

Forschungsberichte aus dem Max-Planck-Institut
für Dynamik komplexer technischer Systeme

Band 41

Björn Heynisch

**Impact of innate immunity of MDCK cells
on virus replication in an influenza
vaccine production process**

Shaker Verlag
Aachen 2013

Bibliographic information published by the Deutsche Nationalbibliothek

The Deutsche Nationalbibliothek lists this publication in the Deutsche Nationalbibliografie; detailed bibliographic data are available in the Internet at <http://dnb.d-nb.de>.

Zugl.: Magdeburg, Univ., Diss., 2013

Copyright Shaker Verlag 2013

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior permission of the publishers.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-2162-2

ISSN 1439-4804

Shaker Verlag GmbH • P.O. BOX 101818 • D-52018 Aachen

Phone: 0049/2407/9596-0 • Telefax: 0049/2407/9596-9

Internet: www.shaker.de • e-mail: info@shaker.de

Zusammenfassung

Trotz des großen Fortschritts, der im vergangenen Jahrzehnt bei der Aufklärung von Interaktionen zwischen Influenzaviren und ihren Wirtszellen erreicht werden konnte, sind bisher nur wenige experimentelle Ansätze verfolgt worden, um die gewonnen Erkenntnisse auf zellkulturbasierte Influenza Impfstoffproduktionsprozesse zu übertragen. Da die Hersteller von Influenza Impfstoffen gezwungen sind, innerhalb geringer Zeitspannen von nur wenigen Monaten Dauer eine genügende Menge an Impfstoff bereitzustellen, ist es von großer Notwendigkeit, über schnelle, verlässliche und wenig störanfällige Produktionsprozesse zu verfügen. Um dieser jährlich wiederkehrenden Herausforderung gerecht zu werden, ist ein detailliertes Verständnis der intrazellulären Vorgänge bei der Influenza Virusreplikation von großer Bedeutung. Dabei sind insbesondere den zellulären Prozessen, die mit der angeborenen Immunität der zur Impfstoffherstellung genutzten Epithelzellen in Verbindung stehen, in bisherigen Studien in diesem Kontext keine große Bedeutung beigemessen worden, sodass zu Beginn dieser Forschungsarbeit unklar war, ob diese einen limitierenden Faktor für die Produktionsprozessausbeuten darstellen könnten. Gegenstand dieser Studie war die Analyse der Influenzavirus vermittelten Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden, die sich in anderen Untersuchungen als für die Virusreplikation bedeutsam herausgestellt hatten. Dies umfasste die Signaltransduktionskaskaden NF- κ B, IRF-3, PI3K/Akt, Jak-Stat, Raf/MEK/ERK und PKR/eIF2 α , die in MDCK Zellen mittels phosphospezifischer Antikörper mit Hilfe von Immunoblots untersucht wurden. Dabei konnte für zwei Varianten des Influenza Virusstamms A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), die während ihrer Replikation in MDCK Zellen unterschiedliche finale Virustiter erreichen, gezeigt werden, dass die zuvor genannten Signaltransduktionskaskaden in unterschiedlich hohem Maße induziert werden, wobei eine stärkere Induktion während der Infektion mit der weniger gut replizierenden Variante des Virusstamms beobachtet werden konnte. Anfänglich wurden diese Erkenntnisse durch Experimente gewonnen, in denen die MDCK Zellen mit einer *hohen multiplicity of infection* (MOI) infiziert worden sind. Später konnte dann gezeigt werden, dass sich diese Ergebnisse teilweise auch bei einer geringen MOI Infektion sowie unter Bedingungen reproduzieren ließen, die denen gleichen, die während des Impfstoffproduktionsprozesses im Bioreaktor vorherrschen. Zusätzlich dazu wurden Anstrengungen unternommen, um mit Hilfe der RNAi Technologie sowie mittels des Einsatzes eines *small molecule* Inhibitors zu klären, inwieweit sich die untersuchten Signalwege, und dabei insbesondere die Induktion der PKR vermittelten Phosphorylierung von eIF2 α , tatsächlich auf die Replikation des Influenza Virus auswirken.

Anders als dies ursprünglich erwarten worden war, konnte nicht gezeigt werden, dass die Aktivität der Kinase PKR einen limitierenden Faktor für die Replikation des Influenza Virus darstellt, gemessen an dem finalen erreichten Virustiter. Nichtsdestotrotz stellen die Ergebnisse, die erhalten werden konnten, einen wichtigen Beitrag für ein besseres Verständnis der Virusreplikationsvorgänge in einem zellkulturbasierten Impfstoffproduktionsprozess dar. Dies könnte in Zukunft dazu beitragen, die Generierung von optimierten Produktionszelllinien zu erleichtern.