

Projekttitel	Dnr
Betydelsen av RNA-protein interaktioner under virala luftvägsinfektioner	130055

Projektledare
Stefan Schwartz

**Innehåll:**

1. Projektets syfte och bakgrund
2. Projektets genomförande
3. Uppnådda resultat
4. Genomförda insatser för att resultaten ska komma till praktisk användning
5. Publikationer, presentationer och annan spridning inom projektets ram

## Betydelsen av RNA-proteininteraktioner i virala luftvägsinfektioner

### 1. PROJEKTETS SYFTE OCH BAKGRUND

Många av de virus som infekterar luftvägarna är RNA-virus och bland dessa är interaktioner mellan virus-RNA och cellulära RNA-bindande proteiner av yttersta vikt i virus infektionscykel. Två av de viktigaste virus som kan orsaka allvarliga luftvägsinfektioner är respiratoriskt syncytievirus (RSV) och influensavirus. Vi vill därför identifiera cellulära proteiner som binder mRNA av dessa virus och bestämma vilken roll dessa interaktioner spelar i virus replikation och patogenes. För influensavirus, kommer vi att identifiera proteiner som binder till det mycket patogena Spanska influensaviruset H1N1-1918, som dödade mer än 50 miljoner människor under en epidemi 1918-1919. Vi jämför bindningsförmåga och affiniteten hos dessa proteiner för H1N1-1918 RNA med desamma för RNA från "normal" epidemisk influensa. I vårt fall det influensa virus som för närvarande förekommer i den mänskliga befolkningen, mer specifikt H3N2-1995. Eftersom vi tidigare har upptäckt att spanska sjukan H1N1-1918 mRNA är mycket ineffektivt splitsat i humana celler jämfört med H3N2-1995 mRNA, är vi övertygade att splitsningsprocessen bidrar till virus patogena egenskaper. Vi är därför intresserade av att identifiera de proteiner som binder influensavirus mRNA och reglerar splitsning och undersöka om de bidrar till influensavirus patogenes. Influensavirus genom består av 8 segment. Vi kommer att identifiera alla cellulära proteiner som binder influensavirus segment 7 och 8 eftersom mRNA från dessa segment undergår RNA-splitsning och därför kan regleras. Av denna orsak är de av särskilt intresse. Faktum är att influensavirus NS1 protein har spekulerats bidra till detta virus extremt höga sjukdomsframkallande egenskaper.

### 2. PROJEKTETS GENOMFÖRANDE

Metoden fungerar på följande sätt för influensavirus: en biotinylerad RNA molekyl på 35 nukleotider från högpatogeta influensavirus 1918 (Spanska sjukan) fästs vid magnetiska streptavidinkulor. I en parallell reaktion fästs en RNA molekyl av motsvarande sekvens från epidemisk, lågpatoget influensavirus 1983. Dessa två inkuberas med nukleärt extrakt från humana lungepitelceller, tvättas och resuspenderas i gelladdningsbuffert. Proverna analyseras med hjälp av Western blot med en panel av antikroppar mot cellulära RNA-bindande proteiner. Proteiner som detekteras med 1918 influensavirus RNA, men inte med influensavirus 1983 eller tvärtom är av speciellt intresse.

Nyligen upptäckte vi i ett annat projekt att många RNA bindande proteiner binder ssDNA med samma sekvensspecificitet och affinitet som till ssRNA. Vi ersätter därför de biotinylerade RNA molekylerna med biotinylerade ssDNA molekyler av samma sekvens, vilket signifikant sänker kostnaden. Vi har använt olika RNA sekvenser från papillomvirus och identifierat andra RNA bindande proteiner, så metoden fungerar. När hot spots, dvs ställen på influensavirus RNA som binder många proteiner, eller när ställen på influensavirus RNA hittas till vilka cellulära proteiner endast binder till H3N2 eller H1N1 RNA, muteras dessa site i expressions plasmider som uttrycker influensavirus segment 7 eller 8 från högpatogeta influensavirus 1918 (Spanska sjukan). Ett eller flera av dessa bindningsställen muteras, plasmiderna transfekteras in i A549 celler och RNA splitsningseffektivitet analyseras med hjälp av RT-PCR. I de fall då mutationerna ändrar RNA splitsningsaktiviteten från H1N1 fenotyp (lågeffektiv splitsning) till H3N2 fenotyp (högeffektiv splitsning) innebar det att vi identifierat både den RNA sekvenser i H1N1 som hindrar effektiv splitsning av mRNA från H1N1 SAMT de cellulära proteiner som binder dessa sekvenser och sannolikt kontrollerar den splitsning som korrelerar till H1N1 respektive H3N2 splitsningseffektivitet. Dessa faktorer och RNA sekvenser är av speciellt intresse eftersom de korrelerar till patogena egenskaperna hos dessa två influensavirus typ A isolat.

### **3. UPPNÅDDA RESULTAT**

Vi har identifierat "hot spots" på dessa RNA som binder osedvanligt många proteiner och vi har identifierat proteiner som binder specifikt till endera virus. Dessa bindningsställen spekulerade vi var av speciell vikt för influensavirus mRNA splitsning eftersom denna process regleras av RNA bindande proteiner. Vi muterade dessa bindningsställen i Spanska sjukan influensaviruset H1N1-1918 segment 8 så att dessa blev identiska med sekvensen i den mindre patogena epidemiska influensa H3N2-1995. Dessa resultera i ett skift i mRNA splitsning som gjorde Spanska sjukan influensaviruset H1N1-1918 segment 8 RNA splitsning lika effektivt som i epidemiska influensa H3N2-1995. Vi har med andra ord hittat de sekvenser på influensa virus RNA som förklarar skillnader i splitsningseffektivitet mellan det mycket patogena Spanska sjukan influensaviruset H1N1-1918 och det mindre patogena epidemiska influensa H3N2-1995, och dessutom identifierat de cellulära proteiner som binder till dessa sekvenser och sannolikt orsakar skillnader i splitsning. I framtiden, bör undersökas om splitsning påverkar dessa virus patogena egenskaper i djurmodeller samt vilka delar av de humana luftvägarna som uttrycker de RNA-bindande proteiner som diskriminerar mellan det mycket patogena Spanska sjukan influensaviruset H1N1-1918 och det mindre patogena epidemiska influensa H3N2-1995.

### **4. GENOMFÖRDA INSATSER FÖR ATT RESULTATEN SKA KOMMA TILL PRAKTISK ANVÄNDNING**

**Resultaten har presenterats på följande konferens:**

**"Viruses 2016 - At the Forefront of Virus-Host Interactions. 26–28 January 2016, Basel, Switzerland. Segment 7 and 8 mRNAs from highly pathogenic Influenza A/Brevig Misson/1918/1 (H1N1) interacts with a different set of cellular splicing proteins than those from less pathogenic Influenza A/Netherlands/178/95 (H3N2). Kersti Nilsson, Samir Abdurahman, Stefan Schwartz"**

**Följande manuskript har skrivits och skall skickas till en virologisk tidskrift:**

**Kersti Nilsson, Samir Abdurahman, Stefan Schwartz. 2020.**Sequence polymorphism in influenza A virus alters binding of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) to influenza A virus segment 8 mRNAs causing different splicing efficiency of segment 8. Manuskript under sammanställning (Bilagd rapporten).

### **5. PUBLIKATIONER, PRESENTATIONER OCH ANNAN SPRIDNING INOM PROJEKTETS RAM.**

#### **A) MANUSKRIFT:**

**Kersti Nilsson, Samir Abdurahman, Stefan Schwartz. 2020.**Sequence polymorphism in influenza A virus alters binding of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) to influenza A virus segment 8 mRNAs causing different splicing efficiency of segment 8. Manuskript under sammanställning (Bilagd rapporten).

**B) KONFERENCEPRESENTATION:**

**“Viruses 2016 - At the Forefront of Virus-Host Interactions. 26–28 January 2016, Basel, Switzerland.** Segment 7 and 8 mRNAs from highly pathogenic Influenza A/Brevig Misson/1918/1 (H1N1) interacts with a different set of cellular splicing proteins than those from less pathogenic Influenza A/Netherlands/178/95 (H3N2). **Kersti Nilsson, Samir Abdurahman, Stefan Schwartz”**

**C) FUND RAISING EVENT ”GLOBAL HÄLSA – INFEKTIONSSJUKDOMAR, ETT ACCELERERANDE HOT”**, Biskopshuset i Lund den 30/11-2016. Presentation av detta influensavirusprojekt av Stefan Schwartz med titeln ”Vad gör olika influensavirus olika farliga?” enligt bilagt program och broschyr.

**D) PODD-INSPELNING PUBLICERAD DEN 22/2-2017 MED INTERVJU AV STEFAN SCHWARTZ OM DET AKTUELLA INFLUENSAVIRUSPROJKETET VILKET**

**RESULTERADE I PODDEN:** ”Influensa – en sjukdom vi inte kan bli av med” på följande web-sida: <http://www.vetenskaphalsa.se/podd-influensa-en-sjukdom-vi-inte-kan-bli-av-med/>