

Jahresbericht (2. Jahr) des Projektes Kennziffer 2769

Dr. Manfred Wirth, Prof. Dr. Jürgen Bode

Anschrift: Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (vormals GBF) Molekulare
Biotechnologie, Inhoffenstr. 7, 38124 Braunschweig

Forschungsgebiet: Zellkulturtechnologie, Virologie

Thema: Untersuchung der Interaktion zwischen dem Influenzavirus M2 Protein und
Caveolin-1: Ein neues zelluläres Target für die Therapie und Verbesserung der
Virusproduktion

Doktorand: Lijing Sun

Zusammenfassung:

Die Rolle der Interaktion von M2 Protein von humanen Influenza A Viren und Caveolin-1, einem multifunktionellen zellulären Protein, wurde untersucht. Inhibitions- und Kompetitionsstudien in verschiedenen Zelllinien zeigten, dass ein Zusammenhang zwischen Cav-1-Expression und der Produktion von humanen Influenzaviren besteht. Die Ergebnisse dienen als Basis für die Verbesserung der Produktion von Influenzaviren über Zelllinien. Die M2/Cav-1 Interaktion stellt somit ein interessantes Target für die Entwicklung von neuen Impfstoffen und antiviralen Agenzien dar.

Fragestellung und Ergebnisse

Die Untersuchung der zellulären Interaktionspartner beim Ein- und Austritt von humanen Retroviren, Influenzaviren und anderer Primatenviren hat viel zum Verständnis der Replikationsmechanismen beigetragen. Es wurden zahlreiche zelluläre Faktoren und Reaktionswege identifiziert, die an der Replikation beteiligt sind und somit die Virusausbeute bestimmen. Z.B. konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass das zelluläre Cav-1-Protein bei Retroviren [1] bei der Replikation mit viralen Matrixproteinen bzw. deren Vorläuferproteinen interagiert und die Virusproduktion beeinflusst. Folgeuntersuchungen zeigten, dass auch die Influenzavirus-Replikation über die Interaktion des M2 Proteins mit dem zellulären Cav-1 eng mit der Wirtszellmaschinerie verknüpft ist.

Gegenstand dieser Arbeiten war in dem ersten Jahr der Förderung die Charakterisierung der M2/Cav-1-Bindung und deren Einfluss auf die Virusproduktion von humanen Influenzaviren (A/PR8/34; Subtyp H1/N1) in Zellkultur. Ergebnisse eines Teils dieser Arbeiten wurden kürzlich in einem virologischen Journal publiziert [2]. Eine Kopie der Veröffentlichung ist beigelegt. Im zweiten Jahr sollte die molekulare Basis der M2/Cav-1 Interaktion und ihre Auswirkung auf die Zelle untersucht werden. Die gewonnenen Erkenntnisse sollten als Basis für die Entwicklung verbesserter Produktionssysteme für Influenzaviren dienen.

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass die Arbeiten zur Definition eines neuen zellulären Targets für die therapeutische Intervention führten und Möglichkeiten zur Modulation Influenzavirusproduktion aufzeigten.

Der Einfluss von Caveolin-1 auf die Produktion von Influenzaviren:

Um den Einfluss der Cav-1 Interaktion mit Influenzaviren zu untersuchen, wurden Cav-1 Inhibitionsexperimente und Kompetitionsstudien durchgeführt. **Gene Silencing durch Cav-1-RNAi, Inhibition mit Hilfe einer dominant-negativen Cav-1 Mutante sowie Überexpression von Cav-1** zeigten, dass Cav-1 direkt oder indirekt an der Replikation von Influenzaviren beteiligt ist. Allerdings reduzierten sowohl eine Erhöhung als auch eine starke Verringerung des Cav-1 Levels die Virusausbeute in MDCK. Hieraus folgt, dass die Manipulation des Cav-1 Levels bisher keine Verbesserung der Virusproduktion in MDCK lieferte.

Interessanterweise verliefen **Versuche mit anderen Zelllinien** ähnlich, lieferten aber im Einzelfall auch höhere Virustiter. Dies deutet darauf hin, dass der unmittelbare Zellkontext über die Ausrichtung des Cav-1 Effekts auf die Influenzavirusproduktion entscheidet. Zusammengefasst ergaben die Inhibitions-, Depletions, und Kompetitions-Versuche, dass Cav-1 in der Tat die Produktion von Influenzaviren moduliert, allerdings ist die Ausprägung und Richtung des Effekts stark von der jeweiligen Zelllinie abhängig.

Die Rolle der Cav-1 / M2 Interaktion

Bindung von M2 an Cav-1 und Lokalisation von M2 Fusionsproteinen

Die Bindung von M2/Cav-1 konnte durch Co-Immunpräzipitation sowohl in M2 transfizierten als auch in Influenza A/PR8/34 infizierten Zellen bestätigt werden. Um die Bindungsstelle(n) zu bestimmen, wurden gezielte Mutagenesestudien der M2 CBD1 Region (CBD = caveolin-1 Bindungsdomäne) durchgeführt. Es wurde bestätigt, dass neben der CBD1-Region in M2 anscheinend weitere Bindungsstellen existieren. Dies bedeutet, dass zusätzliche Mapping-Experimente zur Eingrenzung der Kontaktstellen notwendig sind. Es fiel auf, dass die Lokalisation dieser M2-Mutanten innerhalb der Zelle im Vergleich zum Wildtyp deutliche Unterschiede aufwies. Dies deutet darauf hin, dass die Interaktion von M2 und Cav-1 eine Rolle für den Transport und die Lokalisation von M2 in der Zelle spielen kann. Allerdings sind weitere Versuche zur eindeutigen Klärung dieser Frage notwendig.

Cav-1 Phosphorylierung

Cav-1 spielt in der Signaltransduktion eine wesentliche Rolle. Einerseits gibt das Lipid-Raft-Protein aktiv Stimuli weiter wie im Fall des Insulin-Pathways, andererseits versetzt es viele bekannte Vertreter von verschiedener Signaltransduktionswege in einem signalkompetenten, wenn auch inaktivem Zustand. Die Vermittlung erfolgt dabei über Phosphorylierung/Dephosphorylierung von Tyr 14 des Caveolin-1. Um nun den Cav-1 Phosphorylierungszustand nach Influenzainfektion zu messen wurden Phospho-Tyr-Cav-1 und monoklonale Cav-1 Antikörper in WesternBlots infizierter und nicht infizierter Zellen verwendet. Die Daten deuten darauf hin, dass die Phosphorylierung eine Rolle spielt, allerdings sind die Effekte vom jeweiligen Zelltyp abhängig. Hier sind weitere Experimente notwendig um nähere Aufschlüsse über die Art des betroffenen Pathways zu bekommen.

Produktionszelllinie

Da die Veränderung des Cav-1-Spiegels in MDCK bisher keine verbesserten Titer ergab, der Cav-1 Effekt aber anscheinend vom jeweiligen Zelltyp geprägt wird, wurde die Strategie geändert. Zuerst wurden verschiedenen neue Zellen und Zelllinien über Western Blot auf ihren Cav-1 Gehalt hin untersucht. In einem zweiten Schritt wurden die Zellen mit verschiedenen m.o.i. infiziert und dann die PR8 Virusproduktivität ermittelt. Aus dem Screening ging aviäre Primärzelle hervor, die ähnliche Titer wie MDCK hervorbrachte. Die primäre Zelle wurde immortalisiert und die Zelllinie über 100 weiter Passagen kultiviert. Zurzeit finden Untersuchungen hinsichtlich ihrer Virusproduktivität und Wachstum in serumfreiem Medium statt.

Zusammenfassend lässt sich sagen: Die Untersuchung der Virus / Wirt-Interaktionen spielt zunehmend eine wichtige Rolle, um Infektionen mit viralen Pathogenen zu verstehen. Wir konnten in Bindungsstudien zeigen, dass Caveolin-1, ein multifunktionelles zelluläres Protein, das Matrixprotein M2 Protein eines humanen Influenzavirus (H1N1) bindet. Dabei spielt eine typische Caveolin-1 bindende Domäne (CBD) in M2 eine Rolle. Diese Domäne scheint aber nicht die einzige M2/Cav-1 Kontaktstelle zu sein. Die Konservierung der bisher identifizierten M2-Bindungsstelle in humanen

Influenza A viren (CBD1) legt eine funktionelle Rolle Cav-1 / M2 Interaktion für die virale Replikation nahe. Die Rolle dieser Interaktion wurde untersucht. Inhibitionsstudien / Kompetitionsstudien in verschiedenen Zelllinien zeigten, dass ausgeprägte Korrelationen zwischen Cav-1 Expression und der Produktion von humanen Influenzaviren bestehen. Interessanterweise spielen der Zelltyp sowie die Cav-1 Expressionshöhe für die Ausprägung des Effektes einen entscheidenden Einfluss. Die gewonnenen Daten können sich zur Verbesserung der Produktion von Influenzaviren eignen, allerdings zeigten die favorisierten MDCK Zellen -im Gegensatz zu anderen Zellen- nur geringfügige Abhängigkeit ihre Virusproduktivität von der Cav-1 Expression. Es wurde eine neue aviäre Zelllinie entwickelt, die sich für die Influenzavirusproduktion eignet und sich durch ähnliche Virusproduktivität auszeichnet wie MDCK. Die M2/Cav-1 Interaktion stellt weiterhin ein interessantes Target für die Entwicklung von neuen Impfstoffen und antiviralen Agenzien dar [3-5]. Das Auftreten des Vogelgrippevirus, die rasche Ausbreitung des ‚Schweinegrippevirus‘ SOIV im Jahre 2009 und die sich ausbreitende Resistenz gegenüber dem Neuraminidasehemmern erfordern die zeitnahe Entdeckung von neuen Targets gefolgt von der Entwicklung entsprechender Wirkstoffe.

Literatur

1. Yu Z, Beer C, Koester M, Wirth M: Caveolin-1 interacts with the Gag precursor of murine leukaemia virus and modulates virus production. *Virology Journal* 2006, 3:73.
2. Sun L, Hemgard GV, Susanto SA, Wirth M: Caveolin-1 influences human influenza A virus (H1N1) multiplication in cell culture. *Virology Journal* 2010:108.
3. De Jong MD, Hien TT: Avian influenza A (H5N1). *Journal of Clinical Virology* 2006, 35:2-13.
4. Dharan NJ, Gubareva LV, Meyer JJ, Margaret, Okomo A, McClinton RC, Marshall SA, George KS, Epperson S, Brammer L, et al: Infections with oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) virus in the united states. *JAMA - Journal of the American Medical Association* 2009, 301:1034-1041.
5. Gooskens J, Jonges M, Ciaas ECJ, Meijer A, Van Den Broek PJ, Kroes ACM: Morbidity and mortality associated with nosocomial transmission of oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) virus. *JAMA - Journal of the American Medical Association* 2009, 301:1042-1046.