

KOMMISSION FÜR MEDIZINISCHE FORSCHUNG

Bericht Fleckenstein 2008/2009

Vorsitzender: Fleckenstein

Mitglieder: Belmonte, Birbaumer, Dhom, Eichelbaum, Fuchs, Gerok, Grehn, Haberland, Heinze, Lütjen-Drecoll, Meyer zum Büschenfelde, Michaelis, Mutschler, Rammensee, Rapp, Reis, Rittner, Rohen, Schmidt, Schölmerich, Vaupel, Wittern-Sterzel, Zahn

Arbeitsstelle der Akademie am Virologischen Institut der Universität Erlangen-Nürnberg: Neue persistierende Viren bei Immunopathien und Tumorkrankheiten des hämatopoetischen Systems

Mitarbeiter im Projekt: PD Dr. med. Frank Neipel, Dr. med. Dr. rer. nat. Heide Reil, PD Dr. med. Barbara Schmidt

Erregerpersistenz ist das pathogenetische Prinzip bei AIDS und bei virusbedingten Tumoren. Die Arbeitsstelle der Akademie zu *Neuen persistierenden Viren* untersucht die Rolle und Interaktionen von Lentiviren, Herpesviren und Flaviviren bei Immundefizienz und Tumorkrankheiten des blutbildenden Systems. Die Arbeiten unter Koordination durch den Kommissionsvorsitzenden werden durch Wissenschaftler des Virologischen Instituts am Klinikum der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg durchgeführt. Am Virologischen Institut sind das Nationale Referenzzentrum für die Diagnostik von Immundefizienzviren und ein Graduiertenkolleg über *Viren des Immunsystems* angesiedelt. Das Institut ist eingebunden in die DFG-Sonderforschungsbereiche SFB 473 *Schaltvorgänge der Transkription*, SFB 643 *Strategien der zellulären Immunintervention* und SFB 796 *Steuerungsmechanismen mikrobieller Effektoren in Wirtszellen*.

Das humane Herpesvirus Typ 8 (HHV 8) ist das bislang einzige bekannte Rhadinovirus des Menschen. Es wurde 1994 im Kaposi-Sarkom entdeckt. Die Arbeitsgruppe von **Priv. Doz. Dr. med. Frank Neipel** konnte durch RNA Interferenz erstmals zeigen, dass der virale Interferon-regulatorische Faktor 3 (vIRF-3) an der Onkogenese durch HHV 8 beteiligt ist. In den Jahren 2008 und 2009 wurden die Arbeiten zur Interaktion dieses Proteins mit dem zellulären Interferon-regulatorischen Faktor 5 (IRF-5) weitergeführt und abgeschlossen. Die Gruppe konnte zeigen, dass vIRF-3 durch eine nur 40 Aminosäuren umfassende Domäne mit IRF-5 interagiert. Durch die Bindung an diese Interaktionsdomäne wird IRF-5 daran gehindert, an DNA-Elemente in IRF-5 regulierten Promotoren zu binden. Die Expression von vIRF-3 blockiert die transkriptionelle Aktivität des IRF-5. Auch den Mechanismus konnte die Arbeitsgruppe aufklären: durch Bindung an ein Doppelhelix-Motiv in vIRF-3 verliert IRF-5 die Fähigkeit, an DNA-Elemente in den regulierten Promotoren zu binden. Dies inhibiert sowohl die IRF-5 vermittelte Apoptose als auch die Induktion von Interferon-gamma. Weitergeführt wurden auch die Arbeiten zur Identi-

fizierung zellulärer Rezeptoren dieses Virus, insbesondere zur funktionellen Analyse des Proteins FLJ40722. Dieses bisher völlig unerforschte Protein wurde durch Immunopräzipitation und Massenspektrometrie als Bindungspartner des abundanten viralen Hüllproteins gpK8.1 identifiziert. Diese Befunde (Lokalisation, Veränderung der Infizierbarkeit) sind kompatibel mit der Hypothese, dass mit FLJ40722 tatsächlich ein relevanter Rezeptor für HHV-8 identifiziert wurde. Neben dem viralen gpK8.1 befasste sich die Gruppe vor allem mit den beiden Glykoproteinen gH und gL. Beide Proteine bilden in der Regel einen Komplex, der bei allen Herpesviren für die Fusion von Virushülle und zellulären Membranen erforderlich ist. Obwohl gH und gL sehr gut konserviert sind, ist über die zellulären Liganden dieser Proteine kaum etwas bekannt. Es konnte zunächst gezeigt werden, dass HHV-8 gH auch unabhängig von gL an der Zytoplasmamembran exprimiert ist. Hier ist gH sowohl alleine als auch im Komplex mit gL in der Lage, Proteoglykane wie z.B. die Syndekane mit hoher Affinität zu binden. Inhibierung dieser Interaktion blockiert die Infektion mit HHV-8. Interessanterweise kann jedoch der Komplex aus gH und gL - nicht jedoch die Proteine alleine - auch an Heparansulfat-negative Zellen binden. Durch Immunpräzipitation und Massenspektrometrie gelang es erstmals, diesen potentiellen Rezeptor für gH/gL zu identifizieren. Es handelt sich um den Ephrin-A2 Tyrosinkinase-Rezeptor (EphA2), der unter anderem auf Endothelzellen exprimiert ist. Obwohl die Ephrin-Rezeptoren insgesamt die größte Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren bilden, wurden sie bisher noch nie im Zusammenhang mit viralen Infektionen gesehen. Wir konnten im Jahr 2009 klar zeigen, dass EphA2 als typischer Rezeptor für HHV-8 fungiert. So steigert Überexpression von EphA2 die Infizierbarkeit mit HHV-8, während sowohl lösliches EphA2 als auch Antikörper gegen EphA2 und Reduktion der EphA2 Expression über RNA-Interferenz die Infektion mit KSHV behindern. Die Bindung der viralen Glykoproteine gH und gL an EphA2 löst dabei nicht nur die Endozytose dieses Komplexes aus, sondern führt auch zur Autophosphorylierung dieser Tyrosinkinase. Besonders bemerkenswert ist, dass EphA2 in vielen Tumoren überexprimiert und an der Neoangiogenese beteiligt ist. Somit stellt EphA2 vermutlich nicht nur einen Rezeptor für HHV-8 dar, sondern könnte auch unmittelbar an der Pathogenese des Kaposi-Sarkoms beteiligt sein.

Die Arbeitsgruppe von **Dr. med. Dr. rer. nat. Heide Reil** untersucht das Phänomen der viralen Interferenz. Der Verlauf einer HIV-Infektion kann deutlich abgemildert werden, wenn zusätzlich eine weitere Virusinfektion mit einem für den Menschen ungefährlichen Virus, dem GB-Virus C (GBV-C), vorliegt. Mit dem GB-Virus C infizieren sich ungefähr 10 % aller Menschen im Laufe ihres Lebens meist sexuell oder parenteral, ohne dabei zu erkranken. Dabei sind in seltenen Fällen chronische Verläufe möglich. In mehreren epidemiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass GBV-C-infizierte HIV-Patienten einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber GBV-C-negativen HIV-Patienten besitzen. Aus diesem Grund untersucht die Arbeitsgruppe Reil, welche GBV-C-Proteine für die HIV-Suppression verantwortlich sind, eine Strategie, die zur Entwicklung von neuen anti-retroviralen Therapien führen könnte. Durch *in vitro*-Experimente mit GBV-C und HIV in Zellkultur konnte die Arbeitsgruppe Reil zeigen, dass eine GBV-C Infektion die HIV-Replikation signifikant unterdrücken kann. Zur Eingrenzung der verantwortlichen

Genprodukte wurde ein initiales Screening mit Hilfe von Herpesvirus saimiri-basierenden Genvektoren durchgeführt. Somit konnten menschliche T-Zellen mit HIV infiziert werden, die größere Genkassetten des GBV-C-Genoms stabil exprimierten. Diese Studien zeigten, dass mehrere Komponenten des GBV-C-Genoms an der HIV-Suppression beteiligt sind. Der 5'-Bereich, der für die strukturellen Proteine kodiert, scheint ausschließlich die frühen Schritte des HIV-Replikationszyklus zu inhibieren, wohingegen die nicht-strukturellen Proteine von GBV-C in den späteren Phasen der HIV-Replikation eingreifen. Eine weitere Eingrenzung der verantwortlichen Kandidaten erfolgt zur Zeit durch stabile und induzierbare Expression der Einzelproteine in T-Zelllinien und adhärenenten HIV-suszeptilen Zellen. Vorläufige Daten zeigen hier, dass von den nicht-strukturellen Proteinen die Serin-Protease NS3/4A und das nicht-strukturelle Protein NS5A an der HIV-Inhibition beteiligt sein könnten. Von den strukturellen GBV-C-Proteinen konnte das Glykoprotein E2, welches auf der GB-Virusoberfläche vorliegt, als spezifischer HIV-Inhibitor identifiziert werden. Durch den Einsatz von HIV-Reporterviren konnte gezeigt werden, dass ausschließlich die frühen Replikationsschritte während der HIV-Infektion sowohl von CXCR4- als auch von CCR5-tropen HIV-Isolaten durch das E2-Protein unterdrückt werden. Um die Bereiche des E2-Proteins weiter einzugrenzen, die für die HIV-Inhibition verantwortlich sind, wurde im weiteren Verlauf des Projektes ein Peptidscreening durchgeführt. Tatsächlich konnten zwei Peptide im N-terminalen Bereich des E2-Proteins identifiziert werden, welche den Eintritt von HIV in die Wirtszelle unterdrücken. Weitere Analysen weisen darauf hin, dass spezifisch die Fusion der Virusmembran mit der Plasmamembran der Wirtszelle unterbunden wird. Die IC50 liegt dabei im µM Bereich, was eine Weiterentwicklung als HIV-Therapeutikum möglich erscheinen lässt. Weiterführende Untersuchungen haben ergeben, dass nicht nur das GB-Virus selbst mit HI-Viren interferiert, sondern dass sowohl die IgG-Fraktionen von GBV-C-positiven Spendern als auch zwei spezifische monoklonale anti-E2-Antikörper eine HIV-neutralisierende Reaktion zeigen. Es konnte aufgedeckt werden, dass die kreuzreaktiven anti-E2-Antikörper Phospholipide als Bestandteile der Virushülle erkennen, sogenannte Phosphoinositole. Diese stammen von der Wirtszelle ab und werden während der Virusbildung in die Virusmembran eingebaut. Da diese Phospholipide sich nicht in den verschiedenen HIV-Subtypen unterscheiden, zeigen die anti-E2-Antikörper ein sehr breites Wirkspektrum und inhibieren auch HIV-Stämme, die sonst sehr schwer zu neutralisieren sind. Diese Erkenntnisse würden nicht nur das bessere Überleben von GBV-C infizierten HIV-Patienten erklären, sondern implizieren ebenfalls, dass mit dem GBV-C E2-Protein neue und vielversprechende HIV-Vakzinestrategien entwickelt werden können. Die Arbeiten der beiden Doktorandinnen Susan Jung und Kristin Eißmann wurden 2008 und 2009 auf der *Conference of Retroviruses and Opportunistic Infections* mit dem *Young Investigator Award* ausgezeichnet.

Die Arbeitsgruppe von **Priv.-Doz. Dr. med. Barbara Schmidt** beschäftigt sich mit der angeborenen oder nativen Immunabwehr (engl. *innate immune defense*) plasmazytoider dendritischer Zellen (PDC) bei Infektion mit dem Humanen Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1) und Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV-1). PDCs spielen als Hauptproduzenten von antiviralen Typ I-Interferonen (IFN) eine wichtige Rolle in der Erkennung und Kon-

trolle viraler Infektionen, auch weil sie eine Schlüsselstellung in der Aktivierung des erworbenen oder adaptiven Immunsystems (engl. *adaptive immune defense*) einnehmen. Die Gruppe von Frau PD Dr. Schmidt konnte 2005 veröffentlichen, dass HIV-1 und HIV-infizierte Zellen große Mengen an IFN-alpha induzieren können. Dies ist zum einen günstig, weil dadurch die HIV-Replikation unterdrückt und HIV-infizierte Zellen in den gezielten Zelltod getrieben werden. Zum anderen wurde jedoch ein immunpathogenetischer Mechanismus beschrieben, bei dem eine verstärkte IFN-Sekretion zur Apoptose uninfizierter Begleitzellen (engl. *bystander cells*) führt, was die Immundefizienz bei HIV-Infektion verstärkt. Deshalb ist es Ziel der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Schmidt, den Mechanismus der IFN-Induktion durch HIV und HIV-infizierte Zellen aufzuklären. Als wichtiger Meilenstein sollte die Rolle von Oberflächenrezeptoren für den Eintritt von HIV in PDCs charakterisiert werden. Dafür wurden selbstleuchtende Viruspartikel verwendet, deren Anheftung an die PDCs mittels Immunfluoreszenz gezeigt werden konnte. Dieser Prozeß ließ sich mit Antikörpern gegen das CD4-Molekül, nicht aber mit Antikörpern gegen die HIV-Korezeptoren CXCR4 und CCR5 blockieren. Anschließend wurden rekombinante Viren verwendet, deren Bindung an CD4 durch Mutation einer Aminosäure in der V3-Schleife des HIV-Hüllproteins beeinträchtigt oder aufgehoben war. Mit diesen Konstrukten wurden 293T-Zellen transfiziert und mit PDCs kokultiviert. Hier zeigte sich, dass die Induktion von IFN-alpha durch die Bindung an CD4 wesentlich bestimmt wurde. In gleicher Weise wurden rekombinante Viren untersucht, welche sich aufgrund der Ladung der V3-Schleife in ihrer Korezeptor-Bindung unterschieden. Der Korezeptortropismus hatte keinen Einfluß auf die IFN-alpha-Induktion, wohl aber die CD4-Bindungsaffinität dieser Viren. Durch vergleichende Sequenz-Untersuchungen konnten in der V3-Schleife neue Mutationen identifiziert werden, welche einen großen Einfluß auf die immunstimulatorische Aktivität von HIV haben könnten. Die Untersuchungen machen deutlich, dass Inhibitoren der Bindung des viralen Hüllproteins an CD4 auch die Immunpathogenese der HIV-Infektion positiv beeinflussen könnten.

In einem weiteren Projekt der Arbeitsgruppe von Barbara Schmidt wurde die Frage angegangen, ob die für die HIV-Infektion charakteristische Schwächung des nativen Immunsystems durch eine immunstimulatorische Therapie verbessert werden könnte. Bei insgesamt 23 HIV-infizierten Patienten und 16 altersangepaßten Kontrollen wurden periphere Blut-mononukleäre Zellen mit verschiedenen Klassen von unmethylierten CpG-Oligodeoxynukleotiden (ODN) stimuliert. Diese ODN unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit, IFN-alpha zu induzieren (Klasse A) oder B-Zellen bzw. Natürliche Killerzellen zu stimulieren (Klasse B). Die Klasse C vereint Eigenschaften der beiden anderen Klassen. Kürzlich wurde die neue Klasse P-ODNs beschrieben, welche sich durch die strukturelle Besonderheit eines Doppelpalindroms auszeichnet. Nach Stimulation peripherer Zellen mit diesen ODN-Klassen zeigte sich insbesondere bei HIV-infizierten Patienten mit weniger als 500 Helferzellen/ μ l ein funktionelles PDC-Defizit mit signifikant verringerter Sekretion von IFN-alpha und TNF-alpha sowie verringerter Hochregulation des Zellmigrationsmarkers CCR7 (CD197). Die neue Klasse P-ODN zeigte dagegen ein günstiges Profil auf Funktion und Phänotyp der PDCs. Deshalb könnten sie einen innovativen therapeutischen Ansatz darstellen, die geschwächte native Immunabwehr bei HIV-Infektion zu unterstützen.

In einem weiteren Forschungsprojekt wurde das Repertoire der PDC-Oberflächenrezeptoren in ihrer Rolle für die Abwehr viraler Infektionen untersucht. Dafür wurden unstimulierte und mit HSV-1 stimulierte PDCs mittels Chip-Arrays (Affymetrix), realtime-Quantifizierungen zellulärer Transkripte und durchflußzytometrischer Untersuchungen evaluiert. Erstmals konnte die Arbeitsgruppe die Rezeptoren CD156b, CD229, CD305 und CD319 auf der Oberfläche von PDCs nachweisen. Insgesamt 33 Oberflächenrezeptoren wurden signifikant reguliert, darunter Rezeptoren für die Chemotaxis, Antigen-Aufnahme, Aktivierung und Reifung, Migration, Apoptose, Zytotoxizität und Kostimulation. Zeitverläufe zeigten eine koordinierte Regulation von PDC-Oberflächenmarkern mit spezifischer Funktion wie der Wanderung in entzündetes Gewebe, der Antigenerkennung und der folgenden Migration in sekundäre lymphatische Organe. Die Daten unterstützen die multifunktionale Rolle der PDCs in der Interaktion mit anderen Zellen des nativen und adaptiven Immunsystems, insbesondere natürlichen Killerzellen und zytotoxischen T-Lymphozyten.

Publikationen der Arbeitsgruppen aus den Jahren 2008 und 2009

- Haupt, S., Donhauser, N., Chaipan, C., Schuster, P., Puffer, B., Daniels, R. S., Greenough, T. C., Kirchhoff, F., & **Schmidt, B.** (2008). CD4 binding affinity determines HIV-1 induced plasmacytoid dendritic cell interferon alpha production. *J. Virol.* **82**, 8900–8905.
- Reil, H.**, Bartlime, A., Drerup J., Grewing T. & Korn K. (2008). Clinical validation of a new triplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection and discrimination of Herpes simplex virus types 1 and 2. *J. Mol. Diagn.* **10**, 361–367.
- Sander, G., Konrad, A., Thurau, M., Wies, E., Leubert, R., Kremmer, E., Dinkel, H., Schulz, T., **Neipel, F.** & Sturzl, M. (2008). Intracellular localization map of human herpesvirus 8 proteins. *J. Virol.* **82**, 1908–1922.
- Sturzl, M., Konrad, A., Sander, G., Wies, E., **Neipel, F.**, Naschberger, E., Reipschlager, S., Gonin-Laurent, N., Horch, R. E., Kneser, U., Hohenberger, W., Erfle, H. & Thurau, M. (2008). High throughput screening of gene functions in mammalian cells using reversely transfected cell arrays: review and protocol. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **11**, 159–172.
- Wies, E., Mori, Y., Hahn, A., Kremmer, E., Sturzl, M., Fleckenstein, B. & **Neipel, F.** (2008). The viral interferon-regulatory factor-3 is required for the survival of KSHV-infected primary effusion lymphoma cells. *Blood* **111**, 320–327.
- Donhauser, N., Helm, M., Schuster, P., Ries, M., Korn, K., Vollmer, J., & **Schmidt, B.** for the German Competence Network HIV/AIDS. Differential effects of P-class versus other CpG oligodeoxynucleotide classes on the impaired innate immunity of plasmacytoid dendritic cells in HIV-1 infection. *AIDS Res. Human Retrovir.* (in press).
- Hahn, A., Birkmann, A., Wies, E., Dorer, D., Mahr, K., Sturzl, M., Titgemeyer, F. & **Neipel, F.** (2009). Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus gH/gL: Glycoprotein Export and Interaction with Cellular Receptors. *J. Virol.* **83**, 396–407.
- Konrad, A., Wies, E., Thurau, M., Marquardt, G., Naschberger, E., Hentschel, S., Jochmann, R., Schulz, T. F., Erfle, H., Brors, B., Lausen, B., **Neipel, F.**, & Sturzl, M. (2009). A systems biology approach to identify the combination effects of human herpesvirus 8 genes on NF-kappaB activation. *The Journal of Virology* **83**, 2563–2574.
- Thurau, M., Marquardt, G., Gonin-Laurent, N., Weinlander, K., Naschberger, E., Jochmann, R., Alkharshah, K. R., Schulz, T. F., Thome, M., **Neipel, F.** & Sturzl, M. (2009). Viral Inhibitor of Apoptosis vFLIP/K13 Protects Endothelial Cells against Superoxide-Induced Cell Death. *J. Virol.* **83**, 598–611.

- Schuster, P., Donhauser, N., Haupt, S., Kitan, N., Korn, K., & **Schmidt, B.** (2009) Coordinated regulation of plasmacytoid dendritic cell surface receptors upon stimulation with herpes simplex virus type 1. *Immunology* Sep 9 [Epub ahead of print].
- Wies, E., Hahn, A. S., Schmidt, K., Viebahn, C., Rohland, N., Lux, A., Schellhorn, T., Holzer, A., Jung, J. U., & **Neipel, F.** (2009). The Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus-encoded vIRF-3 Inhibits Cellular IRF-5. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 8525–8538.