

J.Reinhardt · T.Wolff, Robert Koch-Institut, Berlin

Influenzavirus-Interaktionen mit der Wirtszelle: Eine unheilvolle Begegnung

Arbeiten der Nachwuchsgruppe „Influenza-Virusgenetik“ des Robert Koch-Instituts

Infektionen durch Influenza-A- und -B-Viren sind weltweit die Ursache für beträchtliche Morbidität und Mortalität. Trotz der alljährlichen Impfkampagnen gelingt es diesen Viren, aufgrund ihrer genetischen Wandlungsfähigkeit kontinuierlich neue Grippewellen auszulösen [1]. So kam es in Deutschland im Winter 1998/99 schätzungsweise zu 4,5–5 Millionen Influenza-assoziierten Arbeitsunfähigkeiten, ca. 25.000 Hospitalisierungen sowie einer Übersterblichkeit von etwa 15.000 Todesfällen [2]. Neben diesen saisonalen und lokal begrenzten Grippewellen, die von Stämmen mit im Vergleich zum Vorjahr geringen genetischen Veränderungen verursacht werden, besitzt das Influenza-A-Virus jedoch auch pandemisches Potenzial. Im letzten Jahrhundert entstanden in den Jahren 1918, 1957 und 1968 Stämme mit radikal veränderten Oberflächenglykoproteinen, die kurzzeitige, weltweite Epidemien mit hoher Mortalität auslösten. Der „Spanischen Influenza“ fielen 1918/19 beispielsweise weltweit ca. 20 Mio. Menschen zum Opfer.

Zur Kontrolle der Influenza sollte ein möglichst breites Spektrum von Prophylaxe- und Therapiemaßnahmen zur Verfügung stehen. Die Immunprophylaxe durch parenteral verabreichte Totvakzine kann eine Protektion von 70 bis 90% verleihen. Ihre Wirkung wird jedoch eingeschränkt durch eine schlechte generelle Akzeptanz und eine verringerte Effizienz in der am stärksten durch Komplikationen der Influenza betroffenen Gruppe der über 60-Jährigen. Im

Bereich der antiviralen Therapie hat die mögliche Behandlung der Influenza durch Amantadin aufgrund von Nebenwirkungen und rascher Resistenzentwicklung keine signifikante Bedeutung erlangt. Auch für die neuen Neuraminidase-Inhibitoren sind bereits Resistenzen beschrieben worden. Es bleibt daher abzuwarten, ob diese Substanzen ihre in klinischen Versuchen demonstrierte hohe Wirksamkeit auch bei breiter Anwendung unter Beweis stellen werden. Aus diesen Gründen ist es wünschenswert, die gegenwärtigen Kontrollmöglichkeiten durch die Entwicklung neuer antiviraler Strategien zu ergänzen. Dazu ist ein umfassendes Verständnis der Influenzaviren und der Mechanismen, mit denen sie ihre Wirte zur raschen Vermehrung benutzen, unerlässlich. In den vergangenen zwei Jahrzehnten haben wir fundamentale Kenntnisse über die biochemischen und genetischen Strukturen der Influenzaviren gewonnen. Die Einführung von neuen zell- und molekularbiologischen Methoden ermöglicht es seit kurzem, von der reduktionistischen Analyse des Virus allein (bzw. seiner Genprodukte) zu einer gesamtheitlichen Betrachtungsweise der Wechselwirkungen des Virus mit seiner Wirtszelle zu kommen. Dieser Beitrag gibt nach Vorstellung des viralen Vermehrungszyklus eine Übersicht über neueste Entwicklungen auf dem Gebiet der Virus-Wirtszellinteraktionen mit besonderer Berücksichtigung zweier Projekte, die in der Nachwuchsgruppe „Influenza-Vi-

rusgenetik“ (NG 2) des Robert Koch-Instituts bearbeitet werden.

Influenzaviren: Struktur und Replikationszyklus

Influenzaviren sind von einer Membran umhüllt und besitzen einen Durchmesser von ca. 80–120 nm (Abb. 1). Sie zeichnen sich durch ein Negativstrang-RNA-Genom aus, das bei Influenza-A- und -B-Viren aus acht Segmenten besteht und für zehn (Typ A) bzw. elf (Typ B) bekannte virale Proteine kodiert. Wir analysieren insbesondere die Funktionen des viralen Nichtstruktur-Proteins NS1 und des Matrixproteins M1 in der infizierten Zelle. Influenzaviren initiieren eine Infektion durch Bindung des viralen Hämagglutinin (HA)-Glykoproteins an Sialinsäure-tragende Oberflächenproteine der Zelle, worauf ihre endozytotische Aufnahme erfolgt (Abb. 2). In den Endosomen kommt es zur Dissoziation des viralen M1-Proteins von den in virales Ribonukleoprotein (vRNP) verpackten Gensegmenten und zur Fusion der viralen und endosomalen Membranen. Dadurch werden die vRNPs in der Zelle freigesetzt und anschließend in den Kern eingeschleust, wo das virale Genom transkribiert und repliziert wird.

Das NS1-Protein gilt als wichtiger Virulenzfaktor und wird in der Frühphase

Thorsten Wolff
Robert Koch-Institut, Nordufer 20, 13353 Berlin
E-Mail: wolff@rki.de

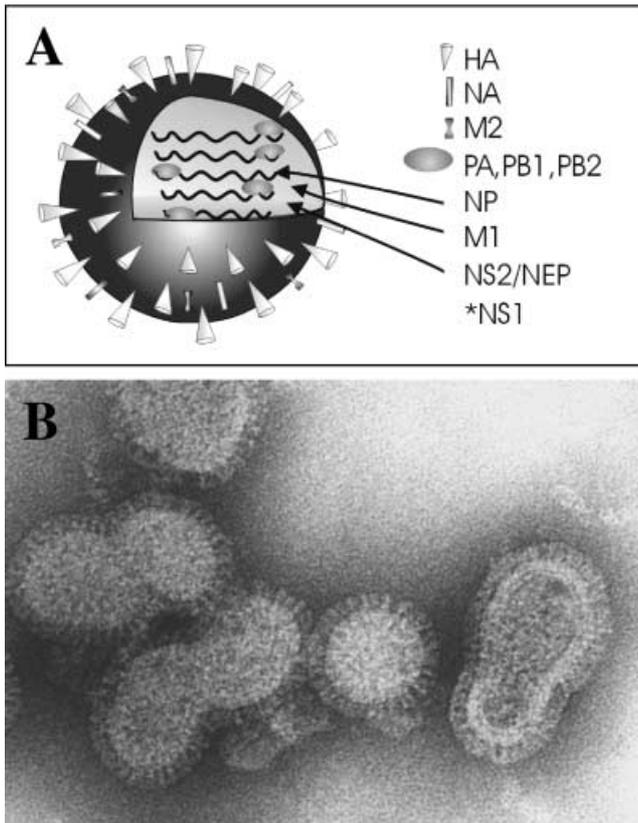


Abb. 1a,b ▲ **Struktur der Influenzaviren.** (a) Schematische Darstellung eines Viruspartikels und der viralen Genprodukte. In die Virusmembran sind die zwei Oberflächenglykoproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) eingelagert. Im Innern befinden sich acht genomische virale RNAs, die durch das Nukleoprotein (NP) und eine trimere RNA-abhängige RNA-Polymerase (PA, PB1, PB2) in virales Ribonukleoprotein (vRNP) verpackt werden. Unter der Membran ist das Matrixprotein M1 angelagert, das die vRNPs umhüllt und die innere Stabilität des Virions gewährleistet. Weiterhin finden sich im Virion geringe Mengen des membranständigen M2 Ionenkanalproteins sowie des NS2/NEP-Proteins, das vermutlich eine Rolle beim Kernexport der vRNPs spielt. Der * kennzeichnet, dass Influenzaviren in infizierten Zellen ein einziges bekanntes Nichtstrukturprotein namens NS1 exprimieren, das vielfältige regulatorische Funktionen besitzt, aber nicht Bestandteil des Virions ist. (b) Elektronenmikroskopische Darstellung von Influenza B Viren

der Infektion exprimiert. NS1 hemmt das Spleißen und die Polyadenylierung von zellulären prä-mRNAs, was zu deren Retention im Zellkern führt [3] und dazu beiträgt, dass die Zelle nach kurzer Zeit nur noch virale Proteine produziert. Durch seine Fähigkeit an Doppelstrang-RNA (dsRNA) zu binden, antagonisiert das NS1-Protein weiterhin die Ausbildung eines Interferon-induzierten antiviralen Status in der Zelle [4]. In der Tat sind Influenzaviren, die kein NS1-Protein exprimieren, im Tiermodell avirulent [5].

In der späten Infektionsphase werden neusynthetisierte vRNPs aus dem Kern in das Zytoplasma transportiert und an der Plasmamembran in Viruspar-

tikel verpackt. Bei mehreren dieser Schritte werden dem viralen M1-Protein wichtige Funktionen zugeschrieben. Im Zellkern vermittelt M1 in Assoziation mit dem viralen NS2/NEP-Protein den Export der vRNPs in das Zytoplasma. Dort lagern sich diese Komplexe unterhalb der Plasmamembran an und werden in neu entstehende Virionen verpackt. Das M1-Protein wird als treibende Kraft bei der Abknospung der Viruspartikel angesehen, da seine alleinige Expression auf derzeit unverständlichem Wege die Abschneuerung von virusartigen Vesikeln induzieren kann. Infektionen mit Influenzaviren sind fast immer lytisch. In den natürlichen Zielgeweben der Viren, d. h.

im Epithel des oberen und unteren Respirationstraktes, kommt es daher zu starken Schädigungen und der Entwicklung von Entzündungsreaktionen [6].

Molekulare Analyse von Virus-Wirtzell-Interaktionen

Durch die Bestimmung der räumlichen Strukturen der viralen Oberflächenglykoproteine HA und NA in den 80er-Jahren haben wir sehr detaillierte Kenntnisse darüber gewonnen, wie Influenzaviren an Sialinsäure-tragende Rezeptorproteine auf der Zelloberfläche binden. Das Resultat einer viralen Infektion wird jedoch nicht nur durch Interaktionen auf der Zelloberfläche, sondern gleichermaßen durch intrazelluläre Wechselwirkungen von Wirts- und Virus-kodierten Faktoren bestimmt. Im Gegensatz zu den gut charakterisierten Rezeptordeterminanten kennen wir bisher jedoch nur wenige dieser intrazellulären Interaktionspartner, die potenziell wichtige Beiträge zum Tropismus, zur Virulenz oder zur Wirtsspezifität der Viren leisten [7]. Die Identifizierung von zellulären Proteinen, die mit viralen Genprodukten, wie z. B. dem NS1- und dem M1-Protein interagieren, ist daher ein Fokus der Arbeitsgruppe NG2. Wir erhoffen uns von diesen Analysen nicht nur ein generell besseres Verständnis des viralen Vermehrungszyklus zu erlangen, sondern auch die Identifizierung neuer Angriffspunkte zur Kontrolle der viralen Vermehrung. Ein zweites Interessensgebiet der Arbeitsgruppe liegt auf der erst kürzlich erkannten Aktivierung von intrazellulären Signalübertragungswegen durch replizierende Influenzaviren. Hier möchten wir verstehen, warum und wie sich die Viren in intrazelluläre Kommunikationswege einschalten und welche viralen Komponenten im Einzelnen daran beteiligt sind.

Zelluläre Interaktionspartner der viralen NS1- und M1-Proteine

Wir haben uns auf die Suche nach zellulären Proteinen begeben, die mit den viralen NS1- bzw. M1-Proteinen interagieren. Beide Faktoren tragen vermutlich unter Vermittlung von zellulären Proteinen zur Wirtsspezifität von Influenzaviren bei [8]. Methodisch benutzen wir das Zwei-Hybrid-System, das die Selektion interagierender Faktoren aus einer

cDNA-Plasmidgenbank ermöglicht, die die Gesamtheit der exprimierten Gene einer Zelle repräsentiert [9]. Mittels dieser Methodik gelang es uns, mehrere zelluläre Proteine zu finden, die auch in biochemischen Assays mit den viralen Proteinen interagierten.

Für das NS1-Protein wurden von uns zwei bis dahin unbekannte zelluläre Proteine namens NS1-BP (NS1 binding protein) [10] und NS1-I (NS1-interactor) [11] als interagierende Faktoren identifiziert. NS1-BP ist ein 70 kDa Protein, das in subnukleären Strukturen lokalisiert wurde, in denen Faktoren der prä-mRNA Prozessierung angereichert sind. NS1-BP wird in virusinfizierten Zellen in das gesamte Nukleoplasma relokalisiert. Biochemische Studien in Zellkernextrakten ergaben, dass ein mutiertes NS1-BP ähnlich wie das virale NS1-Protein das Spleißen von prä-mRNA hemmt. Wir vermuten daher, dass die Spleiß-inhibitorische Wirkung des NS1-Proteins über die Bindung an das zelluläre NS1-BP vermittelt wird. Die Hinweise auf potenzielle Funktionen des identifizierten NS1-I sind dagegen noch begrenzt. Erstaunlicherweise kopräzipitierte NS1-I die divergenten NS1-Proteine von Influenza-A- und -B-Viren, obwohl diese Faktoren nur ca. 20% Identität besitzen. Trotz der großen Unterschiede auf der Sequenzebene besitzen die NS1-Proteine der Typ-A- und -B-Viren jedoch sehr ähnliche Funktionen. NS1-I könnte daher ein Faktor sein, dessen Aktivität für beide homologen NS1-Proteine wichtig ist.

Für das M1-Protein des Influenza-A-Virus wurde von uns zuerst das zelluläre RACK1 (Rezeptor der aktivierten C-Kinase) Protein als Interaktionspartner identifiziert [12]. Das 36 kDa RACK1-Protein wurde ursprünglich aufgrund seiner Fähigkeit isoliert, spezifisch die aktivierte Form der Proteinkinase C (PKC) zu binden [13]. Es besteht fast ausschließlich aus sieben WD-Domänen, die Protein-Protein Interaktionen vermitteln. Die RACK1-Proteine von Menschen, Schweinen und Hühnern sind absolut identisch, was auf eine wichtige Funktion dieses Proteins hinweist. Wir konnten zeigen, dass das virale M1-Protein durch die PKC phosphoryliert werden kann und postulieren daher eine Adapterfunktion des RACK1-Proteins bei diesem Vorgang [12]. Durch Phosphorylierung könnten verschiedene Eigenschaften des M1-Proteins wie z. B. seine intrazelluläre Lokali-

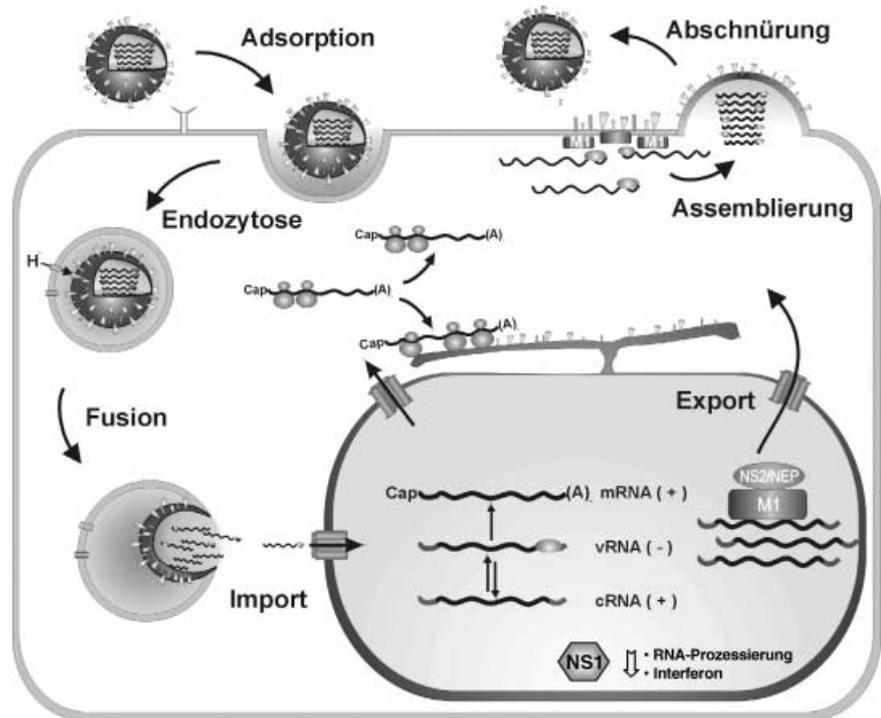


Abb. 2 ▲ Darstellung des Replikationszyklus der Influenzaviren. Die Beschreibung einzelner Schritte ist dem Text zu entnehmen. Viren und Zellkompartimente sind nicht maßstabsgetreu eingezeichnet

sierung gesteuert werden. Interessanterweise lässt sich die Virusvermehrung in Zellkultur durch PKC-Inhibitoren stoppen (zusammengefasst in [7]). Da neben dem M1-Protein auch die viralen NP-, M2-, NS1-, NS2-/NEP- und PA-Proteine durch bisher nicht-charakterisierte Kinasen phosphoryliert werden, ist derzeit jedoch nicht geklärt, ob dieser Effekt spezifisch auf einer reduzierten Phosphorylierung des M1-Proteins beruht. Ein weiteres M1-interagierendes Isolat (Klon 2-IV-4) besitzt Homologie zu einem transmembranalen Heparansulfat-Proteoglykan (J. Reinhardt, unveröffentlichte Beobachtung). Wir konnten zeigen, dass das M1-Protein im Bereich der Transmembran- und zytoplasmatischen Domäne des korrespondierenden Proteins bindet und konnten diesen zellulären Faktor in hochgereinigten Viruspräparationen nachweisen. Daraus leiten wir die Arbeitshypothese ab, dass dieses Protein die Funktion des M1-Proteins bei der Virusassemblierung bzw. -abkapselung unterstützt. Weitere NS1- und M1-interagierende Faktoren wurden in anderen Laboren identifiziert. So bindet NS1 auch zwei Proteine, die essentiell für die zelluläre Polyadenylierung sind und blockiert dadurch die Reifung und den Export von zelleigenen aber nicht viralen mRNAs [3]. Für das M1-Protein konnte eine Bindung

an Histone nachgewiesen werden [15]. Die Bedeutung dieser Interaktion ist jedoch noch nicht verstanden. Auch für das virale Nukleoprotein sind eine Reihe von zellulären Proteinen identifiziert worden, die potenziell die virale Replikation beeinflussen können [16].

Wir werden in Zukunft die Funktion der identifizierten zellulären Proteine NS1-BP, NS1-I und RACK1 im Infektionsverlauf näher charakterisieren. Wenn die zellulären Interaktionspartner essenziell für die virale Vermehrung sind, sollte eine Beeinträchtigung ihrer Bindung an die viralen Proteine die Replikationsfähigkeit der Viren reduzieren. Diese Erwartung überprüfen wir in aktuellen Studien mittels revers-genetischer Ansätze. Die Arbeiten umfassen die Kartierung der Interaktionsdomänen in den viralen Proteinen und die Einführung von Mutationen in diese Bereiche im Kontext des viralen Genoms. Zur genetischen Veränderung benutzen wir das erst kürzlich entwickelte System der De-novo-Erzeugung von Influenzaviren [14]. Diese leistungsfähige Methode ermöglicht es, zielgenau spezifische Veränderungen in jeden gewünschten Bereich des viralen Genoms einzuführen. Falls die genetische Inaktivierung von einem oder mehreren zellulären Interaktionspartnern die Virusvermehrung

rung beeinflusst, wären neue Angriffspunkte für inhibitorische Substanzen im viralen Replikationszyklus identifiziert.

Influenzaviren aktivieren zelluläre Signalübertragungswege

Das Genexpressionsmuster von Zellen ändert sich in Folge von extra- oder intrazellulären Stimuli (z. B. Wachstumsfaktoren, Hormone, Zytokine). Diese Signale werden in vielen Fällen durch Proteinkinase-Kaskaden von der Membran in den Zellkern übertragen. Seit kurzer Zeit wissen wir, dass Influenzaviren zu der wachsenden Gruppe von Viren gehören, die die mitogene Raf/MEK/ERK-Signaltransduktions-Kaskade aktivieren [17]. Dieser Weg der intrazellulären Reizweiterleitung stimuliert normalerweise die Expression von Genen, die das Zellwachstum steuern. Die Aktivierung der beteiligten Proteinkinasen in virusinfizierten Zellen scheint jedoch nicht primär der Modulation von genetischen Programmen zu dienen, sondern unterstützt vermutlich einen Schritt der Virusreifung im späten Infektionsstadium. Bei Blockierung dieser Funktion durch einen hochspezifischen Kinase-Inhibitor konnten wir beobachten, dass der Transport des replizierten viralen Genoms vom Kern in das Zytoplasma deutlich eingeschränkt ist und entsprechend weniger Viren gebildet werden [17]. Die Aktivierung der Raf/MEK/ERK-Signaltransduktions-Kaskade könnte daher als eine Achillesferse der Virusreplikation angesehen werden. Diese Ergebnisse sind insbesondere auch aus zellbiologischer Sicht interessant, weil sie erstmals zeigen, dass der Export von nukleären RNPs durch Signaltransduktionswege reguliert werden kann. Zukünftige Arbeiten sind auf die detaillierte Aufklärung dieses offensichtlich wichtigen Schrittes der viralen Vermehrung ausgerichtet. Die bisherigen Analysen lassen vermuten, dass nicht virale sondern zelluläre Proteine durch die Raf/MEK/ERK-Kaskade gesteuert werden. Wir versuchen diese zellulären Faktoren zu identifizieren und ihre Funktionen im Infektionsgeschehen zu charakterisieren.

Perspektiven

Influenzaviren sind in den letzten Jahrzehnten intensiv untersucht worden. Wir besitzen heute detaillierte Kenntnisse

über die Struktur und Genetik dieser Viren, wissen bisher jedoch nur wenig darüber, welche zellulären Komponenten für den effizienten Verlauf einer Infektion wichtig sind. Daher sind die molekularen Faktoren, die die krankheitsrelevanten Eigenschaften dieser Viren (z. B. Virulenz, Gewebe- oder Wirtsspezifität) bestimmen, in vielen Fällen noch völlig unbekannt. Ziel unserer Arbeiten ist es, die Beiträge und Veränderungen auf zellulärer Seite im Infektionsgeschehen besser zu verstehen. Unserer Augenmerk gilt daher besonders der Identifizierung und Beschreibung von (i) zellulären Proteinen wie z. B. NS1-BP oder RACK1, die mit viralen Proteinen wechselwirken und (ii) von regulatorischen Zellproteinen, die z. B. als Bestandteil von Signalübertragungswegen im Infektionsverlauf aktiviert werden und daher potenziell wichtig für den Infektionsverlauf sind. Wenn die Aktivitäten solcher Wirtsfaktoren entscheidend für die Virusvermehrung sind, bietet sich deren Blockierung zur Hemmung der viralen Vermehrung an. Damit ergeben sich auch Angriffspunkte zur Entwicklung neuer Therapieformen. Die rapiden Fortschritte in den letzten Jahren auf dem Gebiet der Virus-Wirtszell-Interaktionen beruhen nicht zuletzt auf der Entwicklung von neuen leistungsfähigen Methoden wie z. B. dem Zwei-Hybrid-System. Seit einiger Zeit werden zudem die Reverse Genetik, Knock-out Systeme in Zellkultur und im Tiermodell sowie DNA-Array-Analysen benutzt, um das komplette Spektrum der virusinduzierten Veränderungen in Wirtszellen zu erfassen und zu bewerten. Angesichts der großen Erfolge bei der strukturellen Analyse der Influenzaviren in der Vergangenheit scheint es sicher, dass uns diese Technologien in Zukunft ein besseres Verständnis dieser Krankheitserreger erlauben und folglich auch neue Optionen ihrer Kontrolle eröffnen werden.

Danksagung. Wir bedanken uns bei Dr. Hans Gelderblom (RKI Berlin) für die elektronenmikroskopische Aufnahme von Influenzaviren und bei Dagmar Heuer (MPI für Infektionsbiologie Berlin) für die Erstellung der Graphiken.

Literatur

- Nicholson KG (1998) Human influenza. In: Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ (eds) Textbook of influenza. Blackwell Sciences Ltd., Oxford, pp 219–264

- Uphoff H (2000) Sentinelsystem der Arbeitsgemeinschaft Influenza. In: Vogel G, Lange W (Hrsg) Influenza – Neue diagnostische und therapeutische Chancen. Georg Thieme, Stuttgart, S 25–33
- Chen Z, Krug RM (2000) Selective nuclear export of viral mRNAs in influenza-virus-infected cells. Trends Microbiol 8:376–383
- Garcia-Sastre A (2001) Inhibition of interferon-mediated antiviral responses by influenza A viruses and other negative-strand RNA viruses. Virology 279:375–384
- Talon J, Salvatore M, O'Neill RE et al. (2000) Influenza A and B viruses expressing altered NS1 proteins: a vaccine approach. Proc Natl Acad Sci USA 97:4309–4314
- Wright PF, Webster RG (2001) Orthomyxoviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM et al. (eds) Virology. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp 1533–1579
- Ludwig S, Pleschka S, Wolff T (1999) A fatal relationship – influenza virus interactions with the host cell. Viral Immunity 12:175–196
- Lamb RA, Knipe DM, Howley PM et al. (eds) Virology. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp 1487–1531
- Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R, Fields S (1991) The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. Proc Natl Acad Sci USA 88:9578–9582
- Wolff T, O'Neill RE, Palese P (1998) NS1-Binding protein (NS1-BP): a novel human protein that interacts with the influenza A virus nonstructural NS1 protein is relocalized in the nuclei of infected cells. J Virol 72:7170–7180
- Wolff T, O'Neill RE, Palese P (1996) Interaction cloning of NS1-I, a human protein that binds to the non-structural NS1 proteins of influenza A and B viruses. J Virol 70:5363–5372
- Reinhardt J, Wolff T (2000) The influenza A virus M1 protein interacts with the cellular receptor of activated C kinase (RACK) 1 and can be phosphorylated by protein kinase C. Vet Microbiol 74:87–100
- Ron D, Chen CH, Caldwell J, Jamieson L, Orr E, Mochly-Rosen D (1994) Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins. Proc Natl Acad Sci USA 91:839–843
- Fodor E, Devenish L, Engelhardt OG, Palese P, Brownlee GG, Garcia-Sastre A (1999) Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. J Virol 73:9679–9682
- Zhirnov OP, Klenk HD (1997) Histones as a target for influenza virus matrix protein M1. Virology 235:302–310
- Palese P, Wang P, Wolff T, O'Neill RE (1997) Host-viral protein-protein interactions in influenza virus replication. In: McCrae MA et al. (eds) Molecular aspects of host-pathogen interactions. Cambridge University Press, Cambridge, pp 327–340
- Pleschka S, Wolff T, Ehrhardt C, Hobom G, Planz O, Rapp UR, Ludwig S (2001) Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade. Nat Cell Biol 3:301–30