

Abschlussbericht Teilprojekt 16.5

Projekttitlel: Zelluläre Mechanismen der Interaktion des GB Virus-C und HIV:
Erklärung für die verlangsamte Progression der HIV-Erkrankung?

Projektleiter: Dr. Dr. rer. nat. H. Reil
Universität Erlangen-Nürnberg
Institut für klinische und molekulare Virologie
Schlossgarten 4
91054 Erlangen

Telefon: + 49 (0) 9131 / 852-4013

Fax: + 49(0) 9131 / 852-6485

E-Mail: heide.reil@viro.med.uni-erlangen.de

Berichtszeitraum: 01.02.2005 – 31.01.2007

1. Aufgabenstellung:

Ziel des geförderten Projektes war die Aufklärung der zellulären Mechanismen, die der Interaktion von GBV-C und HIV zu Grunde liegen. Dabei sollte ein Screening von Blutspendern und HIV-Patienten durchgeführt werden, um Zugang zu verschiedenen GBV-C Primärisolaten zu bekommen. Des weiteren sollten diese Isolate in bezug auf ihre Eigenschaft HIV zu hemmen charakterisiert werden. Abschließend sollte mit Hilfe von Deletionsmutanten und Einsatz von rekombinanten Proteinen die anti-retroviralen Komponenten von GBV-C eingegrenzt werden.

2. Voraussetzung und Planung

In Zusammenarbeit mit Prof. Hans Tillmann von der Universität Leipzig wurde vornehmlich das Screening von Blutspendern durchgeführt. Dieses konnte insbesondere in Kooperation mit dem Blutspendedienst Leipzig realisiert werden. Die Eingrenzung der anti-retroviralen Komponenten von GBV-C wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Bernhard Fleckenstein durch Einsatz des Herpesvirus saimiri basierenden Vektorsystems durchgeführt. Zur Durchführung der molekularen Klonierungsarbeiten wurde dem Projekt ein infektiöser Vollängenklon sowie einige GBV-C spezifische Antikörper von Prof. Jack Stapleton der Universität Iowa in Iowa, USA zur Verfügung gestellt. Es war geplant, dass sich die Gruppe um Prof. Tillmann zunächst um die Etablierung der GBV-C Isolat-Bank kümmerte, während unsere Arbeitsgruppe mit den Klonierungsarbeiten zur Eingrenzung der anti-retroviralen Komponenten beginnen sollte. Weiterhin sollten HIV-Reporterviren hergestellt werden, um die Möglichkeiten der Koinfektionen mit HIV und GBV-C zu erweitern.

3. Stand der Forschung

Noch nach über 10 Jahren seit der Entdeckung von GBV-C wird die pathogenetische Bedeutung dieses Virus kontrovers diskutiert. Heute geht man davon aus, dass es sich bei GBV-C um ein apathogenes Virus handelt. Das positiv orientierte RNA-Genom von GBV-C umfasst ungefähr 9400 bp. Ein langer offener Leserahmen kodiert für ein Polyprotein aus etwa 3000 Aminosäuren. Die kodierenden Bereiche unterteilen sich in die strukturellen Gene für die Hüllproteine E1 und E2 und in die nicht-strukturellen Gene NS2-NS5. Die Seroprävalenz ist in der Bundesrepublik Deutschland mit 15-25% sehr hoch, ungefähr 1-2% der Bevölkerung weist eine GBV-C Virämie auf (Feucht et al., 1997). Ähnlich wie für HIV sind für GBV-C sexuelle, parenterale und vertikale Transmissionswege beschrieben. Übertragungswege ist der Anteil an GBV-C virämischen HIV-positiven Patienten mit 20-50% ziemlich hoch.

In den vergangenen Jahren rückte das Flavivirus stärker in das Licht des wissenschaftlichen Interesses, als mehrere Studien sowohl eine verlangsamte Progredienz zu AIDS als auch einen signifikanten Überlebensvorteil bei GBV-C infizierten HIV-Patienten beobachten konnten. (Tillmann et al., 2001; Xiang et al., 2001; Devereux et al., 1998; Lefrere et al., 1999; Nunnari et al., 2003). Jedoch vermochten nicht alle Studien diese Beobachtungen zu bestätigen (Brumme et al., 2002; Birk et al., 2002; Quiros-Roldan et al., 2002; Bjorkman et al., 2004). Eine neuere Arbeit, die genauer die Infektionszeiträume von HIV und GBV-C in die Studie mit einfließen lies, könnte jedoch die diskrepanten Ergebnisse erklären. Die Autoren konnten zeigen, dass der protektive Effekt von GBV-C für HIV-Patienten nur dann nachgewiesen werden konnte, wenn die Persistenz von HIV und GBV-C mindestens 5 Jahre betrug. Die vorzeitige Eliminierung von GBV-C führt zum Verlust des klinischen Vorteils und in einigen Fällen sogar zur Verschlechterung der Prognose (Williams et al., 2004). Zusammengenommen demonstrieren die epidemiologischen Studien zweifelslos einen Zusammenhang zwischen einer GBV-C Infektion und einer verbesserten Überlebensrate von HIV-Patienten. Trotzdem lassen diese Studien per se nicht den sicheren Schluss zu, dass GBV-C der Grund für die verbesserte Prognose ist. Vielmehr könnte es sich bei GBV-C um einen Marker handeln, der aufgrund eines bestimmten Wirtstropismus andere Faktoren anzeigt, die für die Entwicklung der Immunschwäche von HIV-Infizierten hinderlich sind.

Studien von uns und anderen Hinweise weisen aber darauf hin, dass GBV-C einen direkten Einfluss auf die Replikation von HIV *in vitro* nimmt, durch die Induktion von löslichen anti-retrovirale Faktoren (Jung et al. 2005, Xiang et al. 2004). Die weitere Aufklärung des zugrundeliegenden Mechanismus der GBV-C vermittelten Resistenz war demzufolge Gegenstand des beantragten Projektes.

4. Literatur:

Birk,M., Lindback,S., and Lidman,C. (2002). No influence of GB virus C replication on the prognosis in a cohort of HIV-1-infected patients. *AIDS* 16, 2482-2485.

Bjorkman,P., Flamholz,L., Naucier,A., Molnegren,V., Wallmark,E., and Widell,A. (2004). GB virus C during the natural course of HIV-1 infection: viremia at diagnosis does not predict mortality. *AIDS* 18, 877-886.

Brumme,Z.L., Chan,K.J., Dong,W.W., Mo,T., Wynhoven,B., Hogg,R.S., Montaner,J.S., O'Shaughnessy,M.V., and Harrigan,P.R. (2002). No association between GB virus-C viremia and virological or immunological failure after starting initial antiretroviral therapy. *AIDS* 16, 1929-1933.

Devereux,H., Sabin,C.A., Kinson,Z., Brown,D., Griffioen,A., Dusheiko,G.M., and Lee,C.A. (1998). Influence of HIV-1 infection on GBV-C infection in multiply infected haemophilic patients. *J. Med. Virol.* 56, 316-320.

Feucht,H.H., Fischer,L., Sterneck,M., Broelsch,C.E., and Laufs,R. (1997). GB virus C transmission by blood products. *Lancet* 349, 435.

Gutierrez,R.A., Dawson,G.J., Knigge,M.F., Melvin,S.L., Heynen,C.A., Kyrk,C.R., Young,C.E., Carrick,R.J., Schlauder,G.G., Surowy,T.K., Dille,B.J., Coleman,P.F., Thiele,D.L., Lentino,J.R., Pachucki,C., and Mushahwar,I.K. (1997). Seroprevalence of GB virus C and persistence of RNA and antibody. *J. Med. Virol.* 53, 167-173.

Jung S., Knauer O., Donhauser N., Eichenmüller M., Helm M., Fleckenstein B. and Reil H. (2005). Inhibition of HIV strains by GB Virus C in cell culture can be mediated by CD4+ and CD8+ T-lymphocyte derived soluble factors. *AIDS* 19: 1267-72

Lefrere,J.J., Roudot-Thoraval,F., Morand-Joubert,L., Petit,J.C., Lerable,J., Thauvin,M., and Mariotti,M. (1999). Carriage of GB virus C/hepatitis G virus RNA is associated with a slower immunologic, virologic, and clinical progression of human immunodeficiency virus disease in coinfecting persons. *J. Infect. Dis.* 179, 783-789.

Quiros-Roldan,E., Maroto,M.C., Torti,C., Moretti,F., Casari,S., Pan,A., and Carosi,G. (2002). No evidence of beneficial effect of GB virus type C infection on the course of HIV infection. *AIDS* 16, 1430-1431.

Tillmann,H.L., Heiken,H., Knapik-Botor,A., Heringlake,S., Ockenga,J., Wilber,J.C., Goergen,B., Detmer,J., McMorro,M., Stoll,M., Schmidt,R.E., and Manns,M.P. (2001). Infection with GB virus C and reduced mortality among HIV-infected patients. *N. Engl. J. Med.* 345, 715-724.

Williams,C.F., Klinzman,D., Yamashita,T.E., Xiang,J., Polgreen,P.M., Rinaldo,C., Liu,C., Phair,J., Margolick,J.B., Zdunek,D., Hess,G., and Stapleton,J.T. (2004). Persistent GB virus C infection and survival in HIV-infected men. *N. Engl. J. Med.* 350, 981-990.

Xiang,J., Wunschmann,S., Diekema,D.J., Klinzman,D., Patrick,K.D., George,S.L., and Stapleton,J.T. (2001). Effect of coinfection with GB virus C on survival among patients with HIV infection. *N. Engl. J. Med.* 345, 707-714.

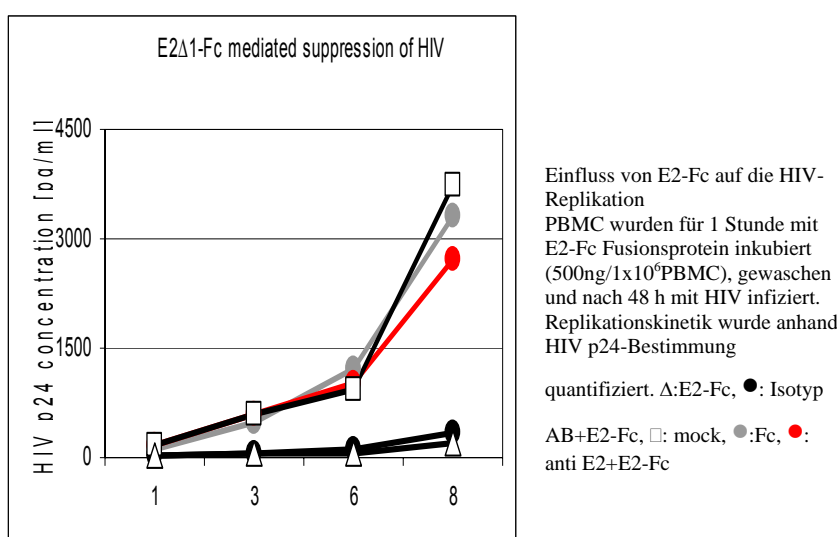
5. Ergebnisse

Insgesamt wurde die Testung auf GBV-C RNA im Serum von 1000 Blutspendern und 100 HIV-Patienten durchgeführt. Diese Testung wurde in erster Linie vom Leipziger Kooperationspartner von der Arbeitsgruppe um Prof. Tillmann durchgeführt. Zur Bestätigung wurden die Pooltestungen ebenfalls in Erlangen verrichtet. Dabei zeigte sich eine GBV-C RNA-Prävalenz der Leipziger Blutspender von 3%. Die Testung der HIV-Patienten hingegen, die im wesentlichen in Erlangen durchgeführt wurde, ergab in dieser speziellen Kohorte erwartungsgemäß eine deutlich höhere GBV-C RNA-Prävalenz von 46%. Aufgrund von logistischen Problemen, konnte aber nur auf vier Blutspender zurückgegriffen werden, um wiederholende und umfangreichere Serumspenden zu erhalten.

Im folgenden konnte dargestellt werden, dass verschiedene GBV-C Isolate in bezug auf die Eigenschaft mit der Replikation von HIV zu interferieren, unterschiedliche Phänotypen zeigen. Somit konnten GBV-C Wildtyp Isolate in HIV-Hemmer und Nicht-Hemmer eingeordnet werden. Diese neue Erkenntnis ermöglicht nun die Unterschiede zwischen HIV-Hemmer und Nicht-Hemmer zu erarbeiten und z.B. Chimäre zwischen Hemmern und Nicht-Hemmern herzustellen, um die verantwortlichen Domänen des GBV-C zu isolieren.

Da von Stapleton und Mitarbeitern gezeigt wurde, dass mit einer Proteinsequenz aus der NS5 Region eine HIV-Hemmung erzielt werden kann, lag es nahe, Sequenzunterschiede in diesem Bereich zu erwarten (Chang et al, J Gen Virol, 88, 2007, 3341-6). Ausführliche Sequenzierungen der verschiedenen GBV-C Primärisolate im NS5A-kodierenden Bereich lieferte jedoch diesbezüglich keine eindeutige Kausalität

Weiterführende Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass nicht nur die GBV-C Infektion, sondern auch die Expression von GBV-C kodierender plus-Strang RNA die HIV-Replikation signifikant unterdrücken kann. Durch Expression von Deletionsmutanten konnte der für die HIV-Inhibition verantwortliche Bereich auf den N-terminalen Bereich des GBV-C Genoms eingegrenzt werden, der im wesentlichen für die strukturellen Glykoproteine E1 und E2 kodiert. Im weiteren Verlauf konnten wir den HIV-inhibitorischen Effekt auf das E2 Glykoprotein eingrenzen. So reicht in Zellkultur (PBMC, CEMX174) die Inkubation mit rekombinanten Glykoprotein E2 aus, eine anschließende HIV-Infektion signifikant zu hemmen. Der Effekt kann spezifisch durch Vorinkubation mit monoklonalen anti-E2 Antikörpern wegtitriert werden.



Für diese Untersuchungen wurde sowohl rekombinantes Vollängen E2 Protein, als auch ein Fusionsprotein zwischen dem GBV-C E2 Glykoprotein und der humanen IgG Fc-Region verwendet. Letzteres hat unter anderem den Vorteil, dass durch die Fusion mit der Fc-

Region die erleichterte Proteinreinigung mittels Protein A-Säulenchromatographie ermöglicht wurde und es auch mit einer erhöhten biologischen Halbwertszeit des rekombinanten Proteins zu rechnen ist. Durch die Etablierung eines „Single-Cycle HIV-Assays“ unter der Verwendung von HIV-Reporterviren, die entweder mit X4- oder R5-tropen HIV Env-Proteinen oder mit heterologen VSV-G Glykoproteinen versehen wurden, konnte eindeutig belegt werden, dass durch das E2-Protein ausschließlich die frühen HIV-Replikationsschritte, also der Eintritt des HI-Virus während der Infektion, unterdrückt wird. Der inhibierende Effekt des E2-Proteins ist nicht auf eine HIV-Untergruppe beschränkt, sowohl CXCR4- als auch CCR5-trope HIV Isolate werden spezifisch gehemmt. Somit handelt es sich bei dem E2-Fc Fusionsprotein um einen neuen X4- und R5-wirksamen „Entry“-Inhibitor, dessen IC_{50} für PBMC ca. 6nM beträgt (Jung et al. AIDS, 21, 2007). Der genaue Wirkmechanismus ist jedoch noch nicht komplett verstanden. Obwohl die Hemmung „in trans“ durch die Induktion von löslichen anti-retroviralen Faktoren vermittelt wird, gehen wir davon aus, dass keine α - und β -Chemokine wie SDF-1 oder RANTES durch das GBV-C E2 Protein induziert werden. Obwohl Zellüberstände von E2-stimulierten PBMC eine anti-retrovirale Aktivität besaßen, konnte im ELISA zu keinem Zeitpunkt nach E2-Stimulation eine nennenswerte Induktion von RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β noch von SDF-1 nachgewiesen werden. Auch konnte der X4-HIV inhibitorische Effekt nicht durch Vorinkubation mit großen Mengen an anti-SDF wegetitriert (50 μ g/ml) werden.

Durch Expression von größeren GBV-C Genkassetten in Herpesvirus saimiri Genvektoren konnte weiterhin gezeigt werden, dass zusätzlich zum E2 noch weitere Genkomponenten des GB Virus C existieren, die HIV-inhibitorisch wirken. Hier scheint aber der Replikationsblock nach den HIV-Entry zu liegen. Dies wiederum deckt sich mit den Forschungsergebnissen von der Arbeitsgruppe um Prof. Jack Stapleton, die zeigen konnten, dass die Expression des nicht-strukturellen Proteins NS5A, bzw. eines Peptides innerhalb der NS5A Region, zur signifikanten Unterdrückung der HIV-Replikation führt.

Die Identifizierung des rekombinanten E2-Proteins kann die Entwicklung einer neuen Klasse von HIV-Therapeutika nach sich ziehen. Dabei kann insbesondere die weitere Aufklärung der E2-induzierten Faktoren neue Erkenntnisse liefern über das Netzwerk und das Zusammenspiel des angeborenen Immunsystems in der Abwehr retroviraler Infektionen.

6. Publikationen innerhalb des Projektes

Publikationen:

Jung S., Eichenmüller M., Donhauser N., Neipel F., Engel A., Hess, G., Fleckenstein B. and Reil, H: HIV entry inhibition by the envelope 2 glycoprotein of GB Virus C. AIDS, 2007, 21, 645-647

Jung S, Tenckhoff S., Müller Ralf., Donhauser N., Tillmann H., Fleckenstein B. and Reil, H. GBV-C Isolates differ in their ability to interfere with the HIV-replication, manuscript in preparation.

Publikation des Kooperationspartner:

Tillmann HL, Kaiser T, Claes C, Schmidt RE, Manns MP, Stoll M. Differential influence of different hepatitis viruses on quality of life in HIV positive patients. Eur J Med Res. 2006 Sep 29;11(9):381-5.

Zhang W, Chaloner K, Tillmann HL, Williams CF, Stapleton JT. Effect of early and late GB virus C viraemia on survival of HIV-infected individuals: a meta-analysis. HIV Med. 2006 Apr;7(3):173-80.

Weitere Beiträge:

Reil H.: 10 Jahre nach der Entdeckung, ist GBV-C immer noch das „Good Boy“ Virus?

Retrovirus Bulletin (2), 2006: 3-5 Hrsg: Nationales Referenzzentrum für Retroviren, Erlangen

Reil H. und Jung S.: GBV-C und HIV, was wissen wir heute?, MedReport (9), 31, 2007, 4, Hrsg: Blackwell Verlag

Vorträge:

Reil, H.

Deutsch-Österreichischer AIDS-Kongress (DÖAK) 2007, Frankfurt, June 27th-30th 2007: More than one interaction: GBV-C clinical isolates differ in the ability to interfere with entry and post entry replication steps of HIV.

Reil, H.

2. Münchner AIDS Werkstatt, Arabella Sheraton Hotel München, March 16-17 2007: GBV-C and the relevance for HIV patients, an update.

Reil, H., Jung S, Tillmann H. and Fleckenstein B.

3. Hep-Net Symposium, Medizinische Hochschule Hannover, 10. Juni 2006: Cellular mechanism of the interaction of GB virus & HIV and the possible role in ameliorating HIV disease progression.

Reil, H., Jung, S., Eichenmueller, M., Donhauser, N., Neipel, F., Fleckenstein, B.

Annual Meeting of the "Gesellschaft für Virologie" (GFV 2006), München, March 15-18, 2006: HIV Replication is Inhibited by the GB Virus C Envelope Glycoprotein E2

Poster:

Jung, S. (received the young investigator award), Helm, M., Mueller, R., Hess G. and Reil, H., GB Virus C Isolates Differ in their Ability to Suppress Entry and Post Entry Events of HIV Replication in vitro - Indication for a Multicomponent Mechanism, 14th Conference of Retroviruses and opportunistic infections (14th CROI) Los Angeles, USA, 25.-29. Feb. 2007

Jung, S (Erhalt des Jungforscherpreises), Eichenmüller, M., Donhauser, N., Neipel F., Fleckenstein, B., and Reil, H. HIV Replication is Inhibited by the GB Virus C Envelope Glycoprotein E2, 13th Conference of Retroviruses and opportunistic infections (13th CROI) Denver, USA, 5.-9. Feb. 2006, Abstract P150.

Reil, H., Jung, S., Eichenmüller, M., Müller R., and Fleckenstein, B. Entry inhibition of HIV by envelope 2 glycoprotein of GB Virus 13th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Virus, Cairns, Australia 27.-31. Aug. 2006, Abstract 608.

Jung, S., and Reil, H., Clinical GB Virus C isolates differ in their HIV inhibitory phenotype. 13th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Virus, Cairns, Australia 27.-31. Aug. 2006, Abstract 679.