

Abschlussbericht Teilprojekt 16.3

Projekttitle: Bindung von klinisch charakterisierten HCV-Pseudopartikel an periphere Blutlymphozyten als Modell für die Studie der Lymphomagenese bei der chronischen Hepatitis C Virus Infektion: Analyse von B-Zellaktivierung und immune surveillance

Projektleiter: Dr. med. Wolf Peter Hofmann
Klinikum der J.W. Goethe-Universität
Theodor-Stern-Kai 7
60590 Frankfurt am Main

Telefon: + 49 (0) 69 / 6301-5547

Fax: + 49(0) 69 /

E-Mail: hofmann@med.uni-frankfurt.de,
jacob.nattermann@ukb.uni-bonn.de

Berichtszeitraum: 01.02.2005 – 31.01.2007

I Kurze Darstellung

1. Aufgabenstellung

Ziel des beantragten Projektes ist die Untersuchung der Mechanismen der Lymphomagenese bei der chronischen Hepatitis C. Hierbei sollen insbesondere zwei Punkte bearbeitet werden:

- Störung der Funktion immunkompetenter Zellen (dendritische Zellen, NK Zellen und CD8+ T-Zellen) durch HCV
- HCV-induzierte Aktivierung und Proliferation von B-Lymphozyten, wobei klinisch charakterisierte HCV-Pseudopartikel (HCVpp) als neues Modell-System verwendet werden sollen.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Das Projekt wurde an den zwei Standorten Homburg Saar und Bonn durchgeführt. Die Forschungslabore der jeweiligen Einrichtungen verfügen über langjährige Expertise in immunologischen und molekularbiologischen Fragestellungen im Rahmen der Hepatitis C Virusinfektion. In den Forschungslaboren sind medizinische und biologische Doktoranden und technische Assistenten mit der Durchführung der Aufgabenstellung betraut. Die Labore verfügen über eine Ausstattung, die eine Bearbeitung immunologischer, zellbiologischer und molekularbiologischer Fragestellungen erlaubt.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Im geförderten Zeitraum gelang der Homburger Gruppe die Generierung von klinisch charakterisierten HCVpp. Für die Pseudopartikel konnte die Infektiosität für HuH7 Zellen gezeigt werden, womit nachgewiesen werden konnte, dass die generierten HCVpp für die geplanten Arbeiten geeignet sind. Zudem konnte demonstriert werden, dass die Infektiosität der HCVpp durch CD81-spezifische und neutralisierende Ak moduliert werden kann, die Bindung der HCVpp also tatsächlich über eine HCV E2/CD81 Interaktion vermittelt wird.

In einem nächsten Schritt wurden die **Produktionsbedingungen und die Infektionsbedingungen** der einzelnen HCVpp optimiert:

- Produktionsbedingungen: Nach Transfektion mit dem jeweiligen retroviralen Vektoren wurden die 293T-Zellen in DMEM mit unterschiedlichen Konzentrationen von fetal calf serum (FCS), bzw. mit humanem Serum (HS) kultiviert.
- Infektionsbedingungen: die HCVpp wurden entweder unmodifiziert oder konzentriert (Zentrifugation mit einem 20%igen Sucrosekissen bis zu 100-fach) den HuH7-Zellen zur Infektion zugesetzt

Anschliessend wurde der **zelluläre Tropismus** der HCVpp für humane mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) untersucht. Hierbei wurden frische PBMC von gesunden Probanden in Anwesenheit der verschiedenen HCVpp kultiviert.

Ferner wurde eine mögliche **selektive B-Zell-Aktivierung** durch HCVpp und auch löslichen HCV-E2-Protein untersucht. Dafür wurde nach 24-stündiger Inkubation von frischen PBMC die B-Zell-spezifischen Aktivierungsmarker CD69, CD71 und CD86 mittels FACS-analyse auf CD19-positiven Zellen gemessen. Als Kontrolle wurde eine Staphylokokkus aureus cowan Zellsuspension (SAC) hinzugegeben, welche zu einer durchschnittlich 42%-igen Hochregulation der drei Aktivierungsmarker führt. Weiterhin dienten eine Kombination von monoklonaler CD81-Antikörper MG81 und N81 als Kontrollen.

Zuletzt wurde die **IgM-Antikörperproduktion** der B-Zellen nach Stimulierung mit HCVpp, löslichem HCV-E2 und auch mit nativen Viren von den jeweiligen Individuen mit chronischer Hepatitis C gemessen.

In einem weiteren Projekt wurde die **Bedeutung des BCL-6-Gens** bei der HCV-assoziierten Lymphoproliferation untersucht. Die abberante somatische Hypermutation und Deregulation des BCL-6-Gens wird generell in Zusammenhang mit einer B-Zell-Lymphomagenese

gebracht. Im Vorfeld wurde eine mutagene Wirkung des HCV auf Onkogene wie z.B. BCL-6 beschrieben (Machida et al. PNAS 2004;101:4262-7). Nach DNA-Extraktion aus PBMC von HCV-Patienten mit Kryoglobulinen und B-NHL wurden hier die nichtkodierenden Regionen aus dem BCL-6 Gen (Area B) durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit spezifischen Primern amplifiziert. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde in einen geeigneten Vektor kloniert und anschliessend in kompetente *E.coli* Stämme transformiert. Danach wurden 10 individuelle Klone der jeweiligen Probe sequenziert. Zusätzlich wurde die BCL-6 mRNA mittels Real-time PCR bestimmt.

Die Bonner Gruppe beschäftigt sich vornehmlich mit der Beeinflussung immunkompetenter Zellen, wobei hierfür in den bisherigen Versuchen primär rekombinantes HCV-E2 Protein als Modell-System verwendet wurde. Besonderes Interesse galt hierbei den dendritischen Zellen (DC) sowie den natürlichen Killer (NK)-Zellen, da diese sowohl für die angeborene als auch für die adaptive Immunantwort von grundlegender Bedeutung sind. Ein bisher nicht untersuchter Aspekt der Hepatitis C war die Beeinflussung der Migration dieser Zellpopulationen. In den im Rahmen des geförderten Projektes durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die HCV E2/CD81 Interaktion zu einer deutlichen Hemmung der Wanderung von DC in Richtung des lymphatischen Chemokins CCL21 führt (Nattermann et al., Hepatology 2006). Dies könnte im Rahmen der HCV-Infektion zu einer gestörten Rekrutierung dendritischer Zellen in das lymphatische Gewebe und somit zu einem insuffizienten Priming von T-Zellen bei der chronischen Hepatitis spielen. Dies wäre möglicherweise auch im Rahmen der Lymphomagenese relevant.

Ein gänzlich anderes Bild zeigte sich hinsichtlich der NK Zellen, da die CD81/HCV E2 Interaktion hier zu einer verstärkten Migration und Transmigration, bedingt durch eine veränderte intrazelluläre Signaltransduktion und Induktion einer Polarisierung der Zelle, führte. Eine solche verstärkte Rekrutierung zytotoxisch-aktiver Zellen in die Leber könnte möglicherweise im Rahmen der HCV-assoziierten Leberzellschädigung von Bedeutung sein. Momentan werden diese Experimente mit den in Homburg generierten HCVpp wiederholt.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand

Die durchgeführten Untersuchungen wurden mit modernsten und auch von anderen Gruppen etablierten „state-of-the-art“ Techniken durchgeführt. Das HCVpp-Modell und auch die Arbeit mit dem löslichen E2-Protein erfolgten in enger Zusammenarbeit mit anderen Gruppen, die bereits auf diesem Gebiet veröffentlicht haben. Zudem wurde in Bonn eine neue LaserScan-Mikroskopie-Einheit eingerichtet, um entsprechende Untersuchungen auf dem aktuellen Stand der Technik durchführen zu können.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Neben der Zusammenarbeit der zwei Gruppen aus Homburg Saar und Bonn wurden die Untersuchungen in Kooperation mit dem Labor von Prof. F. Cosset, Lyon, Frankreich, insbesondere in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Birke Bartosch durchgeführt und diskutiert. Weiterhin konnten Antikörper und andere Reagenzien ausgetauscht werden und beispielsweise von namhaften Gruppen (Dr. Domenico Rosa, Chiron, Italien; Dr. Michael Houghton, Chiron, USA) bezogen werden.

II Eingehende Darstellung

1. des erzielten Ergebnisses

Optimierung der Produktions- und Infektionsbedingungen der HCVpp:

Es zeigte sich, dass die HCVpp unterschiedlicher HCV-Genotypen verschiedene Infektionstiter von ca. 5% - 30% aufweisen. Somit liegen hier sequenz-spezifische Unterschiede vor. Die Pseudopartikel mit dem HCV-Genotyp 3 erscheinen weniger infektiös als Pseudopartikel der HCV-Genotypen 1 und 2. Durch Modulation der Produktions- und Infektionsbedingungen liessen sich höhere Infektionstiter erzielen. Als bedeutender Faktor konnten gezeigt werden, dass die Zugabe von HS zum Kulturmedium eine Steigerung der Infektiosität von ca. 4% bewirken kann (insbesondere bei HCV Genotyp 1b). Weiterhin kann

die Verwendung von konzentrierten Pseudopartikeln die Infektiosität um durchschnittlich 5% steigern. Zusammenfassen konnten für HCVpp des HCV-Genotyp 2 nach Optimierung Infektionstiter von > 40% erreicht werden.

Untersuchung des zellulären Tropismus von HCV

Der Zelltropismus von HCVpp wurde bereits an verschiedenen Zelllinien untersucht. Neben Leberkarzinomzellen wie HuH7, Hep3B, HepG2CD81 haben sich keine weiteren Zelllinien, bzw. frische PBMC von gesunden Probanden als permissiv für HCVpp erwiesen.

Aktivitätsmessung von B-Zellen durch HCVpp und löslichem E2-Protein

Es konnte keine gesteigerte Expression von B-Zell-spezifischen Aktivierungsmarkern CD69, CD71 und CD86 nach Inkubation mit HCVpp oder löslichem E2-Protein beobachtet werden. Zusammenfassend wirkt nur die Gabe von SAC, bzw. die Kombination von den monoklonalen CD81-Antikörpern MG81 und N81 stimulierend auf die B-Zellen.

IgM-Antikörperproduktion nach Stimulierung durch HCVpp, löslichem E2-Protein und nativen Viren

Es konnte eine gesteigerte IgM-Antikörperproduktion nach Stimulierung mit nativen Viren gezeigt werden, die die Stimulierung durch SAC übertraf. Es fand sich kein Unterschied zwischen nativen Viren von Individuen mit oder ohne HCV-assoziiertes Lymphoproliferation.

Somatische Hypermutation des BCL-6-Gens bei der HCV-assoziierten Lymphoproliferation

Die Mutationsfrequenz und die genetische Komplexität des BCL-6-Gens war generell niedriger bei HCV-Patienten mit Kryoglobulinämie, bzw. B-NHL im Vergleich zu gesunden Probanden. Die BCL-6 mRNA Konzentration war niedriger bei allen HCV-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden, Individuen mit chronischer Hepatitis B und Langzeit-Ansprecher auf eine antivirale HCV-Therapie. Die Daten weisen darauf hin, dass eine zuvor *in vitro* beobachtete gesteigerte somatische Hypermutation des BCL-6-Gens durch HCV bei den Patienten nicht zu beobachten ist.

Einfluss auf die Immune Surveillance

Anhand des HCV E2-Modells konnte nachgewiesen werden, dass das Hepatitis C Virus durch Interaktion mit CD81 zu einer Dysregulation der Wanderung immunkompetenter Zellen führt. Dies könnte insbesondere in Hinblick auf die Störung der Wanderung von DC und die damit möglicherweise einhergehende Hemmung der Induktion einer adaptiven Immunantwort von Bedeutung für die Lymphomgenese sein.

2. des voraussichtlichen Nutzens insbesondere der Verwertbarkeit

Die Etablierung des HCVpp-Modells und Optimierung der Produktions- und Infektionsbedingungen als eines der zur Verfügung stehenden *in vitro* Modelle in der HCV-Forschung stellt eine grosse Bereicherung für die zukünftigen Projekte der beiden Projektleiter dar. Als methodologisches Werkzeug wird von Herrn Dr. W.P. Hofmann das HCVpp-Modell eine wesentliche Rolle bei der Bearbeitung eines kürzlich positiv bewerteten Teilprojektantrages „*Charakterisierung des additiven antiviralen Effekt von Ribavirin in Kombination mit Interferon-Alfa und neuen Inhibitoren der HCV-NS3/4A-Protease und NS5B-Polymerase*“ im Rahmen der DFG-geförderten KFO 129 („*Mechanismen der Resistenzentwicklung und Optimierung antiviraler Strategien bei Hepatitis C Virusinfektion unter Einbeziehung integrativer Modelle der Biomathematik und Bioinformatik*“; Sprecher: Prof. Dr. S. Zeuzem, Frankfurt) spielen. Somit konnten Arbeiten des BMBF-geförderten *Hep Net Start up Fund* wesentlich zu einer erfolgreichen Antragstellung bei der DFG führen. In gleicher Weise stellt die durch das Projekt erlangte Erfahrung in immunologischen und molekularbiologischen Fragestellungen eine Basis für die Arbeit des kürzlich im Rahmen des BMBF-Gesundheitsforschungsprogramms „*Forschung für den Menschen*“ der Bundesregierung mit dem Titel „*Forschungsnetze zu Empfänglichkeit und Resistenz gegenüber Infektionen*“ positiv bewerteten Projektantrages, der unter dem Titel „*Host and*

viral determinants for susceptibility and resistance to hepatitis C virus infection“ eingereicht wurde. Herr Dr. J. Nattermann ist an das Teilprojekt von Herrn Prof. U. Spengler, Bonn assoziiert, und Herr Dr. W.P. Hofmann hat als wissenschaftlicher Sekretär die Koordination des Verbundprojektes unter der Leitung von Herrn Prof. S. Zeuzem, Frankfurt, übernommen.

3. der erfolgten und geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses

Bislang konnten jeweils eine Originalarbeit aus Bonn und Homburg Saar in internationalen „peer reviewed“ Journalen („Hepatology“ und „Journal of Viral Hepatitis“) veröffentlicht werden. Eine Originalarbeit zur Generierung der verschiedenen HCVpp sowie Optimierung der Produktions- und Infektionsbedingungen ist in Präparation. Bezüglich der Nachwuchsförderung und auch Frauenförderung konnten zwei biologische Doktorandinnen Inhalte und methodologische Ansätze des Projekts für die jeweilige Diplomarbeit verwerten (Frau Dr. Bihetz Fernandez, Homburg Saar (abgeschlossen); und Frau Anette Wohnsland, Homburg Saar (in Vorbereitung))

III Erfolgskontrollbericht (siehe Anlage)

IV Berichtsblatt (siehe Anlage in deutscher und englischer Sprache)