

Abteilung für Experimentelle Virologie

■ Leiter: Prof. Dr. Thomas Pietschmann

Tel.: 0511/220027-130 • E-Mail: thomas.pietschmann@twincore.de • www.twincore.de/

Forschungsprofil

Die Abteilung für Experimentelle Virologie besteht aus derzeit (Stand Dezember 2011) neunzehn Mitarbeitern, welche die Mechanismen der Vermehrung des Hepatitis-C-Virus (HCV) in Leberzellen untersuchen. Unser interdisziplinäres Team besteht aus Naturwissenschaftlern, Ärzten sowie labortechnischen Mitarbeitern. In unserer Forschungsarbeit konzentrieren wir uns auf drei komplementäre Themenbereiche, die wir zusammen mit Kooperationspartnern an der MHH und dem Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig bearbeiten. Im Detail analysieren wir die Zelleintrittsmechanismen des HCV sowie die Schritte, die zur Bildung und Freisetzung infektiöser HCV Partikel führen. Darüber hinaus prüfen wir, welche Faktoren den engen Gewebe- und Wirtstropismus des HCV bedingen. Dieses molekularvirologische Forschungsprogramm wird durch klinische und anwendungsbezogene Projekte vertieft, bei denen wir beispielsweise Übertragungsrisiken des HCV und die Virus-Wirts-Interaktion bei immunsupprimierten Patienten (z.B. nach Transplantation) untersuchen sowie die antivirale Wirkung kleiner Moleküle prüfen. Auf diese Weise wollen wir zur Identifizierung und Charakterisierung von Therapie-Zielstrukturen und neuen Wirkstoffklassen beitragen. Unsere Untersuchungen zum Tropismus des HCV sollen mittelfristig die Entwicklung von Kleintiermodellen für HCV zur Impfstoff- und Pathogenese-Forschung vorantreiben. Die Finanzierung unserer Forschungstätigkeit wird vorwiegend mit Hilfe von Drittmitteln der DFG - unter anderem im Rahmen lokaler Netzwerkförderprogramme (SFB900, IRTG 1273) - und des BMBF realisiert. Doktorandinnen und Doktoranden der Abteilung sind in die regionalen Graduiertenschulen der Hannover Biomedical Research School (HBRS) oder dem Strucmed-Programm integriert. Mitarbeiter der Abteilung tragen aktiv zur Graduiertenausbildung in den entsprechenden Programmen im Rahmen von Vorlesungen, Tutorials und Praktika bei.

Forschungsprojekte

Molekulare Mechanismen des Wirtszelltropismus des Hepatitis-C-Virus

Weltweit sind etwa 160 Millionen Menschen chronisch mit dem Hepatitis-C-Virus infiziert. Unbehandelt führt die Infektion bei etwa 20% der Patienten zur Entwicklung einer Leberzirrhose. Jährlich infizieren sich nach Schätzungen der WHO bis zu 4 Millionen Menschen neu mit HCV. Derzeit gibt es keinen prophylaktischen Impfstoff, der eine Ansteckung mit HCV, das vorwiegend über Blut übertragen wird, verhindert.

Die Entwicklung und Erprobung von Impfstoffen gegen HCV wird durch den Mangel an immunkompetenten Kleintiermodellen erschwert. HCV weist einen sehr engen Gewebe- und Spezies-tropismus. Entsprechend sind nur Menschen und Schimpansen für eine Infektion empfänglich und man beobachtet eine effektive Virusvermehrung nur in der Leber und nicht in anderen Organen. Die molekularen Grundlagen hierfür sind bisher nur unzureichend aufgeklärt. Da Viren für ihre Vermehrung obligatorisch wirtszelluläre Kofaktoren benötigen, ist es prinzipiell denkbar, dass der Mangel oder die genetische Inkompatibilität solcher Faktoren in extra-hepatischen Geweben bzw. in nicht-humanen Zellen die Virusreplikation limitieren. Darüber hinaus haben Säugerzellen Alarmsysteme entwickelt, die eine Virusinfektion signalisieren und dann die Bildung antiviraler Proteine auslösen, welche die Virusvermehrung unterbinden. Während HCV in humanen Zellen diese molekularen Systeme offenbar hinreichend unterdrücken kann, um eine chronische Infektion zu etablieren und aufrecht zu erhalten, könnten solche viralen Gegenmaßnahmen im artfremden Wirt (beispielsweise der Maus) versagen.

Vor diesem Hintergrund haben wir geprüft, ob dominante antivirale Faktoren - sogenannte Restriktionsfaktoren - in murinen Leberzellen oder in humanen, extrahepatischen Zellen die HCV Virusvermehrung hemmen. Zu diesem Zweck haben wir Mischzellen - Heterokaryonten - hergestellt indem wir HCV-empfindliche humane Leberzellen mit murinen Zellen bzw. humanen Zellen, die von extrahepatischen Geweben abgeleitet sind, fusioniert haben. Anschließend haben wir geprüft, ob sich HCV in diesen Heterokaryonten, in denen beispielsweise murine Restriktionsfaktoren Einfluss auf HCV nehmen können, vermehrt. Um ausschließlich die Virusvermehrung in den Heterokaryonten zu bewerten und nicht etwa Virusproduktion in humanen Zellen, die keine Zellfusion eingegangen sind oder die sich mit einer humanen Leberzelle vereinigt haben, setzten wir für diese Versuche ein Komplementationssystem ein: In Vorarbeiten konnten wir bereits zeigen, dass man das HCV Genom in zwei Teile zerlegen kann, ein Replikationsmodul (Replikon), das die viralen Enzyme für die Vermehrung des Genoms trägt und ein Verpackungsmodul, welches die Proteine für die Produktion neuer Partikel bildet (Abbildung 1 und Steinmann et al. Journal of Virology 2008). Durch die Verteilung dieser jeweils für die Virusbildung essentiellen Elemente auf die humane Leberzelle einerseits (Replikon) und die murine Zelle (Verpackungsmodul) andererseits, ist sichergestellt, dass nur in Heterokaryonten, die beide Komponenten tragen, Viren gebildet werden können. Die Insertion eines Reprotergens (Luziferase) in das Replikon erlaubte es uns schließlich mit Hilfe eines einfachen Reporterassays zu prüfen, ob sich unter diesen Voraussetzungen infektiöse HCV Partikel bilden.

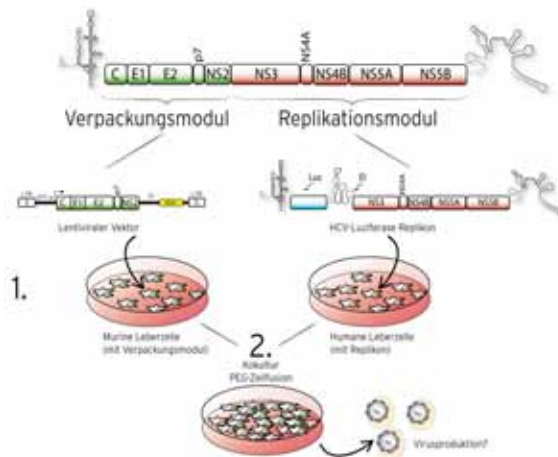


Abb. 1: Prinzip der konditionalen Virusproduktion in Heterokaryonten. (A) Schematische Darstellung des HCV Genoms und experimentelles Verfahren zur Prüfung von dominanten Restriktionen. Die essentiellen Replikationsproteine sind rot, die Elemente des Verpackungsmoduls in grün dargestellt. Zunächst wurde mit Hilfe von Transfektion ein HCV Replikon mit Luziferase Reporter gen in humane Leberzellen eingebracht (1). Anschließend wurden diese Zellen mit murinen Verpackungszellen (oder mit humanen Verpackungszellen) kokultiviert, welche nach lentiviralem Gentransfer das virale Verpackungsmodul bilden (2). Schließlich wurde die Zellfusion zwischen den Zellen mit PEG induziert, und mit Hilfe der Immunfluoreszenz der Fusionsprozess überprüft. Zwei Tage nach der Fusion wurde der Kulturüberstand der fusionierten Zellen geerntet und die Bildung infektiöser Viren durch Inokulierung naiver humaner Leberzellen und anschließenden Luziferase-Reporterassays überprüft.

Wie in Abbildung 2 dargestellt, konnten wir zunächst belegen, dass nach der Kokultur der humanen Replikon-Zellen mit den murinen Verpackungs-Zellen und induziert durch Polyethylen-Glycol (PEG), Heterokaryonten gebildet werden, welche sowohl über die Proteine des Replikationsmoduls (NS5A Protein) als auch über Eiweiße des Verpackungsmoduls (Hüllprotein E2) verfügen.

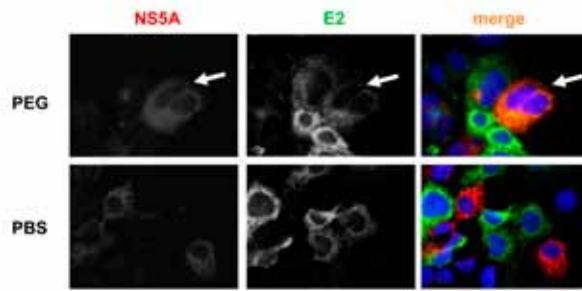


Abb. 2: Nachweis der Zellfusion zwischen humanen Replikon Zellen und murinen Verpackungszellen. Murine Leberzellen mit viralem Verpackungsmodul und humane Leberzellen mit HCV Replikon wurden kokultiviert und mit Hilfe von PEG fusioniert. Zwei Tage nach der PEG-induzierten Zellfusion wurden die Zellen fixiert und mit Antikörpern gegen das Virusprotein NS5A (Replikationsmodul, grün) und das virale Hüllprotein E2 (Verpackungsmodul, rot) angefärbt. Die DNA im Zellkern der Zellen wurde mit dem Kernfarbstoff DAPI (blau) angefärbt. In Abhängigkeit von der Induktion der Zellfusion durch PEG sieht man Heterokaryonten, welche sowohl NS5A als auch E2 bilden (weiße Pfeile).

Mit Hilfe des Luziferase-basierten Funktionstests konnten wir schließlich belegen, dass abhängig von Zellfusion und der Bildung beider Virusmodule in den fusionierten Partnerzellen in der Tat auch in maus-humanen Heterokaryonten infektiöse Viren gebildet werden (Figur 3). In ähnlicher Weise wurden auch in Heterokaryonten zwischen humanen Leberzellen und humanen Zelllinien aus extrahepatischen Geweben infektiöse Viren gebildet (Figur 3). Diese Ergebnisse

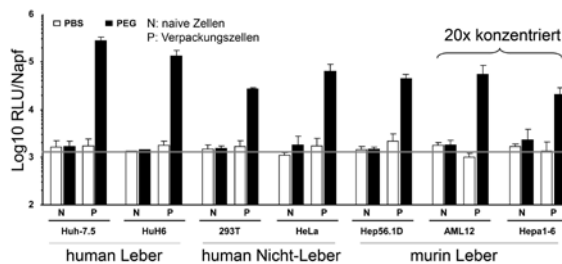


Abb. 3: Heterokaryonten bilden infektiöse HCV Partikel. Humane Leberzellen mit HCV Replikon wurden entweder mit den jeweils angegebenen naiven Zellen (N) oder mit den entsprechenden Zellen mit HCV Verpackungsmodul (P, Verpackungszellen) kokultiviert. Anschließend wurde die Kokultur mit PBS gewaschen oder mit PEG behandelt, um Zellfusion auszulösen. Zwei Tage nach dieser Behandlung wurden die Zellkulturüberstände geerntet und eingesetzt um naive Leberzellen zu infizieren. Die Übertragung des Luziferase-Enzyms in die infizierten Zellen zeigt, dass in den Heterokaryonten infektiöse Partikel gebildet wurden. Die graue Linie deutet die Hintergrund-Luziferaseaktivität in den inokulierten Zellen an. RLU: relative light units.

schließen formal aus, dass in den untersuchten murinen bzw. humanen Zelllinien Restriktionsfaktoren die Vermehrung von HCV dominant unterdrücken. Auf dieser Basis prüfen wir nun, welche humanen Replikations- Kofaktoren die Vermehrung in Mausleberzellen fördern und ob durch die Bereitstellung dieser Proteine eine effektive Vermehrung des HCV in diesen Zellen etabliert werden kann.

■ Projektleitung: Pietschmann, Thomas (Prof. Dr. rer. nat.); Kooperationspartner: Weber, Friedemann, (Prof. Dr. rer. nat.), Universität Marburg/Institut für Virologie; Förderung: EU

Weitere Forschungsprojekte

Humoral and cellular immunotherapy of HCV and HCV-related HCC

■ Projektleitung: Pietschmann, Thomas (Prof. Dr. rer. nat.); Kooperationspartner: Bruder, Dunja (Prof. Dr. rer. nat.), Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung Braunschweig; Förderung: Allianz Immuntherapie von Krebserkrankungen, ein Instrument des Impuls- und Vernetzungsfonds der Helmholtz-Gemeinschaft, HA-202

Novel Strategies to combat cholera, hepatitis C and leishmaniasis, IG-SCID TwinPro-03

■ Projektleitung: Pietschmann, Thomas (Prof. Dr. rer. nat.); Kooperationspartner: Sasse, Florenz (Dr. rer. nat.), Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung Braunschweig; Förderung: Indo German Science Centre (IG SCID) der Helmholtz Gemeinschaft

In vivo and in vitro correlates of hepatitis C virus replication

■ Projektleitung: Pietschmann, Thomas (Prof. Dr. rer. nat.); Kooperationspartner: Sällberg, Matti, (DDS, PhD), Division of Clinical Microbiology, Karolinska Institutet at Karolinska University Hospital Huddinge, Stockholm, Schweden; Förderung: IRTG 1273: Strategies of human pathogens to establish acute and chronic infections, DFG

Identification of host factors limiting HCV replication and assembly in non-human cells

■ Projektleitung: Pietschmann, Thomas (Prof. Dr. rer. nat.); Kooperationspartner: Schlegelberger, Brigitte (Prof. Dr. med.), MHH; Förderung: Zentrum für Infektionsbiologie

Untersuchungen zur Morphogenese des Hepatitis C Virus

■ Projektleitung: Pietschmann, Thomas (Prof. Dr. rer. nat.); Kooperationspartner: Penin, Francois (Prof. Dr.), Institut de Chimie des Proteines, UMR 5086 CNRS; Förderung: DFG, PI734/1-1

Molecular mechanisms of hepatitis C virus (HCV) infection and replication

■ Projektleitung: Pietschmann, Thomas (Prof. Dr. rer. nat.); Förderung: Impuls- und Vernetzungsfonds der Helmholtz-Gemeinschaft, SO-024

Identifizierung von Assemblierungsfaktoren des Hepatitis C Virus

■ Projektleitung: Menzel, Nicolas (Dr. rer. nat.); Förderung: HiLF MHH

Interaktion des Hepatitis-C-Virus mit Lipoproteinen und deren Rolle für die Infektion und Viruspersistenz

■ Projektleitung: Pietschmann, Thomas (Prof. Dr. rer. nat.); Kooperationspartner: Wedemeyer, Heiner (Prof. Dr. med.), MHH; Förderung: DFG, SFB900 Teilprojekt A6

Bedeutung der Hepatitis C Virus Hüllproteine für Assemblierung und Freisetzung infektiöser Viren

■ Projektleitung: Pietschmann, Thomas (Prof. Dr. rer. nat.); Steinmann, Eike (Prof. Dr. rer. nat.); Kooperationspartner: Sarrazin, Christoph (Prof. Dr. med.), Universität Frankfurt; Förderung: DFG PI 734/2-1 und STE 1954/1-1

Einfluss von Ciclosporin A auf das Hepatitis C Nichtstrukturprotein NS2

■ Projektleitung: Ciesek, Sandra (PD. Dr. med.); Förderung: DFG CI 171/2-1

Viral frontiers - species barriers of hepatitis C virus replication

■ Projektleitung: Pietschmann, Thomas (Prof. Dr. rer. nat.); Förderung: EU, VIRAFRONT 281473

Originalpublikationen

Ciesek S, von Hahn T, Colpitts CC, Schang LM, Friesland M, Steinmann J, Manns MP, Ott M, Wedemeyer H, Meuleman P, Pietschmann T, Steinmann E. The green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibits hepatitis C virus (HCV) entry. *Hepatology*; 2011;54(6):1947-1955

Ciesek S, Westhaus S, Wicht M, Wappler I, Henschen S, Sarrazin C, Hamdi N, Abdelaziz AI, Strassburg CP, Wedemeyer H, Manns MP, Pietschmann T, von Hahn T. Impact of intra- and interspecies variation of occludin on its function as coreceptor for authentic hepatitis C virus particles. *J Virol*; 2011;85(15):7613-7621

Doerrbecker J, Friesland M, Ciesek S, Erichsen TJ, Mateu-Gelabert P, Steinmann J, Steinmann J, Pietschmann T, Steinmann E. Inactivation and survival of hepatitis C virus on inanimate surfaces. *J Infect Dis*; 2011;204(12):1830-1838

Frentzen A, Hugging K, Bitzegeio J, Friesland M, Haid S, Gentzsch J, Hoffmann M, Lindemann D, Zimmer G, Zielecki F, Weber F, Steinmann E, Pietschmann T. Completion of hepatitis C virus replication cycle in heterokaryons excludes dominant restrictions in human non-liver and mouse liver cell lines. *PLoS Pathog*; 2011;7(4):e1002029

Gentzsch J, Hinkelmann B, Kaderali L, Irschik H, Jansen R, Sasse F, Frank R, Pietschmann T. Hepatitis C virus complete life cycle screen for identification of small molecules with pro- or antiviral activity. *Antiviral Res*; 2011;89(2):136-148

Lupberger J, Zeisel MB, Xiao F, Thumann C, Fofana I, Zona L, Davis C, Mee CJ, Turek M, Gorke S, Royer C, Fischer B, Zahid MN, Lavillette D, Fresquet J, Cosset FL, Rothenberg SM, Pietschmann T, Patel AH, Pessaux P, Doffoel M, Raffelsberger W, Poch O, McKeating JA, Brino L, Baumert TF. EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med*; 2011;17(5):589-595

Paulmann D, Steinmann J, Becker B, Bischoff B, Steinmann E, Steinmann J. Virucidal activity of different alcohols against murine norovirus, a surrogate of human norovirus. *J Hosp Infect*; 2011;79(4):378-379

Ruhl M, Chhatwal P, Strathmann H, Kuntzen T, Bankwitz D, Skibbe K, Walker A, Heinemann FM, Horn PA, Allen TM, Hoffmann D, Pietschmann T, Timm J. Escape from a Dominant HLA-B*15-Restricted CD8+ T Cell Response against Hepatitis C Virus Requires Compensatory Mutations outside the Epitope. *J Virol*; 2012;86(2):991-1000

Steinmann E, Ciesek S, Friesland M, Erichsen TJ, Pietschmann T. Prolonged survival of hepatitis C virus in the anesthetic propofol. *Clin Infect Dis*; 2011;53(9):963-964

Steinmann J, Kaase M, Gatermann S, Popp W, Steinmann E, Damman M, Paul A, Saner F, Buer J, Rath P. Outbreak due to a *Klebsiella pneumoniae* strain harbouring KPC-2 and VIM-1 in a German university hospital, July 2010 to January 2011. *Euro Surveill*; 2011;16(33):19944

von Hahn T, Schulze A, Chicano Wust I, Heidrich B, Becker T, Steinmann E, Helfritz FA, Rohrmann K, Urban S, Manns MP, Pietschmann T, Ciesek S. The novel immunosuppressive protein kinase C inhibitor sotrastaurin has no pro-viral effects on the replication cycle of hepatitis B or C virus. *PLoS One*; 2011;6(9):e24142

Abstracts

2011 wurden 16 Abstracts publiziert.

Promotionen

Bankwitz, Dorothea (Dr. rer. nat. M.Sc.): Role of the hypervariable regions of hepatitis C virus for immune recognition and viral fitness.

Gentzsch, Juliane (Dr. rer. nat.): Perturbation of pathogen and host cell for characterization of hepatitis C virus assembly pathways.

Stipendien

Hüging, Kathrin: ZIB Stipendium.

Frentzen, Anne: IRTG 1273 Stipendium.

Wissenschaftspreise

Steinmann, Eike: Jürgen-Wehland-Preis, Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung.

Steinmann, Eike: Hygiene-Preis, Rudolf-Schülke-Stiftung.

Ciesek, Sandra: Präventionspreis, DGMI.

Bitzegeio, Julia: Promotionspreis, Förderverein Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung.

Auszeichnungen

Pfänder, Stephanie: Studienpreis, Novartis-Stiftung

Pietschmann, Thomas: ERC Starting Grant

Weitere Tätigkeiten in der Forschung

Pietschmann, Thomas (Prof. Dr.): Mitherausgeber (Editorial Board member) von *Journal of Virology*, *Journal of Hepatology* und *Hepatology*; Gutachter der DFG, Sander Stiftung, Israel Science Foundation und für verschiedener Fachjournale wie beispielsweise *Nature*, *PLoS Pathogens*, *Gastroenterology*, *Hepatology*, *Journal of Virology* und andere.

Patente

Pietschmann, Thomas, Menzel, Nicolas: Use of Inhibitors of Phospholipase A2 for the Treatment or Prevention of Hepatitis C Infection.