimentaufbaus und der Probennahme.....	83
Abbildung 18: Immunisierung eines Kaninchens zur Herstellung eines polyklonalen anti-chTMPRSS2-Serums .....	85
Abbildung 19: Schematischer Aufbau der SDS-PAGE und der Nitrozellulose-Membran in der Gelkassette beim Tank-Blotting .....	88
Abbildung 20: Ubiquitäre Expression des <i>chTMPRSS2</i> in allen untersuchten Organen und DF-1 Zellen.....	91
Abbildung 21: Prinzip der PCR zum Nachweis eines KOs der TMPRSS2 Serinprotease-Domäne.....	92
Abbildung 22: Klonierung der sgRNA in den pX333-Hygromycin Backbone .....	94
Abbildung 23: Nachweis des TMPRSS2 KOs in DT40 Zellen.....	96
Abbildung 24: Klonierung des eGFP-pX333-sg1460-sg1461 Konstrukts .....	97
Abbildung 25: Genotypisierung für DF-1 Einzelzell-Klonen mit einem KO der TMPRSS2 Serinprotease-Domäne und der WT-DF-1 Zellen .....	99
Abbildung 26: Gating Strategie für den Sort auf eGFP-positive PGCs .....	100
Abbildung 27: Genotyping und Sequenzierung des PGC Einzelzell-Klons #3-1.....	102
Abbildung 28: Sexing der Chimären.....	103
Abbildung 29: Screening der Chimären-Sperma Proben auf einen TMPRSS2 KO ...	104
Abbildung 30: Genotypisierung der Tiere aus der Anpaarung des Chimären-Hahns und WT-Hennen zur Etablierung der <i>TMPRSS2<sup>-/-</sup></i> Linie .....	105
Abbildung 31: Klonierung des pet45b(+)- <i>chTMPRSS2</i> Konstrukts.....	106
Abbildung 32: Western Blot Analyse und Coomassie-Brilliant Blue R-250-Färbung der aufgereinigten His-chTMPRSS2 Proteinproben mit der Reaktionsbedingung 4.....	109

Abbildung 33: Strategie für die Produktion der Protein-Domäne von chTMPRSS2 Exon 8 bis 14.....	110
Abbildung 34: Klonierung des pET45b(+)- <i>chTMPRSS2</i> -Exon8-14 Konstrukts.....	111
Abbildung 35: Nachweis der erfolgreichen Expression von His- <i>chTMPRSS2</i> -Exon8-14 im Western Blot.....	112
Abbildung 36: Western Blot Analyse und Coomassie-Brilliant Blue R-250-Färbung der aufgereinigten His- <i>chTMPRSS2</i> -Exon8-14 Proteinproben unter der Reaktionsbedingung 2.....	113
Abbildung 37: MS-Analyse von His- <i>chTMPRSS2</i> -Exon8-14, Elution 6 .....	115
Abbildung 38: Homologie des humanen Antigens zur Proteinsequenz im Huhn .....	116
Abbildung 39: Immunfluoreszenz-Färbungen mit einem humanen TMPRSS2-Antikörper im Hühner-Gewebe .....	117
Abbildung 40: Analyse der Zilienaktivität nicht-infizierter TOCs nach einer Aprotinin oder Camostatmesilat-Behandlung .....	119
Abbildung 41: Zilienaktivität bei der Infektion der TOCs mit H9N2 und ungespaltenem HA0 .....	121
Abbildung 42: Virustiter bei der Infektion der TOCs mit H9N2 und ungespaltenem HA0 .....	123
Abbildung 43: Immunfluoreszenz-Färbung der TOCs gegen das Influenza-A-Viren im Zusammenhang einer H9N2 Infektion mit ungespaltenem HA0 .....	124
Abbildung 44: Zilienaktivität bei der Infektion der TOCs mit H9N2 mit gespaltenem HA .....	126
Abbildung 45: Virustiter bei der Infektion der TOCs mit H9N2 und gespaltenem HA .....	127
Abbildung 46: Zilienaktivität bei der Infektion der TOCs mit 10 <sup>4</sup> FFU/TOC WSN .....	128
Abbildung 47: Virustiter bei der Infektion der TOCs mit 10 <sup>4</sup> FFU/TOC H1N1 .....	129
Abbildung 48: Immunfluoreszenz-Färbung der TOCs gegen das Influenza-A-Virus im Zusammenhang einer H1N1 Infektion mit ungespaltenem HA0 .....	130
Abbildung 49: Zilienaktivität bei der Infektion der TOCs mit H6N8 und ungespaltenem HA0 .....	131
Abbildung 50: Virustiter bei der Infektion der TOCs mit H6N8 mit ungespaltenem HA0 .....	132
Abbildung 51: Immunfluoreszenz-Färbung der TOCs gegen das Influenza-A-Virus im Zusammenhang einer H6N8 Infektion mit ungespaltenem HA0 .....	133
Abbildung 52: Zilienaktivität bei der Infektion der TOCs mit H6N8 mit gespaltenem HA .....	134
Abbildung 53: Virustiter bei der Infektion der TOCs mit H6N8 mit gespaltenem HA0 .....	135

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte mit Herstellerinformation .....	29
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Herstellerinformationen .....	31
Tabelle 3: Verwendete und generierte Hühnerlinien .....	32
Tabelle 4: Verwendete Zellen in der Zellkultur .....	32
Tabelle 5: Verwendete Bakterien .....	33
Tabelle 6: Verwendete Virenstämme .....	33
Tabelle 7: Verwendete Zusätze für die Zellkultur mit Herstellerinformationen .....	33
Tabelle 8: Verwendete Zusätze in die Molekularbiologie mit Herstellerinformationen .....	34
Tabelle 9: Verwendete Zusätze für die Histologie mit Herstellerinformationen .....	35
Tabelle 10: Verwendete Chemikalien und Zusätze für die Produktion und Aufreinigung von Proteinen mit Herstellerinformationen .....	35
Tabelle 11: Zusammensetzung des Manipulation Mediums .....	36
Tabelle 12: Zusammensetzung des DT40-Mediums .....	36
Tabelle 13: Zusammensetzung des PGC-Mediums .....	36
Tabelle 14: Zusammensetzung des MDCK-Mediums .....	36
Tabelle 15: Zusammensetzung des DF-1 Medium .....	37
Tabelle 16: Zusammensetzung des TOC-Mediums .....	37
Tabelle 17: Rezept für die Herstellung von PBS .....	37
Tabelle 18: Zusammensetzung des 1x Trypsins .....	37
Tabelle 19: Zusammensetzung der Hygromycin-Stock Lösung .....	37
Tabelle 20: Zusammensetzung der 4 % PFA/PBS-Lösung .....	37
Tabelle 21: Zusammensetzung von PBS/EDTA .....	38
Tabelle 22: Rezept für die Herstellung von PBS-T .....	38
Tabelle 23: Rezept für die Herstellung des STM-Puffers .....	38
Tabelle 24: Rezept für die Herstellung des TEN-Puffers .....	38
Tabelle 25: Rezept für die Herstellung der Pronase E .....	38
Tabelle 26: Rezept für die Herstellung des Tissue Lysis Buffers .....	39
Tabelle 27: Rezept für die Herstellung von 10x TBE-Puffer .....	39
Tabelle 28: Rezept für die Herstellung von 50x TAE-Puffer .....	39
Tabelle 29: Rezept für die Herstellung von Orange G .....	39
Tabelle 30: Rezept für die Herstellung des 1kb Leiter .....	39
Tabelle 31: Rezept für die Herstellung von LB-Medium .....	40
Tabelle 32: Rezept für die Herstellung von LB-Agar .....	40
Tabelle 33: Rezept für die Herstellung von Ampicillin .....	40
Tabelle 34: Rezept für die Herstellung von IPTG .....	40
Tabelle 35: Rezept für die Herstellung von X-Gal .....	40
Tabelle 36: Rezept für die Herstellung von 1M PBS/Glycin .....	40
Tabelle 37: Rezept für die Herstellung der SBSS Stock Solution .....	41
Tabelle 38: Rezept für die Herstellung der WBSS Stock Solution .....	41

Tabelle 39: Rezept für die Herstellung der EBSS Stock Lösungen .....	41
Tabelle 40: Rezept für die Herstellung der Puffer für die Proteinaufreinigung mit den Stock-Lösungen .....	41
Tabelle 41: Rezept für die Herstellung des Puffer Fs.....	41
Tabelle 42: Rezept für die Herstellung des Column Storage Puffers.....	42
Tabelle 43: Rezept für die Herstellung von nicht reduzierendem 6x Laemmli .....	42
Tabelle 44: Rezept für die Herstellung des 5x Gelelektrophorese-Puffers .....	42
Tabelle 45: Rezept für die Herstellung des Towbin Puffers .....	42
Tabelle 46: Rezept für die Herstellung der Entwicklerlösung ECL A .....	42
Tabelle 47: Rezept für die Herstellung der Entwicklerlösung ECL B .....	42
Tabelle 48: Rezept für die Herstellung von APS .....	43
Tabelle 49: Rezept für die Herstellung der Coomassie-Brilliant Blue R-250 Färbelösung .....	43
Tabelle 50: Rezept für die Herstellung der Entfärbelösung nach einer Coomassie-Brilliant Blue R-250-Färbung .....	43
Tabelle 51: Verwendete Restriktionsenzyme mit Herstellerinformationen .....	43
Tabelle 52: Verwendete Enzyme, Puffer und Chemikalien mit Herstellerinformationen .....	43
Tabelle 53: Verwendete Antikörper .....	44
Tabelle 54: Verwendete Kits .....	44
Tabelle 55: Primer Liste .....	46
Tabelle 56: Verwendete Oligonukleotide.....	47
Tabelle 57: Verwendete Konstrukte in dieser Arbeit .....	48
Tabelle 58: Generierte Konstrukte in dieser Arbeit .....	48
Tabelle 59: Verwendete Software .....	54
Tabelle 60: Reaktionszusammensetzung für das Viafect™ Transfection Reagent.....	59
Tabelle 61: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die cDNA-Synthese .....	65
Tabelle 62: Temperaturprogramm cDNA Synthese .....	65
Tabelle 63: Reaktionszusammensetzung für den FIREpol® DNA Polymerase Mastermix .....	66
Tabelle 64: Temperaturprogramm für den FIREpol® DNA Polymerase Mastermix .....	66
Tabelle 65: Reaktionszusammensetzung für den HOT FIREpol® DNA Polymerase Mastermix.....	67
Tabelle 66: Temperaturprogramm für den HOT FIREpol® DNA Polymerase Mastermix .....	67
Tabelle 67: Reaktionszusammensetzung für die Q5® High-Fidelity DNA Polymerase .....	67
Tabelle 68: Temperaturprogramm für die Q5® High-Fidelity DNA Polymerase .....	68
Tabelle 69: Reaktionszusammensetzung für die LongAmp® Taq DNA Polymerase ...	68
Tabelle 70: Temperaturprogramm für die LongAmp® Taq DNA Polymerase.....	68
Tabelle 71: Zusammensetzung des Agarose-Gels .....	71
Tabelle 72: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Ligation in den pGEM-T® Easy Vektor .....	72

Tabelle 73: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für den NEBuilder® HiFi DNA Assembly Mastermix .....	73
Tabelle 74: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Phosphorylierung und das Annealing der Oligonukleotide.....	73
Tabelle 75: Temperaturprogramm für die Phosphorylierung und das Annealing der Oligonukleotide.....	74
Tabelle 76: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für den Verdau des Backbones und die Ligation .....	74
Tabelle 77: Temperaturprogramm für den Verdau und die Ligation .....	74
Tabelle 78: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die PlasmidSafe Reaktion .....	74
Tabelle 79: Bakterienstämme der verschiedenen Klonierungsstrategien .....	75
Tabelle 80: Inkubationszeiten der verschiedenen Klonierungsstrategien .....	75
Tabelle 81: Mastermix für die Beschichtung der LB-Amp-Platten.....	76
Tabelle 82: Reaktionszusammensetzung für einen Restriktionsverdau.....	78
Tabelle 83: Reaktionsansatz für die Sanger-Sequenzierung mit dem Mix2Seq ON Kit .....	79
Tabelle 84: Zusammensetzung des SDS-Gels .....	87
Tabelle 85: Reaktionsansatz der Proteinproben in 1x Laemmli.....	87
Tabelle 86: Proteinmarker .....	87
Tabelle 87: On- und Off-Target-Scores der verwendeten sgRNAs.....	93
Tabelle 88: Genotypisierung von DF-1 + #257 Einzelzell-Klonen.....	98
Tabelle 89: Genotypisierung der PGC Einzelzell-Klone.....	100
Tabelle 90: Screening der Chimären auf den KO der TMPRSS2 Serinprotease-Domäne .....	104
Tabelle 91: Verwendete Reaktionsbedingungen zur Aufreinigung des His-chTMPRSS2 aus <i>E. Coli</i> BL21(DE3) .....	107
Tabelle 92: Virustiter mit ungespaltenem HA0 .....	118

# Literaturverzeichnis

1. Xie, L., et al., *Derivation of chicken primordial germ cells using an indirect Co-culture system*. Theriogenology, 2019. **123**: p. 83-89.
2. Salter, A.M., *The effects of meat consumption on global health*. Rev Sci Tech, 2018. **37**(1): p. 47-55.
3. Ballantyne, M., et al., *Direct allele introgression into pure chicken breeds using Sire Dam Surrogate (SDS) mating*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 659.
4. Alexandratos, N. and J. Bruinsma, *World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision*. 2012.
5. Eshel, G., et al., *A model for 'sustainable' US beef production*. Nat Ecol Evol, 2018. **2**(1): p. 81-85.
6. Gerbens-Leenes, P.W., M.M. Mekonnen, and A.Y. Hoekstra, *The water footprint of poultry, pork and beef: A comparative study in different countries and production systems*. Water resources and industry, 2013. **1**: p. 25-36.
7. Ivarie, R., *Avian transgenesis: progress towards the promise*. Trends Biotechnol, 2003. **21**(1): p. 14-9.
8. Mozdziak, P.E. and J.N. Petitte, *Status of transgenic chicken models for developmental biology*. Dev Dyn, 2004. **229**(3): p. 414-21.
9. Bestle, D., et al., *Hemagglutinins of Avian Influenza Viruses Are Proteolytically Activated by TMPRSS2 in Human and Murine Airway Cells*. J Virol, 2021. **95**(20): p. e0090621.
10. Hagag, I.T., et al., *Abrogation of Marek's disease virus replication using CRISPR/Cas9*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 10919.
11. Winter, C., G. Herrler, and U. Neumann, *Infection of the tracheal epithelium by infectious bronchitis virus is sialic acid dependent*. Microbes Infect, 2008. **10**(4): p. 367-73.
12. Holmes, E.C., et al., *Whole-genome analysis of human influenza A virus reveals multiple persistent lineages and reassortment among recent H3N2 viruses*. PLoS Biol, 2005. **3**(9): p. e300.
13. Kovalenko, G., et al., *Serological Evidence for Influenza A Viruses Among Domestic Dogs and Cats in Kyiv, Ukraine*. Vector Borne Zoonotic Dis, 2021. **21**(7): p. 483-489.
14. Sid, H., et al., *Interaction of Influenza A Viruses with Oviduct Explants of Different Avian Species*. Front Microbiol, 2017. **8**: p. 1338.
15. Bodewes, R., et al., *Avian Influenza A(H10N7) virus-associated mass deaths among harbor seals*. Emerg Infect Dis, 2015. **21**(4): p. 720-2.
16. Gray, G.C., D.W. Trampel, and J.A. Roth, *Pandemic influenza planning: shouldn't swine and poultry workers be included?* Vaccine, 2007. **25**(22): p. 4376-81.
17. Webster, R.G., et al., *Evolution and ecology of influenza A viruses*. Microbiol Rev, 1992. **56**(1): p. 152-79.
18. Smith, J., et al., *A comparative analysis of host responses to avian influenza infection in ducks and chickens highlights a role for the interferon-induced transmembrane proteins in viral resistance*. BMC Genomics, 2015. **16**(1): p. 574.
19. Putri, W., et al., *Economic burden of seasonal influenza in the United States*. Vaccine, 2018. **36**(27): p. 3960-3966.
20. Reid, A.H. and J.K. Taubenberger, *The origin of the 1918 pandemic influenza virus: a continuing enigma*. J Gen Virol, 2003. **84**(Pt 9): p. 2285-2292.
21. Tumpey, T.M., et al., *A two-amino acid change in the hemagglutinin of the 1918 influenza virus abolishes transmission*. Science, 2007. **315**(5812): p. 655-9.

22. Hoffmann, M., et al., *Camostat mesylate inhibits SARS-CoV-2 activation by TMPRSS2-related proteases and its metabolite GBPA exerts antiviral activity*. EBioMedicine, 2021. **65**: p. 103255.
23. Hoffmann, M., et al., *SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor*. Cell, 2020. **181**(2): p. 271-280 e8.
24. Taubenberger, J.K. and D.M. Morens, *1918 Influenza: the mother of all pandemics*. Emerg Infect Dis, 2006. **12**(1): p. 15-22.
25. Wahl, A., et al., *SARS-CoV-2 infection is effectively treated and prevented by EIDD-2801*. Nature, 2021. **591**(7850): p. 451-457.
26. Tumpey, T.M., et al., *Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus*. Science, 2005. **310**(5745): p. 77-80.
27. Dawood, F.S., et al., *Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study*. Lancet Infect Dis, 2012. **12**(9): p. 687-95.
28. Böttcher-Friebertshauser, E., et al., *Cleavage of influenza virus hemagglutinin by airway proteases TMPRSS2 and HAT differs in subcellular localization and susceptibility to protease inhibitors*. J Virol, 2010. **84**(11): p. 5605-14.
29. Zhirnov, O.P., et al., *Aprotinin, a protease inhibitor, suppresses proteolytic activation of pandemic H1N1v influenza virus*. Antivir Chem Chemother, 2011. **21**(4): p. 169-74.
30. Böttcher-Friebertshauser, E., et al., *Inhibition of influenza virus infection in human airway cell cultures by an antisense peptide-conjugated morpholino oligomer targeting the hemagglutinin-activating protease TMPRSS2*. J Virol, 2011. **85**(4): p. 1554-62.
31. Böttcher, E., et al., *Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium*. J Virol, 2006. **80**(19): p. 9896-8.
32. Bright, R.A., et al., *Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern*. Lancet, 2005. **366**(9492): p. 1175-81.
33. Shiraki, K. and T. Daikoku, *Favipiravir, an anti-influenza drug against life-threatening RNA virus infections*. Pharmacol Ther, 2020. **209**: p. 107512.
34. Song, E.J., et al., *Inhibitory effects of aprotinin on influenza A and B viruses in vitro and in vivo*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 9427.
35. Pennisi, E., *The CRISPR craze*. Science, 2013. **341**(6148): p. 833-6.
36. Kim, T.S., et al., *Phenotypic analysis of mice lacking the Tmprss2-encoded protease*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(3): p. 965-75.
37. Sakai, K., et al., *The host protease TMPRSS2 plays a major role in in vivo replication of emerging H7N9 and seasonal influenza viruses*. J Virol, 2014. **88**(10): p. 5608-16.
38. Hatesuer, B., et al., *Tmprss2 is essential for influenza H1N1 virus pathogenesis in mice*. PLoS Pathog, 2013. **9**(12): p. e1003774.
39. Tarnow, C., et al., *TMPRSS2 is a host factor that is essential for pneumotropism and pathogenicity of H7N9 influenza A virus in mice*. J Virol, 2014. **88**(9): p. 4744-51.
40. Ovcharenko, A.V. and O.P. Zhirnov, *Aprotinin aerosol treatment of influenza and paramyxovirus bronchopneumonia of mice*. Antiviral Res, 1994. **23**(2): p. 107-18.
41. Yamaya, M., et al., *The serine protease inhibitor camostat inhibits influenza virus replication and cytokine production in primary cultures of human tracheal epithelial cells*. Pulm Pharmacol Ther, 2015. **33**: p. 66-74.
42. Hosoya, M., et al., *Comparative inhibitory effects of various nucleoside and nonnucleoside analogues on replication of influenza virus types A and B in vitro and in ovo*. J Infect Dis, 1993. **168**(3): p. 641-6.



43. Van Boeckel, T.P., et al., *Improving risk models for avian influenza: the role of intensive poultry farming and flooded land during the 2004 Thailand epidemic*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e49528.
44. Saito, T., et al., *Emergence of a potentially pathogenic H5N2 influenza virus in chickens*. Virology, 1994. **201**(2): p. 277-84.
45. Mohamed, N.S., et al., *Genetic and antigenic characterization of avian influenza H9N2 viruses during 2016 in Iraq*. Open Vet J, 2019. **9**(2): p. 164-171.
46. Doudna, J.A. and E. Charpentier, *Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9*. Science, 2014. **346**(6213): p. 1258096.
47. Sid, H., et al., *Mycoplasma gallisepticum modifies the pathogenesis of influenza A virus in the avian tracheal epithelium*. Int J Med Microbiol, 2016. **306**(3): p. 174-86.
48. Hause, B.M., et al., *Characterization of a novel influenza virus in cattle and Swine: proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family*. mBio, 2014. **5**(2): p. e00031-14.
49. Leahy, M.B., et al., *The fourth genus in the Orthomyxoviridae: sequence analyses of two Thogoto virus polymerase proteins and comparison with influenza viruses*. Virus Res, 1997. **50**(2): p. 215-24.
50. Kibenge, F.S., et al., *Characterization of gene expression on genomic segment 7 of infectious salmon anaemia virus*. Virol J, 2007. **4**: p. 34.
51. Sameroff, S., et al., *Novel quaranjavirus and other viral sequences identified from ticks parasitizing hunted wildlife in Trinidad and Tobago*. Ticks Tick Borne Dis, 2021. **12**(4): p. 101730.
52. Neumann, G., T. Noda, and Y. Kawaoka, *Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus*. Nature, 2009. **459**(7249): p. 931-9.
53. Lindstrom, S.E., N.J. Cox, and A. Klimov, *Genetic analysis of human H2N2 and early H3N2 influenza viruses, 1957-1972: evidence for genetic divergence and multiple reassortment events*. Virology, 2004. **328**(1): p. 101-19.
54. Desselberger, U., et al., *The 3' and 5'-terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity*. Gene, 1980. **8**(3): p. 315-28.
55. Chiapponi, C., et al., *Detection of Influenza D Virus among Swine and Cattle, Italy*. Emerg Infect Dis, 2016. **22**(2): p. 352-4.
56. Kumar, B., et al., *The emerging influenza virus threat: status and new prospects for its therapy and control*. Arch Virol, 2018. **163**(4): p. 831-844.
57. Baron, J., et al., *Matriptase, HAT, and TMPRSS2 activate the hemagglutinin of H9N2 influenza A viruses*. J Virol, 2013. **87**(3): p. 1811-20.
58. Valesano, A.L., et al., *Influenza B Viruses Exhibit Lower Within-Host Diversity than Influenza A Viruses in Human Hosts*. J Virol, 2020. **94**(5).
59. Collin, E.A., et al., *Cocirculation of two distinct genetic and antigenic lineages of proposed influenza D virus in cattle*. J Virol, 2015. **89**(2): p. 1036-42.
60. Webster, R.G., et al., *Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks*. Virology, 1978. **84**(2): p. 268-78.
61. Grayson, M.L., et al., *Efficacy of soap and water and alcohol-based hand-rub preparations against live H1N1 influenza virus on the hands of human volunteers*. Clin Infect Dis, 2009. **48**(3): p. 285-91.
62. Gralton, J., et al., *The role of particle size in aerosolised pathogen transmission: a review*. J Infect, 2011. **62**(1): p. 1-13.
63. Bouvier, N.M. and P. Palese, *The biology of influenza viruses*. Vaccine, 2008. **26 Suppl 4**(Suppl 4): p. D49-53.
64. Chen, W., et al., *A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death*. Nat Med, 2001. **7**(12): p. 1306-12.
65. Wise, H.M., et al., *A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA*. J Virol, 2009. **83**(16): p. 8021-31.

66. Jagger, B.W., et al., *An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response*. Science, 2012. **337**(6091): p. 199-204.
67. Muramoto, Y., et al., *Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA*. J Virol, 2013. **87**(5): p. 2455-62.
68. Wise, H.M., et al., *Identification of a novel splice variant form of the influenza A virus M2 ion channel with an antigenically distinct ectodomain*. PLoS Pathog, 2012. **8**(11): p. e1002998.
69. Selman, M., et al., *Adaptive mutation in influenza A virus non-structural gene is linked to host switching and induces a novel protein by alternative splicing*. Emerg Microbes Infect, 2012. **1**(11): p. e42.
70. Zhirnov, O.P., et al., *Segment NS of influenza A virus contains an additional gene NSP in positive-sense orientation*. Dokl Biochem Biophys, 2007. **414**: p. 127-33.
71. Mostafa, A., et al., *Zoonotic Potential of Influenza A Viruses: A Comprehensive Overview*. Viruses, 2018. **10**(9).
72. Skehel, J.J. and D.C. Wiley, *Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin*. Annu Rev Biochem, 2000. **69**: p. 531-69.
73. Wilson, I.A., J.J. Skehel, and D.C. Wiley, *Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution*. Nature, 1981. **289**(5796): p. 366-73.
74. Kilbourne, E.D., B.E. Johansson, and B. Grajower, *Independent and disparate evolution in nature of influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase glycoproteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(2): p. 786-90.
75. Webster, R.G., W.G. Laver, and E.D. Kilbourne, *Reactions of antibodies with surface antigens of influenza virus*. J Gen Virol, 1968. **3**(3): p. 315-26.
76. Ito, T. and Y. Kawaoka, *Host-range barrier of influenza A viruses*. Vet Microbiol, 2000. **74**(1-2): p. 71-5.
77. Ito, T., et al., *Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential*. J Virol, 1998. **72**(9): p. 7367-73.
78. Kida, H., et al., *Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs*. J Gen Virol, 1994. **75** ( Pt 9): p. 2183-8.
79. Thontiravong, A., et al., *Quail as a potential mixing vessel for the generation of new reassortant influenza A viruses*. Vet Microbiol, 2012. **160**(3-4): p. 305-13.
80. Chothe, S.K., et al., *Avian and human influenza virus compatible sialic acid receptors in little brown bats*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 660.
81. Matrosovich, M., et al., *Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals*. J Virol, 2000. **74**(18): p. 8502-12.
82. Air, G.M., *Influenza neuraminidase*. Influenza Other Respir Viruses, 2012. **6**(4): p. 245-56.
83. Air, G.M. and W.G. Laver, *The neuraminidase of influenza virus*. Proteins, 1989. **6**(4): p. 341-56.
84. Peukes, J., et al., *The native structure of the assembled matrix protein 1 of influenza A virus*. Nature, 2020. **587**(7834): p. 495-498.
85. Dahmani, I., K. Ludwig, and S. Chiantia, *Influenza A matrix protein M1 induces lipid membrane deformation via protein multimerization*. Biosci Rep, 2019. **39**(8).
86. Vorobjev, Y.N., *An effective molecular blocker of ion channel of M2 protein as anti-influenza a drug*. J Biomol Struct Dyn, 2021. **39**(7): p. 2352-2363.
87. Pereira, C.F., et al., *Influenza A Virus NS1 Protein Promotes Efficient Nuclear Export of Unspliced Viral M1 mRNA*. J Virol, 2017. **91**(15).
88. Robb, N.C., et al., *NS2/NEP protein regulates transcription and replication of the influenza virus RNA genome*. J Gen Virol, 2009. **90**(Pt 6): p. 1398-1407.
89. Turrell, L., et al., *The role and assembly mechanism of nucleoprotein in influenza A virus ribonucleoprotein complexes*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 1591.

90. Short, K.R., et al., *One health, multiple challenges: The inter-species transmission of influenza A virus*. *One Health*, 2015. **1**: p. 1-13.
91. Mehle, A., *Unusual influenza A viruses in bats*. *Viruses*, 2014. **6**(9): p. 3438-49.
92. Wu, Y., et al., *Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11*. *Trends Microbiol*, 2014. **22**(4): p. 183-91.
93. Tong, S., et al., *A distinct lineage of influenza A virus from bats*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(11): p. 4269-74.
94. Höfle, U., et al., *Tissue tropism and pathology of natural influenza virus infection in black-headed gulls (*Chroicocephalus ridibundus*)*. *Avian Pathol*, 2012. **41**(6): p. 547-53.
95. Okamatsu, M., et al., *Low pathogenicity H5N2 avian influenza outbreak in Japan during the 2005-2006*. *Vet Microbiol*, 2007. **124**(1-2): p. 35-46.
96. Reperant, L.A., T. Kuiken, and A.D. Osterhaus, *Influenza viruses: from birds to humans*. *Hum Vaccin Immunother*, 2012. **8**(1): p. 7-16.
97. Short, K.R., et al., *Influenza virus and endothelial cells: a species specific relationship*. *Front Microbiol*, 2014. **5**: p. 653.
98. Stieneke-Gröber, A., et al., *Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease*. *EMBO J*, 1992. **11**(7): p. 2407-14.
99. Horimoto, T. and Y. Kawaoka, *Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents*. *Nat Rev Microbiol*, 2005. **3**(8): p. 591-600.
100. Treanor, J., *Influenza vaccine--outmaneuvering antigenic shift and drift*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(3): p. 218-20.
101. Schweiger, B., I. Zadow, and R. Heckler, *Antigenic drift and variability of influenza viruses*. *Med Microbiol Immunol*, 2002. **191**(3-4): p. 133-8.
102. Böttcher-Friebertshauer, E., et al., *The hemagglutinin: a determinant of pathogenicity*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2014. **385**: p. 3-34.
103. Huang, Q., et al., *Early steps of the conformational change of influenza virus hemagglutinin to a fusion active state: stability and energetics of the hemagglutinin*. *Biochim Biophys Acta*, 2003. **1614**(1): p. 3-13.
104. Pinto, L.H. and R.A. Lamb, *The M2 proton channels of influenza A and B viruses*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(14): p. 8997-9000.
105. Crow, M., et al., *Mutational analysis of the influenza virus cRNA promoter and identification of nucleotides critical for replication*. *J Virol*, 2004. **78**(12): p. 6263-70.
106. Boulo, S., et al., *Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes*. *Virus Res*, 2007. **124**(1-2): p. 12-21.
107. Hay, A.J., J.J. Skehel, and J. McCauley, *Characterization of influenza virus RNA complete transcripts*. *Virology*, 1982. **116**(2): p. 517-22.
108. Flick, R., et al., *Promoter elements in the influenza vRNA terminal structure*. *RNA*, 1996. **2**(10): p. 1046-57.
109. Shapiro, G.I., T. Gurney, Jr., and R.M. Krug, *Influenza virus gene expression: control mechanisms at early and late times of infection and nuclear-cytoplasmic transport of virus-specific RNAs*. *J Virol*, 1987. **61**(3): p. 764-73.
110. Baudin, F., et al., *In vitro dissection of the membrane and RNP binding activities of influenza virus M1 protein*. *Virology*, 2001. **281**(1): p. 102-8.
111. Burgui, I., et al., *PABP1 and eIF4GI associate with influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes*. *J Gen Virol*, 2003. **84**(Pt 12): p. 3263-3274.
112. Iwatsuki-Horimoto, K., et al., *The cytoplasmic tail of the influenza A virus M2 protein plays a role in viral assembly*. *J Virol*, 2006. **80**(11): p. 5233-40.
113. Palese, P., et al., *Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase*. *Virology*, 1974. **61**(2): p. 397-410.
114. Yan, N. and Z.J. Chen, *Intrinsic antiviral immunity*. *Nat Immunol*, 2012. **13**(3): p. 214-22.

115. Herold, S., et al., *Influenza virus-induced lung injury: pathogenesis and implications for treatment*. Eur Respir J, 2015. **45**(5): p. 1463-78.
116. Rajão, D.S. and D.R. Pérez, *Universal Vaccines and Vaccine Platforms to Protect against Influenza Viruses in Humans and Agriculture*. Front Microbiol, 2018. **9**: p. 123.
117. Shen, L.W., et al., *TMPRSS2: A potential target for treatment of influenza virus and coronavirus infections*. Biochimie, 2017. **142**: p. 1-10.
118. Lee, M.G., et al., *Evaluation of anti-influenza effects of camostat in mice infected with non-adapted human influenza viruses*. Arch Virol, 1996. **141**(10): p. 1979-89.
119. Böttcher-Friebertshauer, E., H.D. Klenk, and W. Garten, *Activation of influenza viruses by proteases from host cells and bacteria in the human airway epithelium*. Pathog Dis, 2013. **69**(2): p. 87-100.
120. Limburg, H., et al., *TMPRSS2 Is the Major Activating Protease of Influenza A Virus in Primary Human Airway Cells and Influenza B Virus in Human Type II Pneumocytes*. J Virol, 2019. **93**(21).
121. Deom, C.M. and I.T. Schulze, *Oligosaccharide composition of an influenza virus hemagglutinin with host-determined binding properties*. J Biol Chem, 1985. **260**(27): p. 14771-4.
122. Kaverin, N.V. and H.D. Klenk, *Strain-specific differences in the effect of influenza A virus neuraminidase on vector-expressed hemagglutinin*. Arch Virol, 1999. **144**(4): p. 781-6.
123. Skehel, J.J., et al., *A carbohydrate side chain on hemagglutinins of Hong Kong influenza viruses inhibits recognition by a monoclonal antibody*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(6): p. 1779-83.
124. Roberts, P.C., W. Garten, and H.D. Klenk, *Role of conserved glycosylation sites in maturation and transport of influenza A virus hemagglutinin*. J Virol, 1993. **67**(6): p. 3048-60.
125. Bugge, T.H., T.M. Antalis, and Q. Wu, *Type II transmembrane serine proteases*. J Biol Chem, 2009. **284**(35): p. 23177-81.
126. Szabo, R. and T.H. Bugge, *Type II transmembrane serine proteases in development and disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(6-7): p. 1297-316.
127. Bestle, D., et al., *TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells*. Life Sci Alliance, 2020. **3**(9).
128. Gunne, S., et al., *TMPRSS2 Impacts Cytokine Expression in Murine Dendritic Cells*. Biomedicines, 2023. **11**(2): p. 419.
129. Zang, R., et al., *TMPRSS2 and TMPRSS4 promote SARS-CoV-2 infection of human small intestinal enterocytes*. Sci Immunol, 2020. **5**(47).
130. Paoloni-Giacobino, A., et al., *Cloning of the TMPRSS2 gene, which encodes a novel serine protease with transmembrane, LDLRA, and SRCR domains and maps to 21q22.3*. Genomics, 1997. **44**(3): p. 309-20.
131. Brown, M.S., J. Herz, and J.L. Goldstein, *LDL-receptor structure. Calcium cages, acid baths and recycling receptors*. Nature, 1997. **388**(6643): p. 629-30.
132. Aruffo, A., et al., *CD6-ligand interactions: a paradigm for SRCR domain function?* Immunol Today, 1997. **18**(10): p. 498-504.
133. Hedstrom, L., *Serine protease mechanism and specificity*. Chem Rev, 2002. **102**(12): p. 4501-24.
134. Hooper, J.D., et al., *Type II transmembrane serine proteases. Insights into an emerging class of cell surface proteolytic enzymes*. J Biol Chem, 2001. **276**(2): p. 857-60.
135. Donaldson, S.H., et al., *Regulation of the epithelial sodium channel by serine proteases in human airways*. J Biol Chem, 2002. **277**(10): p. 8338-45.
136. Vaarala, M.H., et al., *Expression of transmembrane serine protease TMPRSS2 in mouse and human tissues*. J Pathol, 2001. **193**(1): p. 134-40.

137. Lapointe, J., et al., *A variant TMPRSS2 isoform and ERG fusion product in prostate cancer with implications for molecular diagnosis*. *Mod Pathol*, 2007. **20**(4): p. 467-73.
138. Mollica, V., A. Rizzo, and F. Massari, *The pivotal role of TMPRSS2 in coronavirus disease 2019 and prostate cancer*. *Future Oncol*, 2020. **16**(27): p. 2029-2033.
139. Zmora, P., et al., *TMPRSS2 Isoform 1 Activates Respiratory Viruses and Is Expressed in Viral Target Cells*. *PLoS One*, 2015. **10**(9): p. e0138380.
140. Bentum, K., et al., *Molecular phylogeny of coronaviruses and host receptors among domestic and close-contact animals reveals subgenome-level conservation, crossover, and divergence*. *BMC Vet Res*, 2022. **18**(1): p. 124.
141. Jackson, A.O. and Z. Li, *Developments in Plant Negative-Strand RNA Virus Reverse Genetics*. *Annu Rev Phytopathol*, 2016. **54**: p. 469-98.
142. Ge, Q., et al., *Inhibition of multiple subtypes of influenza A virus in cell cultures with morpholino oligomers*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006. **50**(11): p. 3724-33.
143. Lupfer, C., et al., *Inhibition of influenza A H3N8 virus infections in mice by morpholino oligomers*. *Arch Virol*, 2008. **153**(5): p. 929-37.
144. Whitworth, K.M., et al., *Zygote injection of CRISPR/Cas9 RNA successfully modifies the target gene without delaying blastocyst development or altering the sex ratio in pigs*. *Transgenic Res*, 2017. **26**(1): p. 97-107.
145. Lambertz, R.L.O., et al., *Tmprss2 knock-out mice are resistant to H10 influenza A virus pathogenesis*. *J Gen Virol*, 2019. **100**(7): p. 1073-1078.
146. Zhong, G.-Y., et al., *Commercial production of aprotinin in transgenic maize seeds*. *Molecular Breeding*, 1999. **5**(4): p. 345-356.
147. Sun, Z., et al., *Expression, purification and characterization of aprotinin and a human analogue of aprotinin*. *Protein Expr Purif*, 2009. **65**(2): p. 238-43.
148. Fritz, H. and G. Wunderer, *Biochemistry and applications of aprotinin, the kallikrein inhibitor from bovine organs*. *Arzneimittelforschung*, 1983. **33**(4): p. 479-94.
149. Bojkova, D., et al., *Aprotinin Inhibits SARS-CoV-2 Replication*. *Cells*, 2020. **9**(11).
150. Midgley, I., et al., *Metabolic fate of 14C-camostat mesylate in man, rat and dog after intravenous administration*. *Xenobiotica*, 1994. **24**(1): p. 79-92.
151. Weiss, J., G. Bajraktari-Sylejmani, and W.E. Haefeli, *Low risk of the TMPRSS2 inhibitor camostat mesylate and its metabolite GBPA to act as perpetrators of drug-drug interactions*. *Chem Biol Interact*, 2021. **338**: p. 109428.
152. Garten, W., et al., *Proteolytic activation of the influenza virus hemagglutinin: The structure of the cleavage site and the enzymes involved in cleavage*. *Virology*, 1981. **115**(2): p. 361-74.
153. McGrew, M.J., et al., *Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors*. *EMBO Rep*, 2004. **5**(7): p. 728-33.
154. Schusser, B., et al., *Immunoglobulin knockout chickens via efficient homologous recombination in primordial germ cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(50): p. 20170-5.
155. Kheimar, A., et al., *A Genetically Engineered Commercial Chicken Line Is Resistant to Highly Pathogenic Avian Leukosis Virus Subgroup J*. *Microorganisms*, 2021. **9**(5).
156. Lyall, J., et al., *Suppression of avian influenza transmission in genetically modified chickens*. *Science*, 2011. **331**(6014): p. 223-6.
157. Hellmich, R., et al., *Acquiring Resistance Against a Retroviral Infection via CRISPR/Cas9 Targeted Genome Editing in a Commercial Chicken Line*. *Front Genome Ed*, 2020. **2**: p. 3.
158. Petite, J.N., et al., *Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells*. *Development*, 1990. **108**(1): p. 185-9.

159. Costantini, F. and E. Lacy, *Introduction of a rabbit beta-globin gene into the mouse germ line*. *Nature*, 1981. **294**(5836): p. 92-4.
160. Salter, D.W., et al., *Transgenic chickens: insertion of retroviral genes into the chicken germ line*. *Virology*, 1987. **157**(1): p. 236-40.
161. Mozdziak, P.E., et al., *Development of transgenic chickens expressing bacterial beta-galactosidase*. *Dev Dyn*, 2003. **226**(3): p. 439-45.
162. Love, J., et al., *Transgenic birds by DNA microinjection*. *Biotechnology (N Y)*, 1994. **12**(1): p. 60-3.
163. van de Lavoie, M.C., et al., *Interspecific germline transmission of cultured primordial germ cells*. *PLoS One*, 2012. **7**(5): p. e35664.
164. van de Lavoie, M.C., et al., *Germline transmission of genetically modified primordial germ cells*. *Nature*, 2006. **441**(7094): p. 766-9.
165. Macdonald, J., et al., *Characterisation and germline transmission of cultured avian primordial germ cells*. *PLoS One*, 2010. **5**(11): p. e15518.
166. Hamburger, V. and H.L. Hamilton, *A series of normal stages in the development of the chick embryo*. 1951. *Dev Dyn*, 1992. **195**(4): p. 231-72.
167. Whyte, J., et al., *FGF, Insulin, and SMAD Signaling Cooperate for Avian Primordial Germ Cell Self-Renewal*. *Stem Cell Reports*, 2015. **5**(6): p. 1171-1182.
168. Woodcock, M.E., et al., *Reviving rare chicken breeds using genetically engineered sterility in surrogate host birds*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019. **116**(42): p. 20930-20937.
169. Pabo, C.O., E. Peisach, and R.A. Grant, *Design and selection of novel Cys2His2 zinc finger proteins*. *Annu Rev Biochem*, 2001. **70**: p. 313-40.
170. Miller, J.C., et al., *A TALE nuclease architecture for efficient genome editing*. *Nat Biotechnol*, 2011. **29**(2): p. 143-8.
171. Wiedenheft, B., S.H. Sternberg, and J.A. Doudna, *RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea*. *Nature*, 2012. **482**(7385): p. 331-8.
172. Terns, M.P. and R.M. Terns, *CRISPR-based adaptive immune systems*. *Curr Opin Microbiol*, 2011. **14**(3): p. 321-7.
173. Li, M., et al., *A cut above the rest: targeted genome editing technologies in human pluripotent stem cells*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(8): p. 4594-9.
174. Sternberg, S.H., et al., *DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9*. *Nature*, 2014. **507**(7490): p. 62-7.
175. Jinek, M., et al., *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*. *Science*, 2012. **337**(6096): p. 816-21.
176. Barrangou, R. and L.A. Marraffini, *CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity*. *Mol Cell*, 2014. **54**(2): p. 234-44.
177. Gasiunas, G., et al., *Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(39): p. E2579-86.
178. Makarova, K.S., et al., *Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems*. *Nat Rev Microbiol*, 2011. **9**(6): p. 467-77.
179. Sapranauskas, R., et al., *The Streptococcus thermophilus CRISPR/Cas system provides immunity in Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(21): p. 9275-82.
180. Deltcheva, E., et al., *CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III*. *Nature*, 2011. **471**(7340): p. 602-7.
181. Heler, R., et al., *Cas9 specifies functional viral targets during CRISPR-Cas adaptation*. *Nature*, 2015. **519**(7542): p. 199-202.
182. Makarova, K.S., et al., *Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems*. *Biol Direct*, 2011. **6**: p. 38.
183. Rath, D., et al., *The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications*. *Biochimie*, 2015. **117**: p. 119-28.
184. Jiang, F. and J.A. Doudna, *CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms*. *Annu Rev Biophys*, 2017. **46**: p. 505-529.

185. Waters, C.A., et al., *The fidelity of the ligation step determines how ends are resolved during nonhomologous end joining*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 4286.
186. Pardo, B., B. Gomez-Gonzalez, and A. Aguilera, *DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(6): p. 1039-56.
187. Moore, J.K. and J.E. Haber, *Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(5): p. 2164-73.
188. Nagy, A., T.C. Mettenleiter, and E.M. Abdelwhab, *A brief summary of the epidemiology and genetic relatedness of avian influenza H9N2 virus in birds and mammals in the Middle East and North Africa*. Epidemiol Infect, 2017. **145**(16): p. 3320-3333.
189. Gu, M., et al., *Current situation of H9N2 subtype avian influenza in China*. Vet Res, 2017. **48**(1): p. 49.
190. Peiris, J.S., M.D. de Jong, and Y. Guan, *Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health*. Clin Microbiol Rev, 2007. **20**(2): p. 243-67.
191. Peyre, M., et al., *Avian influenza vaccines: a practical review in relation to their application in the field with a focus on the Asian experience*. Epidemiol Infect, 2009. **137**(1): p. 1-21.
192. Brinkman, E.K., et al., *Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(22): p. e168.
193. Winding, P. and M.W. Berchtold, *The chicken B cell line DT40: a novel tool for gene disruption experiments*. J Immunol Methods, 2001. **249**(1-2): p. 1-16.
194. Baba, T.W., B.P. Giroir, and E.H. Humphries, *Cell lines derived from avian lymphomas exhibit two distinct phenotypes*. Virology, 1985. **144**(1): p. 139-51.
195. Biegler, M.T., et al., *Induction of an immortalized songbird cell line allows for gene characterization and knockout by CRISPR-Cas9*. Sci Rep, 2022. **12**(1): p. 4369.
196. Fujimoto, T., T. Ninomiya, and A. Ukeshima, *Observations of the primordial germ cells in blood samples from the chick embryo*. Developmental biology, 1976. **49**(1): p. 278-282.
197. Chojnacka-Puchta, L., et al., *Obtaining chicken primordial germ cells used for gene transfer: in vitro and in vivo results*. J Appl Genet, 2015. **56**(4): p. 493-504.
198. Gauth, C.R., W.L. Hard, and T.F. Smith, *Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK)*. Proc Soc Exp Biol Med, 1966. **122**(3): p. 931-5.
199. Himly, M., et al., *The DF-1 chicken fibroblast cell line: transformation induced by diverse oncogenes and cell death resulting from infection by avian leukosis viruses*. Virology, 1998. **248**(2): p. 295-304.
200. *FIREPoI® Master Mix with 7.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5x*. [cited 2022 11-29]; Available from: [https://solisbiodyne.com/pics/9442\\_DS-04-11-75\\_v2\\_FIREPoI\\_Master\\_Mix\\_with\\_7.5\\_mM\\_MgCl<sub>2</sub>\\_revised\\_18.06.2021.pdf](https://solisbiodyne.com/pics/9442_DS-04-11-75_v2_FIREPoI_Master_Mix_with_7.5_mM_MgCl2_revised_18.06.2021.pdf).
201. *HOT FIREPoI® MultiPlex Mix with 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5x*. [cited 2022 11-29]; Available from: [https://solisbiodyne.com/pics/9453\\_DS-04-34\\_v2\\_HOT\\_FIREPoI\\_MultiPlex\\_Mix\\_with\\_10\\_mM\\_MgCl<sub>2</sub>\\_revised\\_18.06.2021.pdf](https://solisbiodyne.com/pics/9453_DS-04-34_v2_HOT_FIREPoI_MultiPlex_Mix_with_10_mM_MgCl2_revised_18.06.2021.pdf).
202. Chamberlain, J.S., et al., *Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(23): p. 11141-56.
203. Ricardo, P.C., E. Francoso, and M.C. Arias, *Fidelity of DNA polymerases in the detection of intraindividual variation of mitochondrial DNA*. Mitochondrial DNA B Resour, 2019. **5**(1): p. 108-112.
204. *PCR Using Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (M0491)*. [cited 2023 02-28]; Available from: <https://international.neb.com/protocols/2013/12/13/pcr-using-q5-high-fidelity-dna-polymerase-m0491>.

205. *PCR Protocol for LongAmp® Taq DNA Polymerase (M0323)*. [cited 2023 02-28]; Available from: <https://international.neb.com/protocols/2012/10/15/m0323-longamp-taq-dna-polymerase-protocol>.
206. Siebers, M., et al., *Application of DNA Fingerprinting using the D1S80 Locus in Lab Classes*. J Vis Exp, 2021(173).
207. van Wieren-de Wijer, D.B., et al., *Determinants of DNA yield and purity collected with buccal cell samples*. Eur J Epidemiol, 2009. **24**(11): p. 677-82.
208. An, R., X. Bai, and P.S. Grewal, *Reliable fusion PCR using Taq polymerases and pGEM-T easy vectors*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011. **27**(3): p. 727-730.
209. Cong, L., et al., *Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems*. Science, 2013. **339**(6121): p. 819-23.
210. Zhang, Y.S., *Blue-white screening liquid can eliminate false positives in blue-white colony screening*. Genet Mol Res, 2016. **15**(2).
211. Gotoh, B., et al., *An endoprotease homologous to the blood clotting factor X as a determinant of viral tropism in chick embryo*. EMBO J, 1990. **9**(12): p. 4189-95.
212. Murugavelu, P., et al., *Non-neutralizing SARS CoV-2 directed polyclonal antibodies demonstrate cross-reactivity with the HA glycans of influenza virus*. Int Immunopharmacol, 2021. **99**: p. 108020.
213. Hanly, W.C., J.E. Artwohl, and B.T. Bennett, *Review of Polyclonal Antibody Production Procedures in Mammals and Poultry*. ILAR J, 1995. **37**(3): p. 93-118.
214. Welinder, C. and L. Ekblad, *Coomassie staining as loading control in Western blot analysis*. J Proteome Res, 2011. **10**(3): p. 1416-9.
215. Pryor, J.L., W. Xu, and D.W. Hamilton, *Immunodetection after complete destaining of coomassie blue-stained proteins on immobilon-PVDF*. Anal Biochem, 1992. **202**(1): p. 100-4.
216. *Trans-Blot Cell Components*. [cited 2023 01-29]; Available from: [https://www.bio-rad.com/de-de/life-science-research/overlay/trans-blot-cell-components?ID=Trans-Blot-Cell-Comp\\_0921120410907](https://www.bio-rad.com/de-de/life-science-research/overlay/trans-blot-cell-components?ID=Trans-Blot-Cell-Comp_0921120410907).
217. Doench, J.G., et al., *Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9*. Nat Biotechnol, 2016. **34**(2): p. 184-191.
218. Hsu, P.D., et al., *DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases*. Nat Biotechnol, 2013. **31**(9): p. 827-32.
219. Subramani, S., et al., *Cloning and Expression of Recombinant VP2 Capsid Protein Gene of Canine Parvovirus in E. coli System*. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci, 2018. **7**(10): p. 2452-2461.
220. Studier, F.W., et al., *Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes*. Methods Enzymol, 1990. **185**: p. 60-89.
221. Daegelen, P., et al., *Tracing ancestors and relatives of Escherichia coli B, and the derivation of B strains REL606 and BL21(DE3)*. J Mol Biol, 2009. **394**(4): p. 634-43.
222. Janknecht, R., et al., *Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(20): p. 8972-6.
223. Lilloco, S.G., et al., *Transgenic chickens as bioreactors for protein-based drugs*. Drug Discov Today, 2005. **10**(3): p. 191-6.
224. Long, J.S., et al., *Species specific differences in use of ANP32 proteins by influenza A virus*. Elife, 2019. **8**.
225. Rieblinger, B., et al., *Cas9-expressing chickens and pigs as resources for genome editing in livestock*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021. **118**(10).
226. Schusser, B., et al., *Expression of heavy chain-only antibodies can support B-cell development in light chain knockout chickens*. Eur J Immunol, 2016. **46**(9): p. 2137-48.



227. Kumar, M., et al., *Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors*. Hum Gene Ther, 2001. **12**(15): p. 1893-905.
228. Cooper, H.M. and Y. Paterson, *Production of polyclonal antisera*. Curr Protoc Immunol, 2001. **Chapter 2**: p. 2 4 1-2 4 9.
229. Rohde, F., et al., *Characterization of Chicken Tumor Necrosis Factor-alpha, a Long Missed Cytokine in Birds*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 605.
230. Loignon, M., et al., *Stable high volumetric production of glycosylated human recombinant IFNalpha2b in HEK293 cells*. BMC Biotechnol, 2008. **8**: p. 65.
231. Fishback, J.E., et al., *Antibody production in rabbits administered Freund's complete adjuvant and carprofen concurrently*. Lab Anim (NY), 2016. **45**(2): p. 63-6.
232. Li, T., et al., *Cold-active extracellular lipase: Expression in Sf9 insect cells, purification, and catalysis*. Biotechnol Rep (Amst), 2019. **21**: p. e00295.
233. De Lorenzo, G., et al., *An Inhibitory Motif on the 5'UTR of Several Rotavirus Genome Segments Affects Protein Expression and Reverse Genetics Strategies*. PLoS One, 2016. **11**(11): p. e0166719.
234. Hu, J., et al., *Structural biology of transmembrane domains: efficient production and characterization of transmembrane peptides by NMR*. Protein Sci, 2007. **16**(10): p. 2153-65.
235. Niklaus, L., et al., *Micropatterned down-converting coating for white bio-hybrid light-emitting diodes*. Advanced Functional Materials, 2017. **27**(1): p. 1601792.
236. Vera, A., et al., *The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures*. Biotechnol Bioeng, 2007. **96**(6): p. 1101-6.
237. Goh, C.S., et al., *Mining the structural genomics pipeline: identification of protein properties that affect high-throughput experimental analysis*. J Mol Biol, 2004. **336**(1): p. 115-30.
238. Dyson, M.R., et al., *Production of soluble mammalian proteins in Escherichia coli: identification of protein features that correlate with successful expression*. BMC Biotechnol, 2004. **4**: p. 32.
239. Structural Genomics, C., et al., *Protein production and purification*. Nat Methods, 2008. **5**(2): p. 135-46.
240. Hausjell, J., et al., *E. coli HMS174(DE3) is a sustainable alternative to BL21(DE3)*. Microb Cell Fact, 2018. **17**(1): p. 169.
241. Gomes, L., G. Monteiro, and F. Mergulhao, *The Impact of IPTG Induction on Plasmid Stability and Heterologous Protein Expression by Escherichia coli Biofilms*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(2).
242. Sezonov, G., D. Joseleau-Petit, and R. D'Ari, *Escherichia coli physiology in Luria-Bertani broth*. J Bacteriol, 2007. **189**(23): p. 8746-9.
243. Rosano, G.L. and E.A. Ceccarelli, *Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges*. Front Microbiol, 2014. **5**: p. 172.
244. Zhang, Z., et al., *High-level production of membrane proteins in E. coli BL21(DE3) by omitting the inducer IPTG*. Microb Cell Fact, 2015. **14**: p. 142.
245. Brumatti, G., C. Sheridan, and S.J. Martin, *Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells*. Methods, 2008. **44**(3): p. 235-40.
246. Studier, F.W., *Protein production by auto-induction in high density shaking cultures*. Protein Expr Purif, 2005. **41**(1): p. 207-34.
247. Sadaf, S., M.A. Khan, and M.W. Akhtar, *Production of bubaline somatotropin by auto-induction in Escherichia coli*. Biotechnol Appl Biochem, 2007. **47**(Pt 1): p. 21-6.
248. Eschenfeldt, W.H., et al., *Cleavable C-terminal His-tag vectors for structure determination*. J Struct Funct Genomics, 2010. **11**(1): p. 31-9.
249. Kirk, W.R., *Thermodynamics of imidazole-ligand binding to Ni-nitrilotriacetate in solution and covalently attached to agarose beads: imidazole, his-6 (his-tag) peptide and a new bis-imidazolo-dithiane*. Protein Expr Purif, 2014. **95**: p. 1-7.

250. Terpe, K., *Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems*. Appl Microbiol Biotechnol, 2003. **60**(5): p. 523-33.
251. Frangioni, J.V. and B.G. Neel, *Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins*. Anal Biochem, 1993. **210**(1): p. 179-87.
252. Hopp, T.P., B. Gallis, and K.S. Prickett, *Metal-binding properties of a calcium-dependent monoclonal antibody*. Mol Immunol, 1996. **33**(7-8): p. 601-8.
253. Smith, J.C., et al., *Chemical synthesis and cloning of a poly(arginine)-coding gene fragment designed to aid polypeptide purification*. Gene, 1984. **32**(3): p. 321-7.
254. Schmidt, T.G. and A. Skerra, *The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment*. Protein Eng, 1993. **6**(1): p. 109-22.
255. Lukassen, S., et al., *SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells*. EMBO J, 2020. **39**(10): p. e105114.
256. Matsuyama, S., et al., *Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020. **117**(13): p. 7001-7003.
257. Hou, Y., et al., *New insights into genetic susceptibility of COVID-19: an ACE2 and TMPRSS2 polymorphism analysis*. BMC Med, 2020. **18**(1): p. 216.
258. *Goat Anti-TMPRSS2 Antibody (EB08219)*. [cited 2023 01-31]; Available from: <https://everestbiotech.com/product/goat-anti-tmprss2-antibody/>.
259. Cherry, J.D. and D. Taylor-Robinson, *Peroxide production by mycoplasmas in chicken tracheal organ cultures*. Nature, 1970. **228**(5276): p. 1099-100.
260. Penski, N., et al., *Highly pathogenic avian influenza viruses do not inhibit interferon synthesis in infected chickens but can override the interferon-induced antiviral state*. J Virol, 2011. **85**(15): p. 7730-41.
261. Petersen, H., et al., *Reassortment of NS segments modifies highly pathogenic avian influenza virus interaction with avian hosts and host cells*. J Virol, 2013. **87**(10): p. 5362-71.
262. Petersen, H., et al., *Replication and adaptive mutations of low pathogenic avian influenza viruses in tracheal organ cultures of different avian species*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e42260.
263. Blaskovic, P., A.J. Rhodes, and N.A. Labzoffsky, *Infection of chick embryo tracheal organ cultures with influenza A2 (Hong Kong) virus. I. Cytopathology, histopathology, immunofluorescence, hemadsorption, and titration of the released infectious progeny virus*. Arch Gesamte Virusforsch, 1972. **37**(1): p. 104-13.
264. Reemers, S.S., et al., *Cellular host transcriptional responses to influenza A virus in chicken tracheal organ cultures differ from responses in in vivo infected trachea*. Vet Immunol Immunopathol, 2009. **132**(2-4): p. 91-100.
265. Holmes, H.C. and J.H. Darbyshire, *Induction of chicken interferon by avian infectious bronchitis virus*. Res Vet Sci, 1978. **25**(2): p. 178-81.
266. Cumiskey, J.F., et al., *Persistent Newcastle disease virus infection in embryonic chicken tracheal organ cultures*. Infect Immun, 1973. **8**(4): p. 657-64.
267. Hartmann, S., H. Sid, and S. Rautenschlein, *Avian metapneumovirus infection of chicken and turkey tracheal organ cultures: comparison of virus-host interactions*. Avian Pathol, 2015. **44**(6): p. 480-9.
268. Rüger, N., M.P. Szostak, and S. Rautenschlein, *The expression of GapA and CrmA correlates with the Mycoplasma gallisepticum in vitro infection process in chicken TOCs*. Vet Res, 2022. **53**(1): p. 66.
269. Richter, V., R. Muehe, and B. Mayer, *How much confidence do we need in animal experiments? Statistical assumptions in sample size estimation*. J Appl Anim Welf Sci, 2018. **21**(4): p. 325-333.

270. Schloer, S., et al., *3D Ex vivo tissue platforms to investigate the early phases of influenza A virus- and SARS-CoV-2-induced respiratory diseases*. *Emerg Microbes Infect*, 2022. **11**(1): p. 2160-2175.
271. Starbæk, S.M.R., et al., *Innate antiviral responses in porcine nasal mucosal explants inoculated with influenza A virus are comparable with responses in respiratory tissues after viral infection*. *Immunobiology*, 2022. **227**(3): p. 152192.
272. Zhou, J., et al., *Differentiated human airway organoids to assess infectivity of emerging influenza virus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018. **115**(26): p. 6822-6827.
273. Bui, C.H.T., et al., *Risk Assessment for Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N6/H5N8) Clade 2.3.4.4 Viruses*. *Emerg Infect Dis*, 2021. **27**(10): p. 2619-2627.
274. Kawase, M., et al., *Simultaneous treatment of human bronchial epithelial cells with serine and cysteine protease inhibitors prevents severe acute respiratory syndrome coronavirus entry*. *J Virol*, 2012. **86**(12): p. 6537-45.
275. Sonawane, K.D., et al., *Structural insights and inhibition mechanism of TMPRSS2 by experimentally known inhibitors Camostat mesylate, Nafamostat and Bromhexine hydrochloride to control SARS-coronavirus-2: A molecular modeling approach*. *Inform Med Unlocked*, 2021. **24**: p. 100597.
276. Ramakrishnan, J., et al., *Strong Binding of Leupeptin with TMPRSS2 Protease May Be an Alternative to Camostat and Nafamostat for SARS-CoV-2 Repurposed Drug: Evaluation from Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulations*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2021. **193**(6): p. 1909-1923.
277. Klein, E.Y., et al., *Influenza A H1N1 pandemic strain evolution--divergence and the potential for antigenic drift variants*. *PLoS One*, 2014. **9**(4): p. e93632.
278. Wan, H. and D.R. Perez, *Quail carry sialic acid receptors compatible with binding of avian and human influenza viruses*. *Virology*, 2006. **346**(2): p. 278-86.
279. Barnard, K.N., et al., *Sequence dynamics of three influenza A virus strains grown in different MDCK cell lines, including those expressing different sialic acid receptors*. *J Evol Biol*, 2021. **34**(12): p. 1878-1900.
280. Nelson, S.W., et al., *Madin-Darby canine kidney cell sialic acid receptor modulation induced by culture medium conditions: Implications for the isolation of influenza A virus*. *Influenza Other Respir Viruses*, 2019. **13**(6): p. 593-602.
281. Williams, T.L., et al., *Quantification of influenza virus hemagglutinins in complex mixtures using isotope dilution tandem mass spectrometry*. *Vaccine*, 2008. **26**(20): p. 2510-20.
282. Wei, C.-J., et al., *Comparative efficacy of neutralizing antibodies elicited by recombinant hemagglutinin proteins from avian H5N1 influenza virus*. *Journal of virology*, 2008. **82**(13): p. 6200-6208.
283. Reemers, S.S., et al., *Differential gene-expression and host-response profiles against avian influenza virus within the chicken lung due to anatomy and airflow*. *J Gen Virol*, 2009. **90**(Pt 9): p. 2134-46.
284. Reuter, A., et al., *Antiviral activity of lambda interferon in chickens*. *J Virol*, 2014. **88**(5): p. 2835-43.
285. Sick, C., U. Schultz, and P. Staeheli, *A family of genes coding for two serologically distinct chicken interferons*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(13): p. 7635-9.
286. Masuda, Y., et al., *Biological effects of chicken type III interferon on expression of interferon-stimulated genes in chickens: comparison with type I and type II interferons*. *J Vet Med Sci*, 2012. **74**(11): p. 1381-6.
287. Schusser, B., et al., *Mx is dispensable for interferon-mediated resistance of chicken cells against influenza A virus*. *J Virol*, 2011. **85**(16): p. 8307-15.

288. Oshiumi, H., et al., *Riplet/RNF135, a RING finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon-beta induction during the early phase of viral infection*. J Biol Chem, 2009. **284**(2): p. 807-17.
289. Kothlow, S., et al., *Prolonged effect of BAFF on chicken B cell development revealed by RCAS retroviral gene transfer in vivo*. Mol Immunol, 2010. **47**(7-8): p. 1619-28.
290. Aire, T.A., *Development of puberty in Nigerian and White Leghorn cockerels*. Poult Sci, 1973. **52**(5): p. 1765-9.
291. Lee, C.W., D.A. Senne, and D.L. Suarez, *Effect of vaccine use in the evolution of Mexican lineage H5N2 avian influenza virus*. J Virol, 2004. **78**(15): p. 8372-81.
292. Grohskopf, L.A., et al., *Prevention and Control of Seasonal Influenza with Vaccines: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices-United States, 2018-19 Influenza Season*. MMWR Recomm Rep, 2018. **67**(3): p. 1-20.
293. Tao, J., et al., *Binding mechanism of oseltamivir and influenza neuraminidase suggests perspectives for the design of new anti-influenza drugs*. PLoS Comput Biol, 2022. **18**(7): p. e1010343.
294. Sahin, U., et al., *BNT162b2 induces SARS-CoV-2-neutralising antibodies and T cells in humans*. MedRxiv, 2020: p. 2020.12. 09.20245175.
295. Levine-Tiefenbrun, M., et al., *Initial report of decreased SARS-CoV-2 viral load after inoculation with the BNT162b2 vaccine*. Nat Med, 2021. **27**(5): p. 790-792.
296. Hoffmann, M., et al., *Camostat mesylate inhibits SARS-CoV-2 activation by TMPRSS2-related proteases and its metabolite GBPA exerts antiviral activity*. bioRxiv, 2020.
297. Dong, G., et al., *Adamantane-resistant influenza A viruses in the world (1902-2013): frequency and distribution of M2 gene mutations*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0119115.
298. *Tierarzneimittel: Abgabe, Anwendung und Versandhandel*. [cited 2023 02-27]; Available from: <https://www.bmel.de/DE/themen/tiere/tierarzneimittel/versandhandel-tierarzneimittel-amg.html>.
299. Beard, C.W., M. Brugh, and R.G. Webster, *Emergence of amantadine-resistant H5N2 avian influenza virus during a simulated layer flock treatment program*. Avian Dis, 1987. **31**(3): p. 533-7.

# Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Benjamin Schusser herzlich für all die Unterstützung in den letzten drei Jahren bedanken. Ich habe während meiner Promotion eine hervorragende fachliche Betreuung erfahren und bin dankbar, dass ich jederzeit all meine Sorgen und Probleme ansprechen konnte und immer einen gut gemeinten Rat bekommen habe.

Ein unwahrscheinlich großes Dankeschön gilt auch Dr. Hicham Sid, der mich fachlich immer ausgezeichnet unterstützt und betreut hat, aber mir auch persönlich immer weitergeholfen hat, wo er auch nur konnte, mich immer wieder aufgemuntert hat und von dem ich unfassbar viel lernen durfte! Vielen Dank für diese lehrreiche, spannende und schöne Zeit! Ich bin unfassbar dankbar, dass ich deine erste Doktorandin sein durfte!

Ich möchte mich von ganzem Herzen bei dem kompletten Bacon&Egg Team bedanken, das immer für mich da war, das jede Mittagspause schöner gemacht hat, das mich so oft zum Lachen gebracht hat und mit dem ich so unfassbar viel Spaß hatte! Danke für diese wunderbaren, drei Jahre während meiner Promotion! Ein besonders großes Dankeschön gilt Theresa von Heyl, Milena Brunner und Hanna Vikkula. Schön, dass es euch gibt!! Außerdem möchte ich mich auch noch speziell bei den TA's der AgSchnieke bedanken, die immer ein offenes Ohr hatte und zu denen ich immer kommen konnte – sei es für irgendwelche Berechnungen, fürs Express-Autoklavieren, die Entsorgung, oder, oder, oder... Danke für eure Unterstützung!! Ganz besonders möchte ich mich auch bei meinen ehemaligen Kolleginnen Dr. Denise Duda, Dr. Romina Klinger, Dr. Kamila Lengyel und Dr. Antonina Schlickerieder bedanken! Ich freue mich immer so sehr, wenn wir uns hören oder sehen und bin so dankbar, dass auch Freundschaften entstanden sind!!

Ein großes Dankeschön gilt auch unseren Tierpflegern Helga, Michi, Klee, Nicole und Jens für all die Arbeit, die Versorgung der Tiere und die Unterstützung in der Tierhaltung!

Ich möchte mich herzlich bei meinen Eltern bedanken, die mich während der letzten Jahre immer unterstützt haben, wo sie nur konnten. Vielen, vielen Dank für alles!! Ein großes Dankeschön geht an all meine Freunde, die mich in den letzten drei Jahren begleitet, mir zugehört und mich auch mal aufgemuntert haben! Ein besonderes Dankeschön gilt euch, liebe Franzi, Eva, Kati, Michi und Ann-Sophie! Ganz besonders möchte ich mich auch bei meinem Freund Daniel bedanken, der im letzten Jahr auch wirklich immer alles für mich getan hat, mich unterstützt hat, wo er auch nur konnte, mich wieder

zum Lachen gebracht hat und immer da war, wenn ich ihn gebraucht habe! Schön, dass es dich gibt!

Abschließend möchte ich der H. Wilhelm Schaumann Stiftung danken, die diese Doktorarbeit durch ein dreijähriges Stipendium finanziell unterstützt und ermöglicht hat. Ich habe dieses Stipendium immer sehr geschätzt und bin dankbar, dass ich dadurch die Möglichkeit hatte, meine Doktorarbeit an der Professur für Biotechnologie der Reproduktion zu absolvieren.