



Schlussbericht

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde im Rahmen des Programms zur medizinischen Genomforschung mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 13N9365 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

**ZE: Max Planck Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V.,
hier: MPI für Infektionsbiologie, Abteilung Molekulare Biologie (MPIIB)**

Förderkennzeichen: **01GG0702**

Vorhabenbezeichnung: Zelluläre Testsysteme mit ultraphoben Oberflächen als Werkzeug für effizientes Hochdurchsatzscreening

Teilprojekt 2: Identifizierung der für die Replizierung des Influenza-A-Virus entscheidenden zellulären Faktoren

Laufzeit des Vorhabens: 1.10. 2007 – 30.9. 2010 (anschließend kostenneutrale Verlängerung bis 30.09.2011)

I. Einleitung

1 Aufgabenstellung

Im Zuge dieses Projektes sollten die in Teilprojekt 1 entwickelten ultrahydrophoben siRNA Slides angewandt werden, um die an Grippeinfektionen beteiligten menschlichen Gene in einem genomweiten Screen zu identifizieren. Diese genomweite Studie sollte nicht nur potenzielle Medikamententargets enthüllen, sondern auch unser Verständnis von Influenza-Infektionsprozessen grundlegend erweitern, insbesondere der Virenaufnahme, der Virusreplikation und des Ausschleusens der Viruspartikel aus der menschlichen Wirtszelle. Zu diesem Zweck sollten funktionelle, Influenzavirus spezifische Assays etabliert werden, die auch für den Einsatz auf den ultrahydrophoben siRNA Slides geeignet sind. Dies beinhaltete die Identifikation geeigneter Kontroll siRNAs, die Detektion infizierter Zellen mittels Immunfluoreszenz und die Anpassung der automatischen Mikroskopie an die 6144 well Arrays.

2. Voraussetzungen

Das MPIIB verfügte bereits zu Beginn des Projektes über eine ausgewiesene Expertise auf dem Gebiet der Influenza Virus Infektion sowie über ein umfangreiches Know How zur Etablierung von Testsystemen für die Hochdurchsatzanalyse einschließlich der bioinformatischen Auswertung der Screening Ergebnisse (Data Mining). Darüber hinaus standen hochqualifiziertes Personal, ein automatisiertes Mikroskop (Scan[^]R System von Olympus) und eine RNAi Screening Plattform der biologischen Sicherheitsstufe 2 zur Verfügung. Letztere wurde mit den erhaltenen Fördermitteln im Laufe des Projektes für die Verwendung von UOC Arrays aufgerüstet.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Entsprechend der Vorhabensbeschreibung wurde in Arbeitspaket 1 ein geeignetes Zellmodell ausgewählt und ein Assaysystem etabliert, das einen quantitativen Nachweis der Influenzavirusreplikation durch automatisierte Mikroskopie ermöglicht. Zudem wurden innerhalb dieses Arbeitspaketes Kontrollen etabliert, die einen starken Einfluss auf die Virusreplikation ausüben. Es konnten Kontroll-siRNAs identifiziert werden, die gegen zelluläre und virale Targets gerichtet sind und für die Datennormalisierung eingesetzt werden konnten. Während die Versuche im Arbeitspaket 1 überwiegend in Mikrotiterplatten Platten durchgeführt wurden, galt es in Arbeitspaket 2 den Screening Assay in das UOC Array Screening Format zu transferieren. Hierfür wurden die in diesem Vorhaben verwendeten humanen Lungenepithelzellen A549 auf den UOC Array ausgesät und die gleichmäßige Verteilung der Zellen optimiert. Im Verlauf des Projektes wurde mit ersten Prototypen die Infektion und Immunfluoreszenzfärbung im UOC Array Format erfolgreich getestet und der Einfluss von Kontroll-siRNAs auf die Virusreplikation analysiert. Aufgrund der komplexen Fertigung der ultrahydrophoben siRNA Slides konnten bis zum Projektende nur erste Prototypen hergestellt werden. Die Bereitstellung eines einsatzfähigen UOC Arrays verzögerte sich mehrfach, so dass in der Zwischenzeit das Nachweissystem optimiert und eine Validierung bereits bekannter Targets im Mikrotitermaßstab durchgeführt wurde. Für ersteres wurden rekombinante Influenzaviren etabliert, die nach Infektion zu einer GFP-Expression in infizierten Zellen führen. Diese Technik erleichtert gerade bei der Verwendung eines Cell Arrays die Messung des Anteils infizierte zu uninfizierten Zellen, da auf eine Immunfluoreszenzfärbung verzichtet werden kann. Damit wurde auch für zukünftige Projekte die Grundlage geschaffen, Influenzavirus spezifische Wirtszellfaktoren zu identifizieren. Zudem wurden innerhalb der Projektlaufzeit Wirtszelltargets, die durch einen früheren genomweiten RNAi Screen identifiziert wurden, auf breiter Basis validiert. Für 81 Targets wurde nach siRNA vermitteltem Knockdown der Effekt auf Virusreplikation, Knockdown Effizienz, Zytotoxizität und die Induktion einer unspezifischen Interferon-Antwort durch die Transfektion der einzelnen siRNA Moleküle analysiert. Da die UOC Arrays dafür nicht genutzt werden konnten, wurden diese Experimente in 384 well Mikrotiterplatten durchgeführt. Diese Ergebnisse sind essentiell für die Auswahl geeigneter Wirtszellfaktoren für anschließende Arbeiten in Richtung Wirkstoffdesign zur Entwicklung innovativer Virostatika gegen die Influenza. Auf einen genomweiten Screen zur Identifizierung Influenza Virus spezifischer Wirtszellfaktoren musste mangels einsatzfähigem UOC Array leider verzichtet werden (Arbeitspakete III & IV).

4. wissenschaftlichem und technischem Stand, an den angeknüpft wurde

Zum Zeitpunkt der Antragstellung wurde die RNA Interferenz basierte Genfunktionsanalyse bereits mehrfach für die Identifikation von zellulären Wirtszellfaktoren eingesetzt, die an der Replikation viraler Pathogene beteiligt sind (König et al., 2008; Krishnan et al., 2008). Vergleichbare *loss of function* Analysen wurden auch in unserem Labor durchgeführt, darunter ein genomweiter Mikrotiterplatten basierter Influenza Screen, der 2010 publiziert wurde (Karas et al., 2010). Die hierfür etablierten Assays waren Grundlage für die Etablierung eines zellulären Assays für die Analyse der Influenza Virus Replikation im ultrahydrophoben siRNA Array.

Für den Nachweis der Funktionalität der UOC Arrays wurde automatisierte Fluoreszenzmikroskopie angewendet. Ein entsprechendes automatisiertes Mikroskop (Scan^R System von Olympus) war bereits im Labor für die Analyse von Mikrotiterplatten eingeführt worden und wurde für die UOC Arrays entsprechend angepasst. Gleiches gilt für die bereits vorhandene RNAi Roboteranlage.

Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des Vorhabens benutzt wurden

Nach Wissen des MPIIB wurden bei der Durchführung des Projektes keine bestehenden Patente oder Schutzrechte tangiert.

Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste

Zur Literaturrecherche wurden internationale Veröffentlichungen zu den Stichworten "Influenza", „siRNA screen“ und ‚loss-of-function analysis‘ herangezogen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

Weiterführende Recherchen zu der Rolle einzelner Wirtsfaktoren wurden mit Hilfe folgender Informationsdienste durchgeführt:

- Ingenuity Pathway Analysis (<http://www.ingenuity.com/>)
- STRING Database for functional protein association networks (<http://string.embl.de/>)
- KEGG Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (<http://www.genome.jp/kegg/>)
- AmiGO Gene Ontology Database (<http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/browse.cgi>)

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Das beantragte Projekt war Teil des Verbundprojekts "Cell Arrays with Ultraphobic Surfaces as Tools for Efficient High Throughput Screening". Die Durchführung dieses Teilprojektes erforderte im hohen Maße die Zusammenarbeit mit den übrigen Projektpartnern, speziell bei der Fertigung der ultrahydrophoben siRNA Arrays (AMF, Köln) sowie der Etablierung und Optimierung der siRNA Transfektion im UOC Array Screening Format (Qiagen, Hilden und VTT, Turku, Finnland).

Die Plasmide für die Herstellung rekombinanter Influenzaviren, die nach Infektion zu einer Expression des grün fluoreszierenden Proteins in infizierten Zellen führen, wurden von der Arbeitsgruppe von Adolfo Garcia-Sastre (Mount Sinai School of Medicine, New York, NY, USA) zur Verfügung gestellt.

II. Eingehende Darstellung

1. *erzielte Ergebnisse im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele,*

Arbeitspaket I

In diesem Arbeitspaket wurde zunächst die humane Lungenepithelzelllinie A549 als geeignetes Zellmodell identifiziert. Die Infektion mit Influenzaviren konnte zuverlässig durch Immunfluoreszenzfärbung mit einem Influenzavirus spezifischen Nukleoprotein-Antikörper und anschließender Mikroskopie nachgewiesen werden. Für quantitative Bestimmungen der Virusreplikation in primär und sekundär infizierten Zellen wurde ein Assay am automatischen Mikroskop (Olympus) aufgesetzt und die Bildanalyse für die Erkennung Virus-infizierter Zellen mittels der Scan^R-Software (Olympus) etabliert. Für die Etablierung eines Screening Assays sind Kontroll-siRNAs für die spätere Datennormalisierung enorm wichtig. Als Negativ Kontrolle, die sich im Assay neutral verhalten und keinen Einfluss auf die Virusreplikation ausüben soll, wurden „Allstars“ siRNA (Qiagen) eingesetzt. Als Positivkontrolle fungierten einerseits siRNAs die gegen das virale Nukleoprotein (NP) gerichtet sind, zum anderen wurde siRNAs gegen die zelluläre V-ATPase (ATP6V0D1) verwendet, um die Influenzavirus Replikation zu inhibieren. Es konnte gezeigt werden, dass beide Positiv-Kontrollen zuverlässig die primäre und sekundäre Infektion hemmten (Inhibition > 2 Logstufen). Die optimale *multiplicity of infection* (MOI) für den Screening Ansatz wurde mit 0,125 festgelegt. Im Verlauf des Projektvorhabens konnte ein weiterer Screening Assay etabliert werden, mit dessen Hilfe die identifizierten Targets in einzelne Phasen der Virusreplikation eingeteilt werden können. Im Falle einer infizierten Zelle kann im Normalfall nach ca. 3 h. p.i. das virale NP im Zellkern beobachtet werden und dieses Protein wird 2 h später, also 5 h p.i. in das Zytoplasma exportiert. Sind aufgrund des Gen-Knockdowns die frühen Schritte des Replikationszyklus beeinträchtigt, so ist fehlt die Lokalisation des NP im Zellkern oder ist zeitlich verzögert. Der Knockdown von solchen Faktoren, die beispielsweise am Export des NPs aus dem Zellkern beteiligt sind, würde hingegen den Exportprozess verzögern. Somit erlaubt dieser Assay eine genauere Einteilung der identifizierten Wirtszellfaktoren. Ein entsprechender mikroskopische Assay wurde aufgesetzt und die automatisierte Bildanalyse mit Hilfe des Scan^R-Softwarepakets etabliert. Um signifikante Unterschiede zwischen unterschiedlichen Kontroll-Bedingungen messen zu können, wurden die Daten auf Einzelzellebene generiert und anschließend mit statistischen Tests (z.B. Kolmogorow-Smirnow-Test) zur Identifizierung signifikanter Unterschiede der Zellpopulationen implementiert.

Arbeitspaket II

Die in Arbeitspaket I ausgewählten A549 Zellen wurden nun in Arrays mit unterschiedlichen Oberflächen ausgesät und das Wachstumsverhalten analysiert. Der Vergleich der beiden Oberflächenmaterialien Aminopropyl-triethoxy-silane und Mercaptopropyl-trimethoxy-silane ergab, dass A549 Zellen ein stärkeres Zellwachstum auf Mercaptopropyl-trimethoxy-silane beschichteten Arrays zeigten. Mit Hilfe der ersten UOC Arrays mit 96 wells konnte die Toxizität des PLK1 Knockdowns in A549 Zellen nachgewiesen werden, womit bestätigt wurde, dass der siRNA vermittelte Knockdown auch in diesem 96 well Array System funktionierte. Parallel dazu wurde das Arbeiten mit hochpathogenen aviären H5N1 Viren etabliert und zelluläre Wirtszellfaktoren identifiziert, die für die Replikation dieser Viren essentiell sind. SiRNAs, die gegen solche Faktoren gerichtet sind, eignen sich gut als Positiv-Kontrolle in nachgeschalteten Screening Ansätzen mit H5N1 Viren.

Nach der Etablierung der 96 well Arrays gelang der Transfer auf den 384 well UOC Array. Auch hier konnten erfolgreich A549 Zellen auf Mercaptopropyl-trimethoxy-silane beschichteten Oberflächen ausgesät werden und das Zellwachstum nachgewiesen werden. Schließlich wurde der Assay auf das 6441 well UOC Array Screening Format angepasst. Wir konnten zeigen, dass die Aussaat der A549 Zellen mit Hilfe der Beladungskassette von AMF möglich war. Nach Optimierung der Zellzahl war eine gleichmäßige Verteilung der Zellen auf der Oberfläche des Array gegeben. Im nächsten Schritt wurden die Zellen innerhalb des 6441 well Arrays erfolgreich mit Influenza A Viren (AWSN/33) infiziert und die Infektion mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Allerdings gestaltete sich die Immunfluoreszenzfärbung als recht schwierig, da der Flüssigkeitswechsel nur mit der Beladungskassette möglich war (s.u.). Dennoch konnten die Wells des 6411 well Arrays einzeln mit Hilfe des automatischen Mikroskop ausgelesen, analysiert und die Infektion der Zellen mit Influenzaviren nachweisen werden. Schließlich wurden die ersten UOC Array Prototypen mit den gespotteten Kontroll-siRNAs „Allstars“, „NP“ und „CellDeath“ und „HIF1a“ mit jeweils zwei Konzentrationen (25 nM und 50 nM) verwendet, um festzustellen, ob aufgrund der Transfektion mit NP-spezifischen siRNAs ein inhibitorischer Effekt auf die Virusreplikation feststellbar ist. Tatsächlich konnte bei der höheren siRNA Konzentration (50 nM) eine Inhibition (ca. 50%) der Virusreplikation nachgewiesen werden, jedoch war der Effekt im Vergleich zu den Mikrotiterplatten basierten Experimenten deutlich schwächer und es gab teilweise deutliche Schwankungen innerhalb der Kontrollen. Als Qualitätskontrolle für einen Assay, der im HT-Screening Verfahren eingesetzt werden soll, wird häufig der Z'-Faktor herangezogen (Zhang et al., 1999). Der Z-Faktor für einen Assay, der für ein HT-Screening geeignet ist, liegt im Normalfall zwischen 0 und 1. Aufgrund der relativ schwachen Inhibition durch die NP-siRNA konnte bei der Verwendung der UOC 6441 well Arrays lediglich ein Z'-Faktor < 0 ermittelt werden, wohingegen der Mikrotiterplatten-basierte Assay Z'-Faktoren von ca. 0.6 liefert. Somit reichte die Knockdown Effizienz der auf den UOC gespotteten siRNAs nicht aus, um unmittelbar mit dem Screening nach Influenzavirus relevanten Faktoren zu starten. Weitere Optimierung bei der Herstellung des Arrays, beim Spotten der siRNAs und bei der Auswahl des verwendeten Transfektionsreagenz erscheinen notwendig, um die erforderlichen Mindestanforderungen zu erfüllen.

Arbeitspaket III und IV

Die Herstellung und Optimierung eines siRNA beladenen UOC Arrays erwies sich als weitaus schwieriger als zum Zeitpunkt der Antragstellung angenommen und führte immer wieder zu Verzögerungen. Trotz vielversprechender Weiterentwicklungen des Arrays stand während der Projektlaufzeit kein Array zu Verfügung, mit dem ein Screening auf Influenzavirus spezifische Wirtszellfaktoren möglich gewesen wäre. Daher konnten die Arbeitspakete III und IV nicht wie geplant durchgeführt werden. Stattdessen wurde die vorhandenen Ressourcen eingesetzt um ein generelles Problem mit den UOC Arrays zu umgehen: Die Experimente mit dem UOC Array Prototypen in Arbeitspaket II zeigten, dass der entwickelte Array weniger gut geeignet war für Immunfluoreszenzfärbung, da diese Methode etliche Schritte beinhaltet, bei denen Flüssigkeiten ausgetauscht werden müssen (Permeabilisierung, Hinzufügen des primären und sekundären Antikörpers, mehrere Waschschrte). Aufgrund der Struktur des entwickelten UOC Arrays ist bei dem Befüllen des Arrays stets mit der von AMF entwickelten Beladungskassette zu arbeiten, weil ansonsten eine vollständige Beladung der Einzelwells innerhalb des Arrays nicht sichergestellt wäre. Gerade bei einem Immunfluoreszenzbasierten Screening-Verfahren mit mehreren Arrays, bei dem nur minimale Schwankungen tolerierbar sind, ist diese Methode nicht praktikabel. Um dennoch nach Influenzavirus spezifischen Wirtszellfaktoren screenen