

Infection dynamics and virus-induced apoptosis in influenza virus A infected adherent and suspension MDCK cells

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

von Dipl.-Biochem. Britta Peschel

geb. am 06.07.1984 in Göttingen

genehmigt durch die Fakultät für Verfahrens- und Systemtechnik
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Promotionskommission:

Prof. Dr. rer. nat. Dieter Schinzer (Vorsitz)

Prof. Dr.-Ing. Udo Reichl (Gutachter)

Prof. Dr. rer. nat. Bettina Weiß (Gutachterin)

Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Marwan (Gutachter)

eingereicht am: 27.11.2014

Promotionskolloquium am: 17.04.2015

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

Band 44

Britta Peschel

**Infection dynamics and virus-induced apoptosis in
influenza virus A infected adherent and suspension
MDCK cells**

Shaker Verlag
Aachen 2015

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., 2015

Copyright Shaker Verlag 2015

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 978-3-8440-3738-8

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

Abstract

Besides the classical production in embryonated chicken eggs, influenza vaccines can also be produced in cell culture-based processes. These cell culture processes have many advantages over egg-based processes such as a higher flexibility regarding lead times of production campaigns and as an alternative for vaccine manufacturing in case of avian influenza epidemics. To optimise productivity of cell culture processes not only improved cell growth but also the understanding of virus host cell interaction is of crucial importance. Thereby, limiting steps and starting points for optimisation of upstream processing can be identified. In order to contribute to this understanding, aim of this thesis was to characterise influenza virus infection dynamics and virus-induced apoptosis of host cells. Flow cytometric staining of the influenza virus NP protein was used to monitor the time course of infection and a TUNEL assay to characterise progress of apoptosis.

Firstly, studies on statistical analysis of flow cytometric data including the choice of cytometric control samples were carried out. Secondly, infections of adherent Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells with different influenza virus strains at several multiplicity of infection (MOI) were performed, followed by studies on defective interfering particles (DIPs). Thirdly, infections of adherent MDCK cells were additionally performed in stirred tank bioreactors (STR). Finally, the MDCK.SUS2 suspension cell line was characterised for influenza virus propagation. Analysis of virus-induced apoptosis and infection dynamics both in dependence of virus strain and MOI as well as for an adherent and a suspension cell line are unique features of this thesis. In addition, data obtained in this work were used in research collaborations for stochastic as well as deterministic mathematical models of influenza virus propagation in cell culture.

At MOI 10^{-4} all influenza virus strains tested in adherent MDCK cells in T25-flasks (A/PR/8 from the Robert Koch Institute (RKI) and from the National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), A/Uruguay/716/2007-like high growth reassortant (HGR) and A/Wisconsin/67/2005-like HGR) showed few strain-specific differences in haemagglutination (HA) titre and Tissue Culture Infective Dose 50 (TCID₅₀) and a late apoptosis induction. In MOI 3 infections with influenza A/PR/8 NIBSC an early and strong apoptosis induction and no increase in TCID₅₀ was observed. For all strains, except for the Wisconsin-like HGR, maximum HA titre was not affected by the MOI, with $3.0 \log_{10}$ HAU/100 μ L as highest HA titre obtained in infections with the Uruguay-like HGR. In contrast, maximum TCID₅₀ decreased with increasing MOI, probably caused by DIPs. Overall, these data demonstrate the importance of low MOI infection conditions in virus production to obtain high infectious virus titres.

The influence of DIPs on infection dynamics, HA titre, and TCID₅₀ was demonstrated in infections of adherent MDCK cells with influenza A/PR/8 NIBSC seed virus containing 5.4×10^6 to 1.0×10^9 infectious virus particles (IVP)/mL (0.2% to 21.3% IVP of total virus particles). A high percentage (21.3%) in the seed virus resulted in maximum TCID₅₀ of 3.2×10^9 IVP/mL, while in infections with virus seeds containing low amounts of IVP (0.2%) no increase in TCID₅₀ was observed. This demonstrates that virus seeds have to be carefully controlled to guarantee high yield virus production.

Infections of adherent MDCK cells with influenza virus A/PR/8 NIBSC in STR showed a 4 h earlier onset of infection with a $0.6 \log_{10}$ HAU/100 μ L lower final HA titre, compared to infections with influenza A/PR/8 RKI. Influenza Uruguay-like and Wisconsin-like HGRs did not reach final HA titres and maximum TCID₅₀ of infections with A/PR/8 RKI ($3.3 \log_{10}$ HAU/100 μ L, 1.3×10^9 IVP/mL). A low MOI infection (10^{-5}) of MDCK cells with influenza A/PR/8 RKI resulted in an increased maximum TCID₅₀ of 2.4×10^9 IVP/mL compared to MOI 0.025 infections. In addition, infection of adherent MDCK cells with influenza A/PR/8 RKI in serum-free medium without washing steps was performed that showed final HA titre, maximum TCID₅₀, and infection dynamics comparable to infections with washing steps. Thus, direct infection was successfully demonstrated to be a possible alternative for influenza virus propagation.

As an alternative to the use of adherent MDCK cells, the suspension cell line MDCK.SUS2 was characterised for influenza virus A propagation in serum-free medium. Testing different medium exchange strategies revealed a 1:2 dilution of the culture broth at time of infection as optimal to achieve fast onset of infection and to obtain high HA titres. MOI 10^{-5} infections of MDCK.SUS2 cells with influenza A/PR/8 RKI showed lower HA titres and TCID₅₀ and more pronounced virus-induced apoptosis levels compared to adherent MDCK cells. Future studies will have to clarify whether the increased apoptosis of MDCK.SUS2 cells is related to changes in cellular factors during the cell line adaptation process.

In summary, this work demonstrated low MOI infection conditions to be beneficial for optimisation of TCID₅₀ yields in influenza A virus production. Infection dynamics depended, however, on virus strain, especially in terms of virus-induced apoptosis. In addition, presence of DIPs in seed virus strongly influenced infectious virus yields. Finally, a MDCK suspension cell line was demonstrated to be an alternative to adherent MDCK cells, offering a production process that is easier to scale-up. Still, in infections with adherent MDCK cells higher HA titre and TCID₅₀ were obtained. Concluding, this work contributed to the understanding of influenza virus propagation in cell culture, and provided valuable insights for optimisation of upstream processing in influenza vaccine production.

Kurzfassung

Als Alternative zur Produktion in bebrüteten Hühnereiern werden Influenza Vakzine heute teilweise bereits in zellkulturbasierten Prozessen hergestellt. Diese Prozesse bieten einige Vorteile wie eine hohe Flexibilität der Produktionsvorlaufzeiten und sind eine Alternative zur Vakzinproduktion im Falle von Vogelgrippeausbrüchen. Zahlreiche Zelllinien werden in der Literatur als zur Influenzavirusvermehrung geeignet beschrieben. Zur Erhöhung der Produktivität dieser zellkulturbasierten Prozesse ist nicht nur die Verbesserung des Zellwachstums von Bedeutung, sondern auch das Verständnis der Virus-Wirtszell-Interaktion. Dies ermöglicht das Auffinden limitierender Schritte und Ansatzpunkte zur Optimierung des *Upstream Processing*. Ziel dieser Arbeit war durch die Charakterisierung von Influenza Virus Infektionsdynamiken und virusinduzierter Apoptose einen Beitrag hierzu zu leisten. Dazu wurden eine durchflusszytometrische Färbung eines Virusproteins sowie ein TUNEL Assay zur Apoptosemessung durchgeführt.

Zunächst wurde die statistische Auswertung durchflusszytometrischer- und Virustiter-Daten sowie die Wahl der Kontrollproben für die Zytometrie untersucht. Dann wurde in statischen Kulturgefäßen der Einfluss der *multiplicity of infection* (MOI) sowie die Rolle von *defective interfering particles* (DIPs) analysiert. Im Anschluss wurden Rührkesselversuche mit adhärennten Zellen durchgeführt. Schließlich wurde eine Suspensionszelllinie zur Influenzavirusvermehrung charakterisiert. Die Analyse von Infektionsdynamik und virusinduzierter Apoptose in Abhängigkeit der MOI und des Virusstammes sowie im Vergleich einer adhärennten mit einer Suspensionszelllinie sind Alleinstellungsmerkmale dieser Arbeit. Darüber hinaus wurden Daten dieser Arbeit zur mathematischen Modellierung der Influenzavirusvermehrung in Zellkultur im Rahmen von Forschungsk Kooperationen genutzt.

Infektionen adhärennter *Madin-Darby canine kidney* (MDCK) Zellen in T-Flaschen bei MOI 10^{-4} zeigten geringe Unterschiede in Hämagglutinations (HA) Titer und *Tissue Culture Infective Dose 50* (TCID₅₀) und eine späte virusinduzierte Apoptose aller getesteten Virusstämme (A/PR/8 vom Robert-Koch-Institut (RKI) und vom *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC), A/Uruguay/716/2007-like *high growth reassortant* (HGR) und A/Wisconsin/67/2005-like HGR). Infektionen mit Influenza A/PR/8 NIBSC zeigten bei MOI 3 eine frühe und starke Apoptoseinduktion sowie keinen Anstieg im TCID₅₀. Außer für Wisconsin-like zeigten die finalen HA Titer keine Abhängigkeit von der MOI; der höchste Titer $3.0 \log_{10}$ HAU/100 μ L wurde in Infektionen mit Uruguay-like HGR erzielt. Im Gegensatz zum HA Titer nahm der maximale TCID₅₀ mit zunehmender MOI ab, vermutlich durch die Anreicherung von DIPs bei hohen MOI. Die Daten zeigen damit, dass niedrige MOI eine besondere Rolle für hohe TCID₅₀ spielen.

Der Einfluss von DIPs auf Infektionsdynamik und Virustiter wurde weiter in einer Studie mit verschiedenen Chargen A/PR/8 NIBSC Saatvirus untersucht, die TCID₅₀ zwischen 5.4×10^6 und 1.0×10^9 infektiöse Viruspartikel (IVP)/mL (0.2 bis 21.3% IVP) besitzen. Saatvirus mit hohem Anteil an IVP (21.3%) erzielte einen maximalen TCID₅₀ von 3.2×10^9 IVP/mL, wohingegen Saatvirus mit geringem Anteil an IVP (0.2%) keinen Anstieg im TCID₅₀ bewirkte. Dies zeigt, dass die Saatviruszusammensetzung kontrolliert werden muss, um hohe Virustiter in der Influenzavakzinproduktion zu erhalten.

Rührkesselinfektionen adhärenter MDCK Zellen mit A/PR/8 NIBSC zeigten einen um 4 Stunden früheren Anstieg und einen um $0.6 \log_{10}$ HAU/100 μ L niedrigeren HA Titer im Vergleich zu A/PR/8 RKI Infektionen. Auch mit Influenza Uruguay-like und Wisconsin-like HGRs wurden nicht so hohe Titer wie mit A/PR/8 RKI ($3.3 \log_{10}$ HAU/100 μ L, 1.3×10^9 IVP/mL) erreicht. Infektionen mit A/PR/8 RKI bei niedriger MOI (10^{-5}) zeigten im Vergleich zu MOI 0.025 einen erhöhten maximalen TCID₅₀ von 2.4×10^9 IVP/mL. Außerdem zeigte eine direkte Infektion in serumfreiem Medium ohne Waschschrte kaum Veränderungen in HA Titer, TCID₅₀ und Infektionsdynamik verglichen mit Infektionen mit Waschschrten. Damit wurde eine komplett serumfreie Virusvermehrung als gute Alternative zu Prozessen mit Zellwachstum in serumhaltigem Medium aufgezeigt.

Als Alternative zu adhärenen Zellen wurde die Suspensionszelllinie MDCK.SUS2 zur Virusvermehrung in serumfreiem Medium charakterisiert. Der Vergleich verschiedener Mediumswechselstrategien zeigte, dass eine direkte Infektion ohne Waschschrte zwar möglich, eine 1:2-Verdünnung zum Zeitpunkt der Infektion aber optimal ist, um eine schnelle Infektionsdynamik und hohe Virustiter zu erzielen. MOI 10^{-5} Infektionen zeigten allerdings niedrigere HA Titer und TCID₅₀ sowie eine deutlich verstärkte virusinduzierte Apoptose als bei adhärenen MDCK Zellen beobachtet. Weitere Studien werden klären müssen inwieweit die verstärkte Apoptose mit zellulären Veränderungen durch den Adaptationsprozess zusammenhängt.

Zusammenfassend hat diese Arbeit den positiven Einfluss niedriger MOI auf infektiöse Virustiter in der zellkulturbasierten Influenzavermehrung dargelegt. Der Einfluss der MOI hing dabei stark vom Virusstamm ab, besonders in Hinblick auf virusinduzierte Apoptose. Des Weiteren wurde gezeigt, dass DIPs die infektiöse Virusausbeute beeinflussen. Schließlich wurde die MDCK.SUS2 Zelle als leicht hochzuskalierende Alternative zur adhärenen MDCK Zelle getestet. Allerdings blieben HA Titer und TCID₅₀ unter denen adhärenen MDCK Zellen. Damit trägt diese Arbeit zum Verständnis der Virusvermehrung in Zellkultur bei und zeigt wertvolle Möglichkeiten zur Optimierung des *Upstream Processing* der Influenzavakzinproduktion auf.

Preface

The work presented in this thesis was conducted during my time as scientific employee at the Max Planck Institute for Dynamics of Complex Technical Systems in Magdeburg from October 2008 until September 2013.

My special thanks are directed to Prof. Dr.-Ing. Udo Reichl (Max Planck Institute for Dynamics of Complex Technical Systems and Otto von Guericke University Magdeburg) for the supervision, the interesting topic, and the possibility to participate at numerous national and international conferences. In addition, special thanks go to PD Dr. rer. nat. habil. Yvonne Genzel (Max Planck Institute for Dynamics of Complex Technical Systems Magdeburg) for the supervision, fruitful discussion, and advice. Additional thanks I owe to Prof. Dr. rer. nat. Bettina Weiß (University of Applied Sciences Esslingen), Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Marwan, and Prof. Dr. rer. nat. Dieter Schinzer (both Otto von Guericke University Magdeburg) for evaluating my thesis as referees and for taking the chair of the commission, respectively.

In completing this work I benefited from the help of M.Sc. Tanja Laske and M.Sc. Sarah Frentzel who conducted their bachelor thesis within my supervision. I like to thank you for your contribution to our good work.

I greatly value the time I could spend with my colleagues at the MPI, especially of the Bioprocess Engineering Group. Here, I want to specially thank the whole Upstream Team and the Molecular Biology Team for the great collaboration inside and outside the lab.

I also gratefully acknowledge the collaborations with Dr.-Ing. Thomas Müller, Dipl.-Ing. Robert Dürr, and Dr.-Ing. Stefan Heldt, the fruitful discussions and successful publications. Furthermore, I want to thank Dr.-Ing. Robert Flassig for support with the statistical analysis of my data.

Furthermore, I am truly grateful for the support and encouragement of my family and my dear friends throughout the course of the thesis. Finally, there are no words to express my thanks to my husband Andreas who always encouraged me, who never stopped believing in me and without whose help, love, and support I would not have completed this thesis.

Britta Peschel

Wolftratshausen, April 2015

Content

1	INTRODUCTION	1
2	THEORETICAL BACKGROUND	4
2.1	Influenza virus	4
2.1.1	Influenza virus A: structure and replication	5
2.1.2	Influenza vaccines: classical production and new developments	7
2.1.3	High growth reassortant virus strains	9
2.1.4	Defective interfering virus particles	11
2.2	Influenza virus propagation using cell culture	12
2.2.1	Cell culture processes	12
2.2.2	Cell lines for influenza vaccine production	14
2.2.2.1	Adherent MDCK cell lines	14
2.2.2.2	MDCK suspension cell lines	15
2.2.2.3	Other cell lines	18
2.2.3	Role of trypsin for influenza virus replication in cell culture	20
2.3	Apoptosis	21
2.3.1	Pathways of apoptosis induction	21
2.3.1.1	Intrinsic apoptosis induction	22
2.3.1.2	Extrinsic apoptosis induction	23
2.3.1.3	ER-dependent apoptosis induction	23
2.3.2	Influenza virus infection and apoptosis	24
2.3.3	Methods for apoptosis detection	26
2.4	Flow cytometry for virus-infected host cells	27
2.4.1	Basic principle of flow cytometry	27
2.4.2	Flow cytometry for measuring apoptosis and infection in cell culture	29
2.4.3	Flow cytometric gates and controls	33
2.4.4	Role of flow cytometric data for mathematical modelling of influenza infection	33
3	MATERIAL AND METHODS	36
3.1	Cell culture	36
3.1.1	Cultivation of adherent MDCK cells	36
3.1.2	Cultivation of MDCK.SUS2 cells	38

3.2	Infections with influenza virus A	39
3.2.1	Infection of adherent MDCK cells	40
3.2.2	Infection of MDCK.SUS2 cells.....	41
3.2.3	Sample preparation for flow cytometric analysis	41
3.3	Adaptation of seed virus	43
3.3.1	Volume-based adaptation	43
3.3.2	Low MOI adaptation	43
3.4	Analytical methods	44
3.4.1	Determination of cell concentration	44
3.4.1.1	Cell concentration of adherent MDCK cells	44
3.4.1.2	Cell concentration of MDCK.SUS2 cells	45
3.4.2	HA assay	45
3.4.3	50% Tissue Culture Infectious Dose (TCID ₅₀).....	46
3.4.4	Metabolite concentration	46
3.4.5	Trypsin activity	47
3.4.6	Flow cytometric staining.....	48
3.4.7	Flow cytometric analysis.....	50
4	RESULTS AND DISCUSSION	52
4.1	Statistical data analysis	52
4.1.1	Variations in infection experiments and statistical data analysis for data sets in this thesis.....	53
4.1.2	Discussion	55
4.2	Investigation of flow cytometric control samples	56
4.2.1	Decision between uninfected and infected cell populations	56
4.2.2	Shifting cell populations.....	57
4.2.3	Discussion	58
4.3	Influenza virus replication in adherent MDCK cells using static cultivation systems	60
4.3.1	T25-flasks as small screening system	60
4.3.2	Biological variation within and between T25-flask experiments	62
4.3.3	Influence of MOI on virus titres, infection dynamics, and apoptosis induction	66
4.3.4	Discussion	73
4.4	Influence of defective interfering virus particles on virus yields	77
4.4.1	Addition of inactive seed virus to high TCID ₅₀ virus seed.....	78
4.4.2	Comparison of different influenza A/PR/8 seed viruses	79
4.4.3	Discussion	81

4.5	Infection of adherent MDCK cells in dynamic cultivation systems.....	84
4.5.1	Infections in spinner flask	85
4.5.2	Infections in stirred tank bioreactors	87
4.5.3	Discussion	97
4.6	MDCK.SUS2 cells for influenza virus propagation	110
4.6.1	Infection conditions for MDCK.SUS2 cells	111
4.6.2	Measurement of trypsin activity throughout the infection.....	120
4.6.3	Infections in stirred tank bioreactors	122
4.6.4	Infections with Uruguay-like HGR seed virus	124
4.6.5	Discussion	126
5	SUMMARY	137
6	OUTLOOK	141
7	LISTS AND BIBLIOGRAPHY	144
7.1	List of figures.....	144
7.2	List of tables	148
7.3	Bibliography	149
8	APPENDIX.....	176
8.1	Equipment and consumables	176
8.2	Chemicals.....	177
8.3	List of SOPs	179
8.4	Analysis of NP-fluorescence distributions	180

List of abbreviations

Abbreviation	Meaning
1:2dil	Infection with 1:2 dilution at toi
ATF	Alternating tangential flow
ATP	Adenosine triphosphate
BAD	B cell lymphoma 2-associated death promoter
BAEE	N- α -benzoyl-L-arginine ethyl ester
BAK	Homologous antagonist killer
BAP	Biological active particle
BAPNA	N- α -benzoyl-DL-arginine-4-nitroanilide
BAX	B cell lymphoma 2-associated X protein
Bcl-2	B cell lymphoma 2
BHK	Baby hamster kidney
BP	Band-pass filter
BSA	Bovine serum albumin
ca	Cold-adapted
CAD	Caspase-activated DNase
CAP	CEVEC's amniocyte production
CHO	Chinese hamster ovary
CHOP	Deoxyribonucleic acid damage-inducible transcript 3
cRNA	Complementary ribonucleic acid
CTL	Cytotoxic T lymphocytes
DI	Defective interfering
DIP	Defective interfering particle
DISC	Death-inducing signalling complex
DNA	Deoxyribonucleic acid
ECACC	European Collection of Cell Cultures
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ER	Endoplasmic reticulum
FADD	Fas-associated protein with death domain
FasL	Fas ligand
Fc	Fragment crystallisable
FCS	Foetal calf serum
FDA	US Food and Drug Administration
FI	Fluorescence intensity
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FL	Fluorescence light
fMLP	Formyl-methionine-leucine-phenylalanine
FSC	Forward scatter channel
GMEM	Glasgow's Minimum Essential Medium

HA	Haemagglutinin
HAU	Haemagglutination units
HEK-293	Human embryonic kidney
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HGR	High growth reassortant
hpi	Hours post infection
h	Hour
IgG	Immunoglobulin G
IRF7	Interferon regulatory factor 7
IVP	Infectious virus particles
LAIV	Live attenuated influenza vaccines
M1	Matrix protein 1
M2	Matrix protein 2
MDCK	Madin-Darby canine kidney
MESF	Molecules of equivalent soluble fluorochrome
min	Minute
MOI	Multiplicity of infection
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NA	Neuraminidase
NEP	Nuclear export protein
NF κ B	Nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells
NIBSC	National Institute for Biological Standards and Control
niCKP	Non-infectious cell-killing particles
NP	Nucleoprotein
NS1	Non-structural protein 1
NS2	Non-structural protein 2
PARP	Poly adenosine diphosphate ribose polymerase
PB1	Polymerase basic 1
PB2	Polymerase basic 2
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PFP	Plaque-forming particles
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PMT	Photomultiplier tube
pNA	p-nitroaniline
PR	Puerto Rico
PS	Phosphatidylserine
RdRp	ribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase
RIG-1	Retinoic acid-inducible gene 1
RKI	Robert Koch Institute
RNA	Ribonucleic acid

ROS	Reactive oxygen species
SD	Standard deviation
SOP	Standard operation procedure
SSC	Side scatter channel
STR	Stirred tank bioreactor
TCID50	Tissue culture infective dose 50
TdT	Terminal deoxynucleotidyl transferase
TMR	Tetramethylrhodamine
TNF	Tumour necrosis factor
toi	Time of infection
TPCK	Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick end labelling reaction
WHO	World Health Organization
wME	Infection with medium exchange
w/oME	Infection without medium exchange
VLP	Virus-like particle
vRNA	Viral ribonucleic acid
vRNP	Viral ribonucleoprotein complex
