



Doctoral Thesis

Host cell entry of vaccinia virus extracellular virions

Author(s):

Schmidt, Florian Ingo

Publication Date:

2011

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-007132904> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH N° 20046

HOST CELL ENTRY OF VACCINIA VIRUS EXTRACELLULAR VIRIONS

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

FLORIAN INGO SCHMIDT

Master of Science in Biochemistry, TU Munich
born November 25th, 1981
citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Ari Helenius, examiner
Prof. Urs Greber, co-examiner
Dr. Michael Way, co-examiner

2011

Summary

Vaccinia virus (VACV) is the prototypic poxvirus and is complex in both composition and life cycle. In contrast to most viruses, poxviruses produce two types of infectious particles with different roles in virus dissemination: Mature virions (MVs) mediate host-to-host transmission, whereas extracellular virions (EVs) accomplish virus dissemination in an infected organism. While MVs are enveloped by a single lipid membrane, EVs exhibit an unusual composition – they consist of an MV-like particle that is wrapped with a second membrane.

Like all viruses, poxviruses depend on the host cell machinery to reach their final site of replication in the cytosol. Host cell entry of MVs is known to involve macropinocytosis and fusion of viral membranes with cellular membranes of endocytic compartments. Due to their topology, EVs require an unusual entry strategy and the outermost membrane is thought to be lost by nonfusogenic disruption, whereas the inner membrane is removed by fusion. Hence, EV and MV entry both result in the release of viral cores containing the DNA genome into the host cell cytosol.

The aim of this thesis was to understand the cellular entry process of VACV EVs in detail. We wanted to investigate whether this process involves endocytosis, where and how the EV membrane is lost, and which cellular factors and processes were exploited in the course of this process. Furthermore, we intended to study the processes that occur after release of viral cores into the cytosol and allow early gene expression.

The first results part of this thesis, chapter 2, describes a number of recombinant VACV strains that were generated to study various aspects of the VACV life cycle. Strains expressing fluorescent proteins under the control of temporally controlled viral promoters were generated that allow the quantification of infection or different phases of viral gene expression. VACV strains expressing fluorescent proteins fused to structural viral proteins were constructed and combined to visualize and distinguish structural components of MVs and EVs. The described tools were in part used to study EV entry and core activation in the subsequent chapters.

In order to study EV entry, we set up a protocol for EV production, which is summarized in chapter 3. The characterization of the produced EVs and efforts to improve the fraction of intact EVs are described herein.

The results of our investigations on the cellular entry mechanism of VACV EVs are presented in chapter 4. EV entry into HeLa cells was studied using fluorescence and electron microscopy in combination with flow cytometry. We show that complete EVs are internalized by macropinocytosis and that this step is actively triggered by EVs. Acidification of macropinosomes induces disruption of EV membranes and this exposes the underlying MV-like particle. The latter presumably fuses with cellular membranes and releases the viral core into the host cell cytosol.

First results of our ongoing efforts to elucidate the mechanisms underlying core activation after fusion are presented in chapter 5. Morphological changes in viral structures were observed by EM to occur immediately after viral fusion and may involve the reduction of disulfide bonds in proteins that comprise the viral core wall. Lateral bodies, proteinaceous structures that are packaged into VACV MVs and EVs in addition to the cores, dissociate from viral cores upon fusion. Both processes, core activation and dissociation of lateral bodies, require cellular factors or components. They cannot be recapitulated by removal of membranes and reduction *in vitro*. We found evidence that disulfide bonded high molecular weight complexes of the viral protein F18 comprise the lateral bodies. Reduction of these may release monomeric F18 into the cytosol, where F18 could exert effector functions or be degraded.

Zusammenfassung

Vaccinia Virus (VACV) ist der Modellvirus unter den Pockenviren und hat einen komplexen Aufbau und Lebenszyklus. Im Gegensatz zu den meisten anderen Viren produzieren Pockenviren zwei verschiedene infektiöse Partikel: „Mature Virions“ (MVs) vermitteln die Verbreitung von Viren zwischen Wirten und „Extracellular Virions“ (EVs) übertragen die Infektion innerhalb eines Wirtes. MVs sind mit einer einzelnen Lipidmembran umhüllt, EVs dagegen haben einen ungewöhnlichen Aufbau – sie bestehen aus einem MV-ähnlichen Partikel, der von einer zweiten Lipidmembran umgeben ist.

Wie alle Viren sind Pockenviren auf Mechanismen der Wirtszelle angewiesen um ins Zytosol zu gelangen, wo die Replikation der Viren stattfindet. MVs werden durch Makropinozytose aufgenommen und fusionieren anschliessend mit den zellulären Membranen endozytotischer Vesikel. Aufgrund ihrer zusätzlichen Membran müssen EVs einen ungewöhnlichen Mechanismus anwenden um in Wirtszellen zu gelangen. Es wird angenommen, dass die äussere Membran durch einen bisher nicht verstandenen Mechanismus geöffnet wird, während die innere Membrane mit zellulären Membranen fusioniert. Der Zelleintritt von beiden infektiösen VACV Formen, MVs und EVs, endet also damit, dass die viralen Cores mit dem DNA-Genom durch Fusion ins Zytosol gelangen.

Das Ziel dieser Doktorarbeit war es, den Eintrittsmechanismus von VACV EVs in Wirtszellen im Detail zu verstehen. Wir wollten herausfinden, ob der Zelleintritt von EVs Endozytose benötigt, wo und wie die EV-Membran verloren geht und welche zellulären Faktoren und Mechanismen dabei ausgenutzt werden. Weiterhin wollten wir die Schritte untersuchen, die auf die Freisetzung der viralen Cores ins Zytosol folgen und frühe virale Genexpression ermöglichen.

Der erste Ergebnisteil dieser Arbeit, Kapitel 2, beschreibt rekombinante VACV-Stämme, die konstruiert wurden um verschiedene Aspekte des viralen Lebenszyklus zu untersuchen. Wir haben Virusstämme generiert, die fluoreszente Proteine unter der Kontrolle verschiedener viraler Promotoren exprimieren. Diese werden zu verschiedenen Zeiten im viralen Lebenszyklus

angeschaltet. Die entsprechenden Virusstämme erlauben uns, Infektion im Allgemeinen und die verschiedenen viralen Genexpressionsphasen im Speziellen zu quantifizieren. Um verschiedene strukturelle Komponenten in MVs und EVs einzeln und in Kombination zu visualisieren, haben wir verschiedene Virusstämme konstruiert, die strukturelle Proteine fusioniert mit fluoreszenten Proteinen exprimieren. Einige der beschriebenen rekombinanten Virenstämme wurden in den nachfolgenden Teilen dieser Arbeit verwendet um EV-Eintrittsmechanismen und Core-Aktivierung zu untersuchen.

Um EV-Eintrittsmechanismen untersuchen zu können, wurde ein Protokoll zur Produktion von EVs etabliert, das in Kapitel 3 zusammengefasst ist. In diesem Abschnitt werden zudem die produzierten EVs charakterisiert und verschiedene Versuche beschrieben, den Anteil intakter EVs zu erhöhen.

Die Resultate unserer Untersuchungen zum Eintrittsmechanismus von VACV EVs werden in Kapitel 4 dargestellt. Virus-Eintritt in HeLa-Zellen wurde dabei mittels Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie sowie Durchflusszytometrie untersucht. Wir konnten zeigen, dass vollständige EVs durch Makropinozytose internalisiert werden und dass Makropinozytose aktiv von EVs stimuliert wird. Ansäuerung von Makropinosomen induziert das Aufreißen der EV-Membran und setzt den darunterliegenden MV-ähnlichen Partikel frei. Dieser kann dann mit zellulären Membranen fusionieren und das virale Core ins Zytosol entlassen.

Erste Resultate unserer aktuell laufenden Untersuchungen zum Mechanismus der Core-Aktivierung nach Fusion werden im Kapitel 5 vorgestellt. Morphologische Veränderungen der viralen Core-Struktur lassen sich sofort nach Fusion in elektronenmikroskopischen Bildern beobachten. Daran beteiligt sein könnte die Reduktion von Disulfidbrücken in Proteinen der Core-Wand. Lateralkörper – Protein-Strukturen die zusammen mit dem Core in MVs und EVs eingeschlossen werden – trennen sich bei der Fusion von den Cores. Sowohl die morphologischen Änderungen als auch der Verlust der Lateralkörper benötigt zelluläre Faktoren. Beide Prozesse können nicht durch die Solubilisierung von Membranen in Gegenwart von Reduktionsmitteln *in vitro* rekapituliert werden. Wir haben Hinweise darauf gefunden, dass hochmolekulare Komplexe aus dem disulfid-verbrückten viralen Protein F18 die Lateralkörper bilden. Reduktion der Disulfidbrücken könnte monomeres F18 ins Zytosol freisetzen, wo F18 als Effektorprotein wirken oder abgebaut werden könnte.