

DISS. ETH NO. 19393

**Novel host cell factors required for influenza A virus entry**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

JATTA KRISTIINA HUOTARI

M.Sc. Molecular Biology, University of Jyväskylä, Finland

born on 6th September, 1980

citizen of Finland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Ari Helenius, examiner  
Prof. Dr. Urs Greber, co-examiner  
Prof. Dr. Hubert Hilbi, co-examiner  
Dr. Marko Kaksonen, co-examiner

2010

## Summary

Influenza A virus (IAV) infects cells by hijacking the host cell endocytic machinery. The virus is known to attach to cell surface glycoproteins bearing sialic acid residues. These are, however, thought to act as mere attachment factors, as internalization requires an active signal into the cell. These internalization receptor(s) have not yet been identified for IAV. Uptake of the virus results in trafficking to acidic late endosomes, the site of viral uncoating and membrane fusion. Fusion is initiated by the viral glycoprotein, Hemagglutinin (HA), which undergoes a conformational change upon exposure to low pH. Similar to uptake, entry into the late endosomal pathway requires an active signal. Although the general framework of IAV entry has been established for quite a while, the molecular details are largely unknown.

To gain further insight into the molecular requirements of IAV entry, we focused on two sets of host cell factors: host cell surface proteins and proteins needed for active sorting of the virus into the late endosomal pathway.

In part I of this thesis we focused on a host cell surface protein, Vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR<sub>3</sub>). VEGFR<sub>3</sub> is a receptor tyrosine kinase (RTK), which was originally identified in siRNA screens, done in collaboration, as a novel host cell factor of IAV. We validated these results and further demonstrated that siRNA mediated depletion of VEGFR<sub>3</sub> results in a strong decrease of IAV infection. We additionally showed that inhibition of VEGFR<sub>3</sub> activity, using a chemical compound, AAL-993, decreased AIV infection. Interestingly, our results suggested that activity of VEGFR<sub>3</sub> was required in an autophosphorylation independent manner. Moreover, VEGFR<sub>3</sub> was not required for internalization of IAV or for delivery into acidic late endosomes. In the presence of the VEGFR<sub>3</sub> inhibitor, virus incapable of uncoating was found to accumulate in late endosomes. These results suggest that VEGFR<sub>3</sub> is required for proper endosomal escape of the virus, perhaps by regulating endosomal maturation.

Part II of this thesis focuses on the role of ubiquitination in IAV entry. Many membrane-associated cargoes destined for the endolysosomal pathway require the attachment of ubiquitin, which serves as a signal recognized at the level of sorting endosomes. We found that inhibition of ubiquitination using an E1-ligase inhibitor, UBEI-41, results in a block of IAV infection. The block occurred during endosomal trafficking and results in accumulation of the virus in late endosomes. Interestingly, acidification of HA was not disturbed. In addition, siRNA-mediated depletion of components required for sorting of ubiquitinated cargo, ESCRT as well as GGA proteins resulted in a similar phenotype. We propose that a cellular receptor is activated and ubiquitinated upon IAV infection, and that this is required for ESCRT- and/or GGA-mediated sorting of the virus into the late endosomal pathway or for proper endosome maturation.

In part III of the thesis we looked into the role of Cullin-3 (Cul3) in membrane trafficking. Cul3 acts as scaffold for a number of ubiquitin E3 ligase complexes, and was found as a required host cell factor in siRNA screening with IAV. Validation and further characterization of the block in IAV infection showed that upon depletion of Cul3, uncoating of IAV was blocked and virus accumulated in acidic endosomes, most likely late endosomes. Due to similar results with known endocytic factors such as the ones described above, these results suggested that in the absence of Cul3, late endosome maturation was defective. In line with this, we observed morphological changes in late endosomes. Some cells depleted of Cul3 showed a highly vacuolated phenotype with enlarged, aberrant Rab7 containing endosomes, which were partially acidified. Phenotypically these endosomes resembled those in which the lipid composition of late endosomes is altered. Therefore, we conclude that Cul3 is required for proper late endosome maturation. To gain further insight into the molecular targets of Cul3 in these processes, we performed siRNA screening of the adaptor proteins of Cul3, so called BTB proteins, which confer specificity towards the ubiquitin substrates. Out of 150 BTBs, we have narrowed down our search to 11 BTBs, which are currently under investigation. By identifying the BTB(s) involved in the aforementioned processes, we hope to find

the molecular targets of Cul3 and provide further understanding of the regulatory processes in endosome maturation.

In conclusion, we have found several new players involved in IAV entry. Interestingly, inhibition or depletion of these factors did not have an impact on the pH mediated conformational change of the viral surface glycoprotein, HA. Therefore, these results suggest that endosome maturation is required for IAV entry, not only for acidification of HA but perhaps for membrane fusion or uncoating. Future studies will aim to unravel what these requirements are and their impact on virus entry.

## Zusammenfassung

Influenza A infiziert Zellen über die endozytotische Maschinerie. Das Virus bindet an Sialinsäure-Einheiten der Glykoproteine an der Zelloberfläche. Es wird jedoch angenommen, dass diese lediglich als Bindungsrezeptoren wirken, da für die Internalisierung Rezeptoren benötigt werden, die zur aktiven Signaltransduktion an das Zytosol befähigt sind. Solche Rezeptoren wurden für Influenza A jedoch noch nicht identifiziert. Nach der Endozytose des Virus wird es in die sauren sogenannten „späten Endosomen“ sortiert, in denen auch die Membranfusion und das Entpacken geschieht. Die Fusion wird durch das virale Glykoprotein Hämagglutinin (HA) initiiert, welches seine Konformation durch den niedrigen pH ändert. Nicht nur die Aufnahme in die Zelle sondern auch die Aufnahme in späte Endosomen erfordert eine aktive Signaltransduktion. Obwohl die generellen Prinzipien der Influenza-Endozytose in Wirtszellen bereits beschrieben sind, kennt man wichtige molekulare Details noch nicht.

Um diese Details zu entschlüsseln fokussieren wir uns auf zwei verschiedene Arten von Wirtsfaktoren: auf die Anforderungen des Virus an die Oberflächenstruktur der Wirtszelle, und auf Faktoren die für die Sortierung in späte Endosomen gebraucht werden.

Im ersten Teil der Doktorarbeit fokussieren wir uns auf das Zelloberflächenprotein Vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR3) des Wirtes. VEGFR3 ist eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase, welche in einer Kollaboration in einem siRNA Screen als neuer Wirtsfaktor für Influenza A Infektion identifiziert wurde. Wir validieren die Primärdaten und zeigen, dass eine Reduktion von VEGFR3 zu verminderter Influenza A Infektion führt. Interessanterweise deuten unsere Ergebnisse auch darauf hin, dass VEGFR3 unabhängig von Autophosphorylierung gebraucht wird. Außerdem wird VEGFR3 nicht für die Internalisierung von Influenza A sowie für die Sortierung in späte saure Endosomen gebraucht. In Gegenwart von VEGFR3 Inhibitoren beobachten wir jedoch, dass der Virus in den späten Endosomen akkumuliert, und nicht fähig zur Entpackung ist. Unsere

Resultate besagen also, dass VEGFR3 wichtig ist für die Freisetzung des Virus aus Endosomen, möglicherweise über die Reifung der Endosomen.

Der zweite Teil der Arbeit konzentriert sich auf die Rolle der Ubiquitinierung während der Influenza A Infektion. Die meiste membranassoziierte Fracht, welche für den endosomalen Weg bestimmt ist, erfordert die kovalente Bindung von Ubiquitin, das als ein Signal dient, welches während der endosomalen Sortierung erkannt wird. Wir fanden heraus, dass die Hemmung der Ubiquitinierung mithilfe eines E1-Ligase-Inhibitors, UBEI-41, einen Block der Influenzavirus-Infektion nach sich zieht. Ubiquitinierung wird am Anfang benötigt, da Zugabe von UBEI-41 15 min nach der Virus-Aufnahme keine hemmende Wirkung mehr hatte. Der Block trat während der endosomalen Bildung auf, und führte zur Anhäufung des Virus in sauren Endosomen. Darüber hinaus hat der siRNA-vermittelte Abbau von Komponenten der Sortierung von ubiquitinierten Proteinen, wie ESCRT und GGA-Proteine, einen ähnlichen Phänotyp. Wir schlagen vor, dass ein zellulärer Rezeptor aktiviert und ubiquitiniert wird während der Influenza-Infektion, und dass dies notwendig ist für ESCRT- und /oder GGA-vermittelte Sortierung des Virus in den späten endosomalen Weg, oder für die ordnungsgemäße endosomale Reifung.

Im dritten Teil der Arbeit untersuchten wir die neue Rolle von Cullin-3 (Cul3) in der Membransortierung an. Cul3 fungiert als ein Gerüstprotein für eine Reihe von Ubiquitin-E3-Ligase-Komplexe. Es wurde bereits als essentiellen Faktor für die Influenza-A-Infektion im siRNA-Screening entdeckt. Validierung und weitere Charakterisierung des Blocks während der viralen Infektion zeigten, dass beim Abbau von Cul3 die Entpackung von Influenza verhindert wurde und sich Viren in sauren endosomalen Strukturen ansammelten. Ähnliche Ergebnisse mit bekannten endozytotischen Faktoren, wie oben beschrieben, zeigen, dass in Abwesenheit von Cul3 die späte Endosomenreifung defekt war. Im Einklang damit beobachteten wir morphologische Veränderungen in späten Endosomen. Einige Zellen ohne Cul3 zeigten einen sehr vakuolisierten Phänotyp, mit vergrößerten Rab7-positiven Endosomen, die teilweise einen niedrigen pH aufwiesen. Dieser endosomale Phänotyp gleicht jedem von Zellen, in denen die Lipidzusammensetzung später Endosomen verändert wird. Daraus schließen wir, dass Cul3 für eine späte

endosomale Reifung benötigt wird. Um weitere Einblicke in die molekularen Bindungspartner von Cul3 in diesem Prozess zu gewinnen, führten wir ein siRNA Screening der Adapter-Proteine von Cul3, die sogenannten BTB-Proteine, durch. Diese Proteine verleihen Cul3 ihre Spezifität gegenüber der Ubiquitin-Substrate. Ausgehend von 150 BTB's haben wir unsere Suche auf 11 BTB's eingengt. Durch die Identifizierung der BTB's in den vorhergenannten Prozessen hoffen wir, die molekularen Funktionen von Cul3 zu finden, und mehr über der regulatorischen Vorgänge der Endosomenreifung zu lernen.

Zusammenfassend haben wir mehrere neue Komponenten gefunden, die an der Influenza-A-Infektion beteiligt sind. Interessanterweise hat die Hemmung oder der Abbau dieser Faktoren keinen Einfluss auf die Ansäuerung der Endosomen. Daher legen diese Ergebnisse nahe, dass die Endosomenreifung für die Infektion erforderlich ist, und nicht nur für die säurevermittelte Konformationsänderung von HA. Mögliche Schritte könnten die Membranfusion oder das Entpacken des Virus sein. In zukünftigen Studien muss herausgefunden werden, welche Anforderungen nötig sind, und was für einen Effekt sie auf den Virus haben.