

Dipl.-Biol. Diana Vester

Molecular Biological Analysis of Dynamic Interactions between Influenza Viruses and Host Cells - Host Cell Proteomes and Viral Replication Dynamics

Abstract

Influenza A viruses are important pathogens with worldwide prevalence with high morbidity and mortality rates. They are enveloped viruses within the family Orthomyxoviridae with a negative stranded segmented RNA genome that encodes for up to 11 viral proteins. Even this small set of viral proteins interacts with an array of host cell proteins and pathways, and ensures that the virus uses the host cellular machinery for many aspects of its life cycle. Throughout the past years these virus-host cell interactions were investigated in numerous studies. Interestingly, virus-host cell interactions have not been analyzed with respect to cell culture based influenza vaccine manufacturing processes so far. In the first part of this work, a proteomic approach was used to investigate the dynamic cellular host cell response induced by influenza virus infection in two different vaccine production cell lines, the Madin-Darby canine kidney (MDCK) and the African green monkey kidney (Vero) cell line and in a human cell reference model. For identification of proteins possibly involved in global host cell response mechanisms and virus-host cell interactions, quantitative two-dimensional difference gel electrophoresis (2-D DIGE) and mass spectrometry (MS) analysis were performed. It can be concluded that virus strains seem to have various abilities to control the cellular machinery of their host cells and to suppress an antiviral response. Additionally, it was shown that the Vero cell line still has the ability to build-up a host cell defense state in an IFN independent manner and induced much higher stress responses compared to the MDCK cell line. The findings provide insights at the global protein level into the complexity and dynamics of virus-host cell interactions. They will improve understanding of host cell response mechanisms during influenza vaccine production and viral strategies to evade these responses and to replicate efficiently in different cell lines.

Another important aspect considered in the second part of this work was that the general time course of influenza virus replication in their host cells is well understood. However, much about regulation and dynamics of viral genome replication and viral transcription, especially for each of the 8 RNA segments still remains unknown. Hence, due to contradictory literature data this work focused on the development of a novel reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) assay for the analysis of influenza virus transcription and replication dynamics in mammalian cell culture. The assay was based on a sequence- and polarity-specific priming reverse transcription (pspRT) used to distinguish specifically between viral genome vRNA(-), replicative intermediates cRNA(+) and viral messenger RNA (vmRNA(+)) of segments 4 (HA), 6 (NA), 7 (M) and 8 (NS) during the life cycle of influenza A PR/8 virus. Synthetic viral RNAs used as reference standards for validation and quantification were prepared for each viral RNA type and segment. The obtained experimental results will support validation of the structured mathematical model of influenza virus replication, which provide quantitative insights in the complex intracellular events and hence also in virus-host cell interactions that take place during virus infection.

Zusammenfassung

Influenza A Viren sind als Krankheitserreger aufgrund weltweiter Verbreitung und beträchtlicher Morbiditäts- und Mortalitäts-Raten von großer Bedeutung. Es handelt sich um Viren der Familie der Orthomyxoviridae. Sie besitzen ein negativ-strängiges, segmentiertes RNA-Genom, das bis zu 11 virale Proteine kodiert. Selbst diese geringe Anzahl an viralen Proteinen ermöglicht es dem Virus, durch Interaktionen mit einer Vielfalt von Proteinen der Wirtszelle, die zellulären Mechanismen der Wirtszelle zu Gunsten dessen Vermehrung auszunutzen. Diese Virus-Wirtszell-Interaktionen wurden in den letzten Jahren in einer Vielzahl von Studien untersucht. Die viralen Strategien zur Überwindung der zelleigenen Immunabwehr, Unterdrückung der zellulären Proteinsynthese sowie der selektiven Durchführung der viralen RNA- und Proteinsynthese konnten so aufgeklärt werden. Ebenso ergaben diese Studien Einblicke in den Aufbau einer antiviralen Abwehr der Wirtszelle.

Interessanterweise wurden die Virus-Wirtszell-Interaktionen in Bezug auf einen Säugetier-Zellkultur-basierten Influenza-Impfstoff-Produktionsprozesses bislang nicht analysiert. Daher war Ziel dieser Arbeit die Etablierung zweier molekularbiologischen Analysen und die Anwendung dieser auf den Impfstoff-Produktionsprozess: (I) einen proteomischen Ansatz zur Analyse der globalen Veränderungen der zellulären Mechanismen und Proteinprofile ausgelöst durch die Influenza-Virusinfektion und zur Aufklärung der wirtszell- und virus-induzierten Vorgänge. (II) einen genomischen Ansatz zur Analyse der zeitlichen Verläufe, Dynamiken und Regulationsmechanismen der Influenza Virus-Replikation und -Translation.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde eine quantitative Proteomanalyse verwendet, um die viralen Einflüsse auf die zellulären Mechanismen der Wirtszellen auf globaler Ebene in den Impfstoff-Produktionszelllinien (MDCK und Vero Zelllinie) sowie in einer humanen Referenz-Model-Zelllinie zu untersuchen. Die Auswahl eines geeigneten Referenz-Modells sollte ausgehend von einem Vergleich des zellulären Stoffwechsel und der Virusproduktivität dreier humaner Zelllinien getroffen werden. Letztendlich wurde die humane Lungen-Krebszelllinie A549 als Modellsystem ausgewählt. Zur Identifikation von Proteinen, die an der generellen Wirtszellabwehr und an Virus-Wirtszell-Interaktionen beteiligt sind, wurden quantitative 2-D DIGE-Analysen zur Visualisierung regulierter Proteine und qualitative nanoHPLC-nanoESI-MS/MS-Analysen zur Identifizierung dieser Proteine durchgeführt. Insbesondere die Wirtszell-Proteomveränderungen der MDCK-Zelllinie induziert durch zwei Varianten des Influenza A/PR/8/34 (H1N1) Stamms (abgekürzt PR/8) mit unterschiedlichen Replikationsverhalten wurden verglichen. Des Weiteren wurde die Wirtszellantwort der Vero-Zelllinie in Bezug auf deren gestörtes Interferon-Produktionssystem untersucht und der Adaptionsprozess des Virus an die Wirtszelllinie zur Virus-Produktivitäts-Steigerung analysiert. Diverse Proteine mit unterschiedlichen Regulationsprofilen wurden so in 2-D Gelen identifiziert und per Western-Blot-Analysen für einige ausgewählte Proteine deren Regulation zusätzlich verifiziert. Diese identifizierten Proteine, konnten sehr unterschiedlichen funktionellen Proteinklassen und Signalwegen zugeordnet werden, u.a. Signal-Transduktion, Proteindegradation, Cytoskelett-Komponenten, Zellstoffwechsel, viraler Abwehrmechanismus und speziell für die Vero-Zelllinie verschiedene Formen zellulärer Stressantworten und Zell-Zell-Kommunikationen. Aus den Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass unterschiedliche Virus-Stämme bzw. Virus-Varianten unterschiedliche Fähigkeiten zur Kontrolle der zellulären Mechanismen der Wirtszellen bzw. zur Unterdrückung der antiviralen Abwehr besitzen. Dabei sind insbesondere Viren mit hohem Titer sog., ‚high-yield strains‘, am erfolgreichsten beim Unterdrücken dieser Abwehrmechanismen. Zusätzlich konnte der Aufbau einer Interferon-unabhängigen Wirtszellabwehr und einer im Vergleich zu der MDCK-Zelllinie stärkeren Stressantwort in der Vero-Zelllinie gezeigt werden. Die vorliegenden Resultate geben einen Einblick in die Komplexität und Dynamik der Virus-Wirtszell-Interaktionen. Sie liefern ebenfalls ein verbessertes Verständnis der Wirtszellantwort der Influenza-Impfstoff-Produktionszelllinien, sowie der viralen Strategien die Wirtszellabwehr zu umgehen und sich effizient in verschiedenen Wirtszellen zu vermehren. Zusätzlich könnten einige dieser identifizierten Proteine potentielle Ansatzpunkte für die Verbesserung der Zelllinienproduktivität während des Impfstoff-Prozesses darstellen. Weitere experimentelle Untersuchungen zur Bestätigung und Quantifizierung dieser Annahmen sind jedoch

notwendig.

Ein zweiter wichtiger Aspekt dieser Arbeit beinhaltete die Aufklärung der Dynamik und Regulation der viralen Genom-Replikation und -Transkription einzelner viraler Gen-Segmente. Im Gegensatz zum generellen Replikationszyklus sind die Dynamik und die Regulationsmechanismen in der Wirtszelle weiterhin unklar. Darüber hinaus sind die meisten publizierten Studien widersprüchlich und aufgrund dessen werden sehr unterschiedliche Hypothesen zur Regulation und Dynamik der viralen Vermehrung vorgeschlagen. Zur Validierung und Parameter-Abschätzung eines strukturierten mathematischen Modells der Virusreplikation waren diese experimentellen Ergebnisse jedoch nur qualitativ von Nutzen. Daher wurde in dieser Arbeit ein neuartiger RT-qPCR Assay zur Untersuchung der Replikationsvorgänge in der Säugetier-Zellkultur entwickelt. Basierend auf einer polaritäts- und sequenz-spezifischen Umschreibung der viralen RNAs während der Reversen Transkription kann der Assay zur spezifischen Unterscheidung zwischen viraler genomischer vRNA(-), Replikations-Zwischenprodukten cRNA(+), sowie viraler Messenger RNA vmRNA(+) der Segmente 4 (HA), 6 (NA), 7 (M) und 8 (NS) während des Influenza A PR/8 Virus Replikationszyklus verwendet werden. Synthetische virale RNAs wurden für jedes virale Segment und den drei jeweiligen viralen RNA-Typen hergestellt und als RNA-Referenzstandard zur Validierung und zur absoluten Quantifizierung verwendet. Die Assay-Validierung erbrachte eine Linearität von 5 Größen-Ordnungen, eine Sensitivität von mindestens $1,0 \times 10^3 - 8,9 \times 10^3$ viralen RNA-Molekülen, eine hohe Spezifität und eine Wiederhol- und Vergleichspräzision mit einem Variationskoeffizient kleiner als 0,8 – 3,1%. Im Anschluss wurde die Dynamik der Influenza-Virusvermehrung in der MDCK-Produktionszelllinie untersucht. Grundsätzlich wurden in frühen Infektionsphasen (ca. 0,4 h nach Infektion) hauptsächlich vmRNA(+)'s synthetisiert. Unverzögert darauf folgte die Synthese von cRNA(+) und mit kurzer Verzögerung (ca. 2,5 h nach Infektion) die Replikation der viralen genomischen RNAs (vRNA(-)). Genom-Äquivalente (vRNA(-)) wurden in gleichen Mengen und ähnlichen Dynamiken repliziert, während unter den vmRNA(+)'s eine frühe Synthese von NS1 und eine Verzögerung in der Synthese von M1 detektiert wurden. In einer Folgearbeit sollen diese experimentellen Ergebnisse zur Validierung des strukturierten mathematischen Modells der intrazellulären Influenza-Replikation eingesetzt werden. Dieses Modell soll u.a. einen quantitativen Einblick in die komplexen intrazellulären Vorgänge und daher auch in die Virus-Wirtzell-Interaktionen ermöglichen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass beide Anwendungen, Proteom- und RT-qPCR Assay, zu einem neuem Verständnis der Virus-Wirtzell-Interaktionen in Bezug auf den Influenza-Impfstoff-Produktionsprozess geführt haben und zur weiteren Untersuchung von Bioprocessen und der Systembiologie genutzt werden können.