

Abschlussbericht Teilprojekt 13.3

Projekttitlel: Bedeutung eines viralen/zellulären Ribonukleoproteinkomplexes bei der intrazellulären Replikation von Hepatitis C Virus

Projektleiter1: PD Dr. S.-E. Behrens
Fox Chase Cancer Center
7701 Burholme Avenue
Philadelphia, PA 19111
USA

Projektleiter2: Prof. Dr. W. Gerlich
Justus-Liebig-Universität
Institut für Virologie
Frankfurter Str .107
35392 Gießen

Telefon1: +1-(0) 2157285520

Telefon2: +49-(0) 641-9941200

Fax1: +1-(0) 2157282412

Fax2: +49-(0) 641-994 1209

E-Mail1: SE_Behrens@fcc.edu

E-Mail2: wolfram.h.gerlich@viro.med.uni-giessen.de

Berichtszeitraum: 01.02.2002 – 31.01.2005

Autoren:

Olaf Isken, Sven-Erik Behrens, Wolfram Gerlich

I. Aufgabenstellung und Zielsetzung.

Die Aufgabenstellung des Projektes war es, zelluläre Proteine zu identifizieren und in ihrer Funktion zu charakterisieren, die essentiell an der Replikation des Hepatitis C Virus (HCV) beteiligt sind. Diese Aufgabenstellung hatte zwei verwandte Ziele. (i) Erste wichtige Informationen zu erhalten zu nicht-viralen molekularen Determinanten des Lebenszyklus dieses wichtigen Humanpathogen. (ii) Neue potentielle Angriffspunkte (targets) für antivirale Wirkstoffe zu ermitteln.

Voraussetzungen unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde.

Das Projekt wurde von Herrn Dr. Isken in Kollaboration mit der Arbeitsgruppen von Herrn Prof. Dr. Gerlich (Justus-Liebig-Universität Giessen) und Herrn PD Dr. Sven-Erik Behrens (Justus-Liebig-Universität Giessen; Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, USA) durchgeführt. Kurz vor Beginn der Hep-Net Förderperiode war es Dr. Isken gelungen, eine Gruppe zellulärer Faktoren zu identifizieren, die spezifisch an die Genome von HCV und des mit HCV nahe verwandten Pestivirus BVDV assoziieren.

Planung und Ablauf des Vorhabens.

Zunächst sollten die Bindungsregionen der zellulären Faktoren auf den RNA Genomen beider Viren bestimmt werden. Weiterhin war geplant, die Funktion der zellulären Faktoren bei der Replikation von HCV und BVDV zu ermitteln. Die Mehrzahl dieser Ziele konnte im Verlaufe der 1. Hep-Net Förderperiode adressiert werden (siehe Sektion II). Aus den erhaltenen experimentellen Daten ergaben sich weitere, wichtige Fragestellungen, die in der 2. Förderperiode angegangen werden sollen (siehe Sektion II und Antrag für 2. Förderperiode vom 15.12.03).

Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde.

Durch Proteomik-Verfahren war die Identität der zellulären Faktoren, die an die viralen RNA Genome von HCV und BVDV assoziieren, bereits vor Beginn der Förderung durch das Hep-Net aufgeklärt worden. Es handelt sich um eine Gruppe von Proteinen, die entweder direkt mit dem Protein NF90/NFAR-1 verwandt sind,

oder an dieses Protein assoziieren. Es sind: NF90/NFAR-1, NF45, NF110/NFAR-2 und RNA Helikase A (RHA). Über die Funktion dieser Proteine in der Zelle ist bisher nur wenig bekannt. Einige der Faktoren (NF90/NFAR-1, NF110/NFAR-2 und RHA) enthalten sogenannte double-strand RNA binding motifs (dsRBM). dsRBM Proteine sind eine Familie von multifunktionellen Proteinen, für die bekannt ist, dass sie wichtige Aufgaben bei der post-transkriptionalen Regulation von Genexpression erfüllen. Dabei ‚shutteln‘ diese Proteine zwischen Kern, wo sie hauptsächlich lokalisiert sind, und Zytoplasma der Zelle. Zur dsRBM Familie gehören z.B. RNase III, das Drosophila Stauffen Protein, die miRNA und siRNA prozessierenden Enzyme DROSER und DICER, sowie die RNA aktivierte Proteinkinase PKR (1). Für NF90/NFAR-1 und NF110/NFAR-2 gibt es gute Hinweise, dass diese Proteine an der Stabilisierung bestimmter mRNAs wie der mRNA von Interleukin 2 (IL-2) und der mRNA von Urokinase Plasminogen Aktivator (UPA) beteiligt sind; IL-2 und UPA spielen wichtige Rollen bei der Auslösung der adaptiven Immunantwort und Entzündungsvorgängen (2, 3). Für RHA konnte gezeigt werden, dass das Protein als Ko-Faktor bei der Transkription bestimmter Gene agiert und als Transportfaktor von RNA-Molekülen aus dem Kern in das Zytoplasma fungiert (4). NF90/NFAR-1 und NF110/NFAR-2 scheinen ebenfalls Ko-Faktor-Funktionen bei Transkriptionvorgängen zu haben (5, 6, 7). Interessanterweise gibt es Indizien, dass einige der NF/NFAR Proteine auch von anderen Viren wie Adenovirus hepatitis B virus (HBV) und human immunodeficiency virus (HIV) rekrutiert werden (4, 8, 9), und für NF90/NFAR-1 und RHA wird angenommen, dass sie an antiviralen Prozessen in der Zelle beteiligt sind (10, 11, 12, 13, 14). So induziert die Überexpression von NF90/NFAR-1 wichtige Gene, die bei der Interferonantwort eine Rolle spielen (11). Darüberhinaus gibt es Evidenzen, dass NF90/NFAR-1 auch die Funktion von PKR beeinflusst (12, 13, 14); PKR spielt eine wichtige Rolle bei der antiviralen Antwort der Zelle bei einer Infektion (1). NF45, das mit NF90/NFAR-1 und RHA einen stabilen Komplex bildet (9) scheint die Aktivität von NF90/NFAR-1 zu modulieren (5, 6, 13). Schliesslich gibt es noch Hinweise darauf, dass NF90/NFAR-1 und NF110/NFAR-2 die Translation bestimmter mRNAs unterdrücken können (15).

Referenzen:

1) Saunders and Barber. 2003. The dsRNA binding protein family: critical roles,

diverse cellular functions.

FASEB J. 17: 961-83.

2) Shim et al. 2002. Nuclear Export of NF90 Is Required for Interleukin-2 mRNA Stabilization.

Mol Cell. 10: 1331-44.

3) Hoanh et al. 2004. Facilitation of mRNA deadenylation and decay by the exosome-bound DExH protein RHAU.

Mol Cell 13: 101-11.

4) Li et al. 1999. A role for RNA helicase A in post-transcriptional regulation of HIV type 1.

Proc Natl Acad Sci U S A. 96: 709-14.

5) Kao et al. 1994. Cloning and expression of cyclosporin A- and FK506-sensitive nuclear factor of activated T-cells: NF45 and NF90.

J Biol Chem. 269: 20691-9.

6) Reichman et al. 2002. The RNA binding protein nuclear factor 90 functions as both a positive and negative regulator of gene expression in mammalian cells.

Mol Cell Biol. 22: 343-56.

7) Reichmann and Mathews. 2003. RNA binding and intramolecular interactions modulate the regulation of gene expression by nuclear factor 110.

RNA 9: 543-554.

8) Shin et al. 2002. Host cell proteins binding to the encapsidation signal epsilon in hepatitis B virus RNA.

Arch Virol. 147: 471-91.

9) Liao et al. 1998. Activities of adenovirus virus-associated RNAs: purification and characterization of RNA binding proteins.

Proc Natl Acad Sci U S A. 95: 8514-9.

10) Satoh et al. 1999. Autoantibodies define a family of proteins with conserved double-stranded RNA-binding domains as well as DNA binding activity.

J Biol Chem. 274: 34598-604.

11) Krasnoselskaya-Riz et al. 2002. Nuclear factor 90 mediates activation of the cellular antiviral expression cascade.

AIDS Res Hum Retroviruses. 18: 591-604.

12) Fuchsova et al. Nuclear DNA helicase II is recruited to IFN-alpha-activated transcription sites at PML nuclear bodies.

J Cell Biol. 2002 Aug 5;158(3):463-73.

13) Parker et al. 2001. Nuclear factor 90 is a substrate and regulator of the eukaryotic initiation factor 2 kinase double-stranded RNA-activated protein kinase.

J Biol Chem. 276: 32522-30.

14) Langland et al. 1999. Nuclear factor-90 of activated T-cells: A double-stranded RNA-binding protein and substrate for the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR.

Biochemistry. 38: 6361-8.

15) Xu et al. 1999. Molecular cloning and characterization of a translational inhibitory protein that binds to coding sequences of human acid beta-glucosidase and other mRNAs.

Mol Genet Metab. 68: 441-54.

Zusammenarbeit mit anderen Stellen.

Neben Kollaborationen innerhalb des Kompetenznetzes Hepatitis war vor allem die Zusammenarbeit mit Dr. Peter Kao (Stanford, CA, USA) und Dr. Suisheng Zhang und Dr. Frank Grosse (IMB Jena) von großer Bedeutung für das Gelingen der experimentellen Projekte.

II. Darstellung der Ergebnisse.

Kartierung der NF/NFAR Proteinbindungsstellen auf den HCV und BVDV Genomen. Durch das kombinieren von UV cross-link Experimenten mit Mutagenesestudien konnten wir zeigen, dass die NF/NFAR Proteine exklusiv und mit hoher Spezifität an die nicht-translatierten Regionen (NTRs) der RNA Genome von HCV und von BVDV binden (1, 4). Die nicht-translatierten Regionen befinden sich bei beiden viralen Genomen jeweils am 5' und 3'-Ende, und für beide Regionen war von anderen Forschergruppen wie auch von uns gezeigt worden, dass sie wichtige Signale sowohl für die Translation, als auch für die Replikation der viralen RNAs enthalten. Die Proteinbindungsstellen in den 3'NTRs von HCV und BVDV konnten exakt bestimmt werden. Sie umfassen beim HCV wie auch beim BVDV Genom primäre RNA Sequenzelemente als auch RNA Struktur motive. Interessanterweise liegen sie in der HCV 3'NTR in einem Bereich, in der eine stark variable Region (3'V), die sich unmittelbar stromabwärts des translationalen stop-Kodons befindet, in eine sehr hoch konservierte Region (3'C) übergeht. Die 3'C Region enthält ausgeprägte RNA Struktur motive, für die gezeigt wurde, dass sie bei der Initiation der RNA Replikation, d.h. der Assemblierung des viralen Replikationskomplexes essentiell sind. Bei BVDV befinden sich die Proteinbindungsstellen ausschliesslich in der 3'V Region der 3'NTR (1, 2, 4). Mutagenesestudien, die mit autonom replizierenden HCV und BVDV RNA Replikons durchgeführt wurden, zeigten, dass die RNA/NFAR Proteinbindungsstellen absolut essentiell sind für die intrazelluläre Replikation der viralen RNAs. Bei ähnlichen Untersuchungen der HCV und BVDV 5'NTRs stellten wir fest, dass die Assoziation von NF/NFAR Proteinen die Ausbildung sehr komplexer RNA Struktur motive erfordert, die bisher noch nicht vollständig charakterisiert werden konnten (siehe Antrag für 2. Förderperiode vom 15.12.03). Bereits deutlich wurde aber, dass die NF/NFAR Bindungsstellen mit der sogenannten internal ribosomal entry site (IRES) in der HCV und BVDV 5'NTR überlappt (1, 4). Die IRES ist ein komplexes RNA Struktur motiv, das die Initiation der Translation mediiert und das bei beiden Viren sehr ähnlich aufgebaut ist (3). Dieses Ergebnis ist interessant, vor allem im Hinblick auf die vermutete Funktion der NF/NFAR Proteine bei der Regulation von Translation und Replikation der viralen RNA Genome (siehe 1.3. und Referenzen).

Die generelle Bedeutung der NF/NFAR Proteine für die Replikation von HCV und BVDV. Die Bedeutung der zellulären NF/NFAR Proteine für die virale Replikation konnte durch eine Reihe komplementärer experimenteller Ansätze verdeutlicht werden. Wie bereits erwähnt, zeigten Mutagenesestudien der Proteinbindungsstellen in der HCV und BVDV 3'NTR, dass die Formierung des viralen/zellulären Ribonukleoproteinkomplexes essentiell ist für die Katalyse der viralen Replikation. Dieser Eindruck konnte durch RNAi Experimente deutlich gestärkt werden: durch RNAi Experimente wurde der Gehalt an mRNA von RHA in der Zelle stark verringert. Der daraus resultierende ‚knock-down‘ des Gehaltes von RHA Protein führte zu einer deutlichen Inhibition der RNA Replikation von HCV und von BVDV ohne dass die Zelle merklich geschädigt wurde (1, 4). Durch Immunfluoreszenz-Experimente konnte gezeigt werden, dass der gesamte Satz von NF/NFAR Proteine (siehe I/4) mit viralen Proteinen in den Replikationskomplexen von HCV und BVDV im Zytoplasma der Zelle ko-lokalisiert. Diese Experimente zeigten auch, dass eine Ko-Lokalisation nur dann erfolgt, wenn die virale RNA aktiv in der Zelle repliziert. Interessanterweise akkumuliert unter diesen Bedingungen ein erheblicher Anteil der NF/NFAR Proteine im Zytoplasma. Berücksichtigt man, dass die NF/NFAR Proteine unter normalen (nicht infektiösen) Bedingungen überwiegend im Nukleus anzutreffen sind, konnte damit eine erhebliche Veränderung in der Zelle unter den Bedingungen der Infektion indiziert werden. Die Beteiligung der NF/NFAR Proteine an der Replikation der viralen RNAs wurde weiter unterstrichen durch den Befund, dass NF90/NFAR-1 unter in vivo Bedingungen auch mit einem viralen Protein, dem HCV NS5A Protein, interagiert. Schliesslich konnten wir zeigen, dass die NF/NFAR Proteine auch in vivo mit den viralen RNAs interagieren (4). Fasst man diese Ergebnisse zusammen, werden vor allem zwei Aspekte deutlich. (i) Die NF/NFAR Proteine spielen eine aktive Rolle im Replikationsprozess von HCV und dem verwandten BVDV. (ii) Die Rekrutierung der zellulären Faktoren durch die replizierende virale RNA ist eine messbare Grösse in der Zelle als Folge einer Infektion.

Die spezielle Bedeutung der NF/NFAR Proteine bei der Regulation von Translation und Replikation des HCV und BVDV Genoms. Neben den oben aufgeführten Studien wurden im Verlauf der Förderungsperiode eine Reihe weiterer Experimente durchgeführt, die das Ziel hatten, die exakte Funktion der NF/NFAR Proteine während des Replikationsprozesses von HCV und BVDV aufzuklären. Diese

Experimente umfassten detaillierte Mutagenesen der RNA/Proteinbindungsstellen und biochemische Assays die mit RNA Replikons durchgeführt wurden und die das Ziel hatten, die Konsequenzen eingeführter Mutationen für Translation und Replikation der viralen RNAs festzustellen. Im Verlauf dieser Studien konnten wiederum interessante Ergebnisse erhalten werden. So konnte gezeigt werden, dass bei beiden Virussystemen die Bindung der NF/NFAR Proteine im Bereich der variablen 3'V Region der 3'NTR für die effiziente Termination der Translation am Translations-stop Kodon von grosser Bedeutung ist. Eine effiziente Termination der Translation ist wiederum essentiell für die Initiation der Replikation, d.h. die reibungslose Assemblierung des Replikationskomplexes an der 3'C Region der 3'NTR (2, 4). Durch diese Resultate wurde eine direkte Beteiligung der NF/NFAR Proteine an der Regulation von Translation und Replikation gezeigt. Dieser Eindruck wurde weiter unterstützt durch RNA-Protein Ko-Präzipitationsexperimente. Diese Experimente zeigten, dass ein Proteinkomplex bestehend aus NF90/NFAR-1, NF45 und RHA die Interaktion zwischen 5' und 3'NTR – und damit die Interaktion zwischen 5' und 3' Ende des viralen (HCV oder BVDV) Genoms - signifikant verstärkt (1, 2, 4). Fasst man die Ergebnisse dieser Studien zusammen, so scheinen die NF/NFAR demnach zumindest zwei Funktionen zu haben, die für die Replikation der viralen RNA wichtig sind. (i) Die Ausbildung eines Ribonukleoproteinkomplexes mit der 3'V Region der 3'NTR, der vor allem für die effiziente Termination der Translation und damit wiederum für die Initiation der Replikation essentiell ist. (ii) Die Ausbildung einer zirkulären Struktur des viralen Genoms, die ebenfalls wichtig sein könnte für die Regulation von Translation und Replikation. Wir vermuten, dass die IRES-medierte Translation, die vom 5' zum 3'-Ende der viralen RNA verläuft, in einem bestimmten Stadium der Assemblierung des Replikationskomplexes die vor allem das 3'-Ende involviert, gestoppt wird zugunsten des RNA Replikationszyklus, der dann von 3' nach 5' abläuft. Die NF/NFAR Proteine könnten auch dabei eine wichtige Rolle spielen – etwa in dem sie durch die Bindung an die IRES, wie wir sie beobachten konnten (siehe 1.2), die Translation unterbinden.

Darstellung des voraussichtlichen Nutzens der Ergebnisse.

Die in der ersten Hep-Net Förderperiode erzielten Ergebnisse hatten folgenden Nutzen.

Erstmals konnte eine direkte Beteiligung von sogenannten ‚zellulären Wirtsfaktoren‘

an der Replikation von HCV und BVDV demonstriert und analysiert werden (dokumentiert durch 4 Publikationen).

Die charakterisierten Bindungsstellen der NF/NFAR Proteine auf den viralen RNAs sind potentielle targets für antivirale Wirkstoffe und werden als solche zur Zeit weiter evaluiert.

Die beobachteten Veränderungen bei der Kompartimentierung der NF/NFAR Proteine im Zuge einer Virusinfektion sind wichtige Indikationen für weitere Studien, die darauf gerichtet sind zu verstehen, auf welche Weise diese Viren antivirale Massnahmen der Zelle unterlaufen.

Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordener Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen.

Keine.

Erfolgte und geplante Veröffentlichungen.

Peer reviewed articles

1) Isken, O., Grassmann, C.W., Sarisky, R.T., Kann, M., Zhang, S., Grosse, F., Kao, P.N., and Behrens, S.-E. (2003). Members of the NF90/NFAR protein group are involved in the life cycle of a positive-strand RNA virus.

EMBO J. 22: 5655-5665.

2) Isken, O., Grassmann, C.W., Yu, H., and Behrens, S.-E. (2004). Complex signals in the genomic 3' non-translated region of bovine viral diarrhea virus coordinate translation and replication of the viral RNA.

RNA 10: 1637-52.

3) Grassmann, C.W., Yu, H., Isken, O., and Behrens, S.-E. Hepatitis C virus and the related bovine viral Diarrhea virus considerably differ in the functional organization of the 5' non-translated region: implications for the viral life cycle.

In revision.

4) Isken, O., Grassmann, C.W., Baroth, M., and Behrens, S.-E. Hepatitis C virus recruits nuclear factors of the NF/NFAR protein group for replication.

In revision.

Presentations on international symposia

Isken, O., Grassmann, C.W., Yu, H., and Behrens, S.-E. (2002).

Oral presentation

Evidence for a protein-mediated 5'-3' interaction of the BVDV RNA genome.

9th international meeting on HCV and related viruses. San Diego, USA. Abstract supplement.

Isken, O., and Behrens, S.-E. (2002).

Oral presentation

Indications that the variable region of the BVDV and HCV genome is important for efficient translation termination. 9th international meeting on HCV and related viruses. San Diego, USA. Abstract supplement.

Isken, O., and Behrens, S.-E. (2003).

Oral presentation

Characterization of a group of cellular proteins involved in the life cycle of BVDV and HCV. 22nd meeting of the American Society of Virology (ASV). Davis, USA. Abstract supplement.

Isken, O., Grassmann, C.W., and Behrens, S.-E. (2003)

Oral presentation

Members of the NF90/NFAR group of proteins are involved in the life cycle of BVDV and HCV. 10th International meeting on HCV and related viruses, Kyoto, Japan, December 1-6. Abstract supplement.

Isken O., and Behrens, S.-E. (2004)

Members of the NF90/NFAR protein group are involved in the life cycle of BVDV and HCV. 7th International symposium on positive strand RNA viruses, San Francisco, USA, May 27 – June 1. Abstract supplement.

Isken, O., Grassmann, C.W., Baroth, M., and Behrens, S.-E. (2004)

Oral presentation

Nuclear factors are functional components of the hepatitis C virus replication complex. 11th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Heidelberg, Germany, October 3-7. Abstract supplement.