

Für den Inhalt der Artikel sind die Autoren allein verantwortlich.

Ziel dieses Bulletins ist es, Ärzte, Gesundheitsbehörden und Patienten über aktuelle Entwicklungen in der Retrovirus-Forschung zu informieren. Viermal im Jahr wird in kurzer Form der aktuelle Forschungsstand zu verschiedenen Themen wiedergegeben. Für Verbesserungsvorschläge und Anregungen sind wir sehr dankbar.

Die Redaktion

LANGSAM ABER STETIG: DIE ERFOLGE DER FORSCHUNG

FORSCHUNG

- HIV-Impfstoffentwicklung – Silberstreifen am Horizont?
Prof. Dr. Klaus Überla, Bochum
- Die Funktion von Ubiquitin bei der Freisetzung von HIV-1
Dr. Jörg Votteler, Erlangen

KONGRESSBERICHT

- Neuigkeiten vom Humanen T-Zell-Leukämie-Virus (HTLV) – Eindrücke vom HTLV-Weltkongress
Dipl. Mol. Med. Andrea Kreß, Erlangen

Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg



LANGSAM ABER STETIG: DIE ERFOLGE DER FORSCHUNG

EDITORIAL

■ Erfreulicherweise konnten wir Prof. Klaus Überla aus Bochum dafür gewinnen, die kürzlich veröffentlichten Ergebnisse der großen, in Thailand durchgeführten Impfstudie zu kommentieren. Prof. Überla arbeitet selbst seit Jahren an den Grundlagen der Vakzineforschung und ist an mehreren europäischen Verbundprojekten beteiligt.

■ Aus unserem eigenen Haus ist der Beitrag von Dr. Jörg Votteler zur Funktion von Ubiquitin bei der Freisetzung von HIV-1. Herr Votteler ist Post Doc in der Arbeitsgruppe von Prof. Ulrich Schubert, die die Wechselwirkung von Wirtszell- und Virusproteinen auf molekularer Ebene analysiert mit dem Ziel, zelluläre Zielstrukturen für die Therapie der HIV-Infektion zu bestimmen. Im Mittelpunkt stehen dabei die komplexen Prozesse des Zusammenbaus von HI-Viruspartikeln. Der Beitrag zeigt, wie viele Details inzwischen schon erfolgreich analysiert werden konnten. Die im Rahmen dieser Untersuchungen als potentielle Medikamente identifizierten Proteasomeninhibitoren haben bei der Behandlung von Krebserkrankungen (rezidivierendes multiples Myelom) bereits Eingang in die klinische Anwendung gefunden. Bei der Behandlung von HIV ist jedoch noch weitere Grundlagen-Forschung notwendig, wie Herr Votteler dies recht anschaulich erläutert.

■ Im letzten Beitrag dieser Ausgabe fasst Andrea Kreß Neuigkeiten vom HTLV-Weltkongress zusammen. Forschungsarbeiten zum Humanen T-Zell-Leukämie-Virus, darunter auch die Arbeiten von Frau Kreß, wurden bei uns im Haus von Prof. Ralph Grassmann betreut, der leider im Juli letzten Jahres verstorben ist. Beim erwähnten Weltkongress wurde ein Forschungspreis nach Prof. Grassmann benannt, was eine nachträgliche Anerkennung seiner Arbeit und seiner Person ist. Auch wenn die meisten unserer Leser aus dem HIV-Umfeld kommen, so mag es doch für viele auch interessant sein, welche Fortschritte bei der Behandlung der Adulten T-Zell-Leukämie und der HTLV-1-assoziierten Myelopathie/Tropische Spastische Paraparese (HAM/TSP) gemacht werden konnten.

■ **In eigener Sache:** Wir möchte hier nochmals auf die Möglichkeit hinweisen, das Retrovirus-Bulletin online zu abonnieren. Als Online-Abonnent bekommen Sie nach Fertigstellung eine pdf-Datei zugeschickt, die meist ein bis zwei Wochen vor der gedruckten Fassung erscheint. Die An- und Abmeldung erfolgt einfach über ein Fenster auf unserer Homepage: <http://www.virologie.uni-erlangen.de/bulletin/bulletin.htm>

Wir wünschen unsern Lesern eine besinnliche Adventszeit und einen guten Rutsch ins neue Jahr. Über Anregungen und Vorschläge würden wir uns freuen.

Das Redaktionsteam



Traumstrand Brasiliens –
in Salvador fand der
HTLV-Weltkongress 2009 statt (S. 6).

HIV-Impfstoffentwicklung – Silberstreifen am Horizont?

Zu den Schwierigkeiten bei der HIV-Impfstoffentwicklung zählen auch die lange Dauer und die hohen Kosten der klinischen Wirksamkeitsprüfungen. Dies hat dazu geführt, dass bisher nur drei Impfstrategien in großen klinischen Studien auf ihre Wirksamkeit hin überprüft wurden. Dabei zeigten weder ein rekombinanter HIV-gp120-Oberflächen-Protein-Impfstoff (AIDSVAX) noch ein adenoviraler Vektorimpfstoff Hinweise auf eine Wirksamkeit (Flynn et al., *J Infect Dis* 2005, Buchbinder et al., *Lancet* 2008). Die fehlende Wirksamkeit der AIDSVAX-Impfung wurde darauf zurückgeführt, dass der Impfstoff keine neutralisierenden Antikörper induziert. Der adenovirale Vektorimpfstoff enthielt keine Env-Komponente, induzierte aber zytotoxische T-Zellantworten, die jedoch offensichtlich keinen Schutz vermittelten. Die dritte Wirksamkeitsstudie, deren Ergebnisse nun vorliegen (Rerks-Ngarm et al., *N Engl J Med* 2009), verfolgte die Strategie, gleichzeitig zelluläre Immunantworten und Antikörperantworten zu induzieren. Dazu wurde viermal mit einem Vogelpockenvirus-Vektor (ALVAC) gegen Gag, die Protease und Env immunisiert und bei den letzten beiden Immunisierungen noch zusätzlich der AIDSVAX-Impfstoff verabreicht.

Ergebnisse der thailändischen Studie

Bei den 8197 in Thailand geimpften Studienteilnehmern traten in den ersten drei Jahren nach Impfung 51 HIV-Infektionen auf, während in der 8198 Personen umfassenden Placebo-Gruppe 74 Infektionen beobachtet wurden. Diese Reduktion der Infektionsrate um 31,2% ist zwar statistisch gerade signifikant ($p = 0,04$), der 95%ige Vertrauensbereich (Konfidenzintervall) von 1,1% bis 51,2% zeigt aber auch, dass die Wirksamkeit möglicherweise nur marginal ist. Die diesen Zahlen zugrunde liegende *modified intention to treat*-Analyse war vor Auswertung der Studie im statistischen Analysenplan vorgesehen und schließt 7 Teilnehmer aus, die **nach** der Randomisierung, aber **vor** der Gabe der ersten Impfdosis eine HIV-Infektion erwarben. Dies ist von Bedeutung, da die *intention to treat*-Analyse, die alle randomisierten Studienteilnehmer umfasst, zwar auch eine ähnliche Reduktion der Infektionsrate (26,4%) zeigte, aber statistisch nicht signifikant war. Die *per protocol*-Analyse, bei der ca. 25% der randomisierten Studienteilnehmer ausgeschlossen wurden, da sie nicht an allen Impfzeitpunkten innerhalb der dafür vorgesehenen Zeitspanne teilnahmen, ergab eine 26,2%ige Reduktion der HIV-Infektionsrate, ohne statistisches Signifikanz-Niveau zu erreichen. Da die verschiedenen Auswertungen alle eine ähnliche Verminderung der Infektionsrate



Thailand: 610 000 HIV-Infizierte. Prävalenz bei Erwachsenen (15 bis 49 Jahre): 1,4%
Quelle: UNAIDS/UNICEF/WHO, 2008

zeigen, ist eine Wirksamkeit der Impfung sehr viel wahrscheinlicher als deren Unwirksamkeit, auch wenn sich nicht für alle Auswertungen eine statistische Signifikanz ergibt. Eine Bestätigung der Ergebnisse ist jedoch erforderlich. Da auch die Stärke der Wirksamkeit nur begrenzt ist, hat eine solche Impfstrategie die Marktreife noch längst nicht erreicht. Trotzdem sind die Konsequenzen dieser Studie für die HIV-Impfstoffentwicklung beträchtlich, da neue Erkenntnisse über die Mechanismen des Impfschutzes gewonnen, möglicherweise falsche Schlussfolgerungen zu den Korrelaten des Impfschutzes revidiert und die HIV-Impfstoffe gezielter verbessert werden können.

Korrelate des Impfschutzes

Der Vergleich der Immunantworten, die durch die wahrscheinlich schützende ALVAC/AIDSVAX-Immunisierung induziert wurden, mit den Immunantworten, die durch AIDSVAX alleine oder die adenovirale Vektorimmunisierung erzielt wurden, erlaubt es, erstmalig Korrelate eines HIV-Impfschutzes beim Menschen zu identifizieren. Dabei ist es wichtig, zwischen zwei Arten des Impfschutzes zu unterscheiden. Es kann entweder die Infektion

komplett verhindert werden (Schutz vor Infektion), was sich in den klinischen Studien durch eine reduzierte Serokonversionsrate der Vakzingrouppe bemerkbar macht. Alternativ kann durch eine Impfung der Infektionsverlauf abgemildert werden (Schutz vor Erkrankung). Dabei dient eine Reduktion der frühen viralen RNA-Belastung bei den Infizierten der Vakzingrouppe als Surrogatmarker. Die adenovirale Vektorimmunisierung reduzierte weder die Infektionsrate noch beeinflusste sie den Infektionsverlauf. Da die adenovirale Vektorimmunisierung die mit Abstand stärksten zytotoxischen T-Zellantworten induziert, scheint die zytotoxische T-Zellantwort alleine nicht für einen Impfschutz auszureichen. In der thailändischen Studie führte die ALVAC/AIDSVAX-Impfung zu einer Reduktion der Infektionen, nicht aber zu einer Reduktion der frühen Virusbelastung. Dies deutet darauf hin, dass für den Schutz vor Infektion andere Mechanismen zum Tragen kommen als für die Reduktion der Virusbelastung nach bereits erfolgter Infektion.

Die AIDSVAX-Immunisierung alleine verhinderte die HIV-Infektion nicht. Die ALVAC/AIDSVAX-Kombinationsimpfung führte im Vergleich zur Immunisierung mit den Einzel-

komponenten zu einer verstärkten Antigen-spezifischen Proliferationsantwort von Lymphozyten, zu qualitativen Unterschieden in den CD4⁺-T-Zellantworten, und zur Induktion Antikörper-abhängiger zellulärer Zytotoxizität (ADCC) (McNeil et al., Science 2004). Die zytotoxischen T-Zellantworten waren jedoch deutlich geringer als nach adenoviraler Vektorimmunisierung. Als Korrelate des Schutzes vor einer HIV-Infektion sind daher am ehesten CD4⁺-T-Zellantworten und ADCC in Betracht zu ziehen. Die Beobachtung, dass die ALVAC/AIDSVAC-Immunsierung vor Infektion schützt, nicht aber den Infektionsverlauf beeinflusst, falls der Schutz vor Infektion durchbrochen wird, ist mit einem Antikörper-vermittelten Schutz in Einklang zu bringen. Die geringe genetische Variabilität früher Virusisolate und die auf eine Einzexposition bezogene geringe Übertragungsrate von HIV sprechen dafür, dass eine HIV-Infektion häufig auf ein einzelnes Infektionsereignis zurückzuführen ist (Keele et al., Proc Natl Acad Sci USA 2008). Auch bei einer geringen Effizienz könnten Antikörper gegen Env insbesondere in der exponierten Schleimhaut die Infektion durch das einzelne, zur Infektion führende Viruspartikel komplett verhindern, während die nachfolgende Ausbreitung der Viren durch Antikörper nur marginal verzögert wird.

Konsequenzen aus der thailändischen Studie

Für die meisten HIV-Vakzin-Forscher, den Autor eingeschlossen, war das Ergebnis der ALVAC/AIDSVAX-Studie unerwartet. Dies wird besonders deutlich an einem, zu Beginn der Studie im Jahr 2004 in der Zeitschrift Science veröffentlichten Kommentar führender HIV-Forscher, in dem bezweifelt wird, dass die ALVAC/AIDSVAX-Immunsierung auch nur annähernd Immunantworten induziert, die zu einem Impfschutz führen könnten (Burton et al., Science 2004). Als Argument wurde angeführt, dass ALVAC wenig immunogen ist und es keine Hinweise gibt, dass die Kombination aus ALVAC und AIDSVAX die zytotoxische T-Zellantwort oder die neutralisie-

rende Antikörperantwort im Vergleich zu den Einzel-Impfstoffen verstärkt. Implizit geht diese Argumentation davon aus, dass ein Impfschutz vor der HIV-Infektion oder Progression nur über zytotoxische T-Zellen und/oder neutralisierende Antikörper zu erzielen ist.

- Muss diese Annahme nach der thailändischen Studie in Frage gestellt werden?
- Könnte es sein, dass der Schutz vor der HIV-Infektion in der thailändischen Studie auf nicht-neutralisierende Antikörper in der exponierten Schleimhaut zurückzuführen ist?
- Sind die Ergebnisse der thailändischen Studie, die überwiegend Personen mit niedrigen HIV-Infektionsrisiko einschloss, auf Hochrisikogruppen übertragbar?
- Warum haben Impf- und Challengeversuche mit vergleichbarer Immunisierungsstrategie im Tiermodell nicht Hinweise auf eine Schutzwirkung der Impfung gezeigt?

Dies sind nur einige der vielen Fragen, die sich nun stellen. Zumindest für die letzte zeichnet sich eine Antwort ab. Bei den meisten Impfstudien im Primatenmodell wurde die Schutzwirkung der Impfung mit einer hohen Inokulationsdosis des sog. »Challenge-Virus« auf ihre Wirksamkeit hin untersucht. Selbst ein Impfstoff, der eine 90%ige Wirksamkeit aufweist, würde eine Infektion nicht verhindern, wenn das Challenge-Virus mit mehr als 10 Tier-infektiösen Dosen verabreicht wird. Ein niedrig-dosiertes Challenge-Experiment, bei dem die Tiere wiederholt einer geringeren Virusmenge ausgesetzt wurden, zeigte, dass ein neutralisierender monoklonaler Antikörper bereits in sehr niedriger Konzentration vor einer Infektion schützt (Hessell et al., Nat Med 2009), obwohl der Einfluss des Antikörpers auf die Virusbelastung nach erfolgter Infektion nur marginal ist (Parren et al., J Virol 2001). Die wiederholte Exposition nach Impfung mit niedrigen Infektionsdosen scheint

eher die natürliche Situation wiederzuspiegeln und stellt daher ein interessantes Tiermodell dar, um einige der aufgeworfenen Fragen anzugehen und die Impfstoffe gezielter zu verbessern. Die thailändische Studie belegt aber auch, wie unsicher auf Korrelaten des Impfschutzes beruhende Annahmen sind und wie wichtig Wirksamkeitsstudien beim Menschen – selbst wenn diesen von den gerade dominierenden wissenschaftlichen Meinungsführern keine Aussicht auf Erfolg eingeräumt wird.



Prof. Dr. med. Klaus Überla
Ruhr-Universität Bochum,
Abteilung für Molekulare und Medizinische Virologie

klaus.ueberla@ruhr-uni-bochum.de

Literaturhinweise

Flynn NM, Forthal DN, Harro CD, Judson FN, Mayer KH, Para MF: Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. *J Infect Dis* 2005, 191: 654-665.

Buchbinder SP, Mehrotra DV, Duerr A, Fitzgerald DW, Mogg R, Li D et al.: Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *Lancet* 2008, 372: 1881-1893.

Reks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, Paris R et al.: Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to Prevent HIV-1 Infection in Thailand. *N Engl J Med* 2009.

McNeil JG, Johnston MI, Bix DL, Tramont EC: Policy rebuttal. HIV vaccine trial justified. *Science* 2004, 303: 961.

Keele BF, Giorgi EE, Salazar-Gonzalez JF, Decker JM, Pham KT, Salazar MG et al.: Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, 105: 7552-7557.

Burton DR, Desrosiers RC, Doms RW, Feinberg MB, Gallo RC, Hahn B et al.: Public health. A sound rationale needed for phase III HIV-1 vaccine trials. *Science* 2004, 303: 316.

Hessell AJ, Poignard P, Hunter M, Hangartner L, Tehrani DM, Bleeker WK et al.: Effective, low-titer antibody protection against low-dose repeated mucosal SHIV challenge in macaques. *Nat Med* 2009, 15: 951-954.

Parren PW, Marx PA, Hessell AJ, Luckay A, Haurouse J, Cheng-Mayer C et al.: Antibody protects macaques against vaginal challenge with a pathogenic R5 simian/human immunodeficiency virus at serum levels giving complete neutralization in vitro. *J Virol* 2001, 75: 8340-8347.

Der Weg zu einem wirksamen Impfstoff gegen HIV ist noch weit.



Die Funktion von Ubiquitin bei der Freisetzung von HIV-1

■ HIV-1 ist – wie alle Viren – ein intrazellulärer Parasit, welcher für seine Replikation die Interaktion mit verschiedenen zellulären Proteinen benötigt. In vielen Stadien des viralen Replikationszyklus spielen dabei auch Faktoren aus dem Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) eine entscheidende Rolle.

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Anfang der 1980er Jahre wurde ein hochkomplexes System zur Degradation von Proteinen entdeckt, welches heute als UPS bekannt ist. Über 90% aller intrazellulären Proteine in eukaryotischen Zellen werden durch das UPS modifiziert und prozessiert. Auf diesem Weg können Funktion, Lokalisation und Halbwertszeit verschiedener Proteine selektiv gesteuert werden. Somit stellt das UPS eine zentrale Regulationseinheit der Zelle dar, für dessen Entdeckung 2004 die beiden israelischen Forscher Avram Hershko und Aaron Ciechanover sowie der US-Amerikaner Irvin Rose den Nobelpreis für Chemie erhielten.

■ Die proteolytisch aktive Komponente des UPS bildet das 26S-Proteasom, ein Multienzymkomplex, bestehend aus der proteolytisch aktiven 20S- und zwei regulatorischen 19S-Untereinheiten, die ihrerseits wieder aus mehreren Proteinen zusammengesetzt sind. Im Gegensatz zu dem zweiten proteolytischen System eukaryotischer Zellen, den bereits in den 1950er Jahren entdeckten lysosomalen Proteasen, befinden sich Proteasomen nicht in membranumhüllten Zellkompartimenten, sondern sind in Zytoplasma und Zellkern verteilt.

■ Proteine werden durch eine kovalente Anheftung von Ubiquitin (Ub) für den Abbau durch das Proteasom markiert. Ub ist ein globuläres Protein, welches aus 76 Aminosäuren besteht und in eukaryotischen Zellen hoch konserviert ist. So unterscheiden sich das Ub einer humanen Zelle und das einer Hefe in nur 3 Aminosäuren. Über den C-terminalen Aminosäurerest Glycin wird Ub in einem schrittweisen Prozess, der sogenannten Ubiquitinierung (auch Ubiquitylierung genannt), kovalent an ein Lysin im Zielprotein gebunden (Abb. 1). Durch die Anheftung weiterer Ub-Einheiten über die internen Lysine eines bereits gebundenen Ub kann eine Ub-Kette an dem jeweiligen Zielprotein gebildet werden. Insgesamt enthält Ub sieben Lysine, daher sind verschiedene Arten der Bildung einer Ub-Kette möglich, insbesondere über die Lysine an Position 48 und 63.

■ Im ersten Schritt der Ubiquitinierung wird das Ub durch ein Ub-aktivierendes Enzym E1 aktiviert. Daraufhin wird es an ein Ub-konjugierendes Enzym E2 transferiert. Der finale Schritt schließlich, die Isopeptidbindung zwischen dem Gly⁷⁶ des Ub und der ε-Amino-gruppe eines Lysins des Zielproteins, wird von

den E3-Ub-Ligasen katalysiert. Diese große Gruppe von Enzymen wird in zwei strukturell verschiedene Klassen eingeteilt, den sogenannten HECT (*homology to E6AP C-terminus*) E3-Ligasen und den RING (*really interesting new gene*)-Finger E3-Ligasen (Abb. 1).

■ Die Markierung eines Proteins durch Ub kann je nach Art der Ubiquitinierung eine Reihe von Prozessen auslösen. In der ursprünglich zuerst entdeckten Form der Ubiquitinierung werden die Ub-Ketten über das Lys⁴⁸ in Ub verknüpft. Hat die wachsende Ub-Kette mindestens vier Moleküle erreicht, führt dies zur Degradation des Proteins durch das Proteasom. Noch während der Proteolyse durch das Proteasom wird das Ub durch eine Gruppe von Cystein-Proteasen, die sogenannten Ub-Hydrolasen, wieder abgespalten und recycelt.

■ Ub ist jedoch nicht nur am Abbau von Proteinen beteiligt, es spielt auch bei anderen Vorgängen in der Zelle eine wichtige Rolle. Monoubiquitinierung, d. h. das Anfügen von

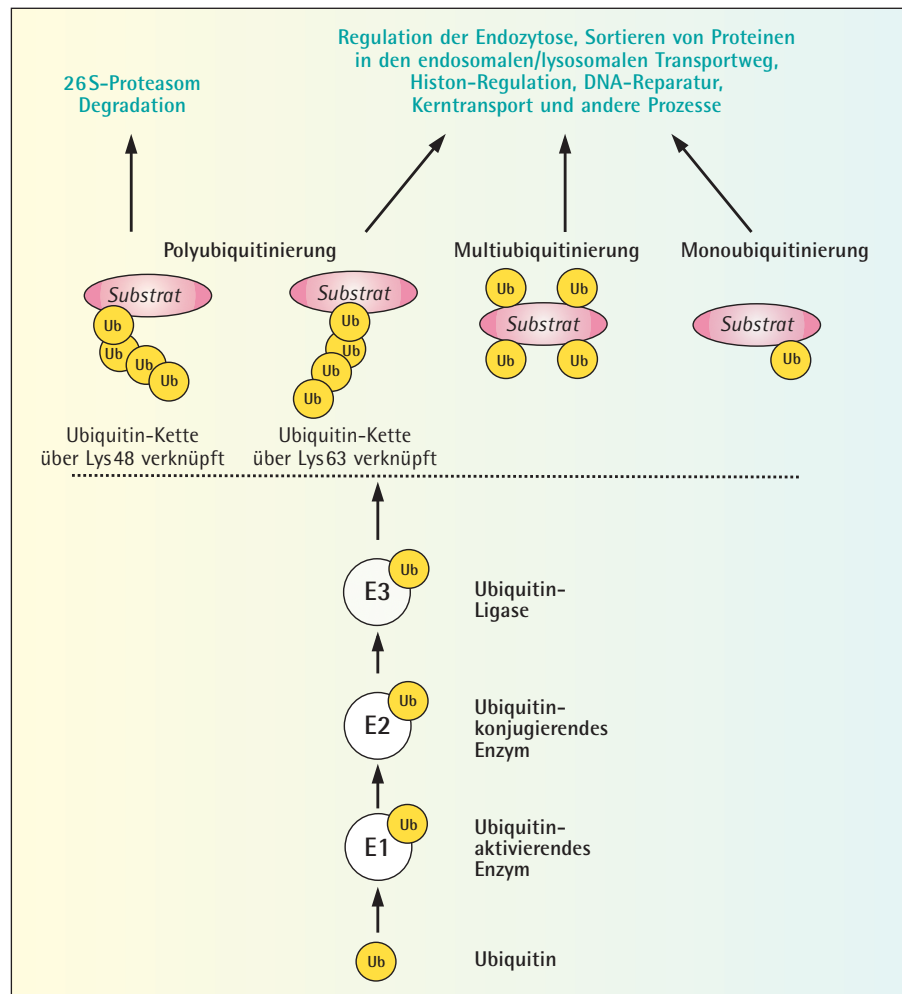
einzelnen Ub-Molekülen an ein oder mehrere Lysine des Ziel-Proteins, reguliert unter anderem den Proteintransport innerhalb einer Zelle, insbesondere bei Endo- und Exozytose von Rezeptoren (Abb. 1). Auch Polyubiquitin-ketten, die über Lys⁶³ in Ub verknüpft sind, regulieren verschiedenste Prozesse wie Phosphorylierung oder Endozytose (Abb. 1).

■ Aufgrund der Fülle von Funktionen, die Ub als Signalpeptid in der Zelle ausübt, verwundert es nicht, dass sowohl das spezifische Anknüpfen von Ub an ein Protein als auch dessen hydrolytische Abspaltung vom jeweiligen Zielprotein durch ein hochkomplexes Netzwerk reguliert wird und eine ganze Reihe von Faktoren das UPS beeinflussen und kontrollieren.

UPS reguliert die Freisetzung von HIV-1

Insbesondere bei der Freisetzung und Reifung viraler Partikel an der Plasmamembran sind Faktoren aus dem UPS von entscheidender Bedeutung (Martin-Serrano, Traffic 2007; Votte-

Abb. 1: Mechanismus und Arten der Ubiquitinierung.



ler et al., Expert Opin Ther Targets, 2008). Ausgehend von Beobachtungen aus dem Jahr 2000, dass Proteasominhibitoren die Freisetzung und Reifung von HIV-1 behindern, wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl von zellulären Proteinen aus dem UPS identifiziert, die für die Virusfreisetzung wichtig sind. Als erster dieser Faktoren wurde 2001 Tsg101 (*tumor susceptibility gene 101*) als Regulator für die Freisetzung von HIV-1 beschrieben (Abb. 2) (Garrus et al., Cell 2001; Martin-Serrano et al., Nat Med 2001; VerPlank et al., Proc Natl Acad Sci USA 2001). Tsg101 besitzt, obwohl es strukturell einem E2-Ub konjugierenden Enzym ähnlich ist, selbst keine enzymatische Aktivität, da das entscheidende Cystein im aktiven Zentrum fehlt. Tsg101 ist ein Teil des sogenannten ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*), einem Multiproteinkomplex, welcher aus insgesamt fünf Komponenten besteht: ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III und Vps-Vta 1. Zusammen mit anderen Proteinen bildet Tsg101 den ESCRT-I. ESCRTs sind hoch konserviert, von *Archae* bis zu Säugetieren, und katalysieren die Abschnürung von Membraneinstülpungen, die bei finalen Schritten der Zellteilung und der Bildung von intraluminalem Vesikeln in Endosomen (auch *multivesicular bodies*, MVBs genannt) entstehen. Folglich regulieren ESCRTs die Sortierung von Oberflächenrezeptoren, die über MVBs zur Degradation in Lysosomen transportiert werden sollen. Dabei ist Ub das wichtigste molekulare Signal zur Markierung von Proteinen für den Transport durch ESCRTs (Hurley 2008).

Die Interaktion mit ESCRT-Proteinen ist essentiell für eine effiziente Freisetzung von HIV-1 Virionen von der Zelloberfläche (Abb. 2). Wird diese Interaktion unterbunden, wird die Abschnürung der Membran zwischen den sich bildenden Virionen und der Zelle verhindert, wodurch die Virionen an der Zellmembran »kleben« bleiben. Die p6-Region des HIV-1-Gag-Polyproteins rekrutiert dafür ESCRT-Komponenten durch zwei sog. L-Domänen (L: *late budding*; *budding*: dt. Knospenbildung). Das wichtigste Motiv bei HIV-1 ist dabei die PTAP-Sequenz, welche mit Tsg101 interagiert. Zusätzlich dazu befindet sich in p6 noch ein YPX_nL-Motiv, das als sog. sekundäre L-Domäne mit dem ESCRT-assoziierten Protein ALIX (*ALG-2 interacting protein X*) interagiert (Abb. 2). Diese sekundäre L-Domäne hat jedoch, solange die PTAP-L-Domäne aktiv ist, nur einen geringen Einfluss auf die Freisetzung von HIV-1 (Strack et al., Cell 2003; Fisher et al., Cell 2007).

Welche Rolle spielt Ubiquitin?

Ub dient als Erkennungssignal für ESCRTs, und bereits vor fast 20 Jahren wurde freies Ub in Virionen verschiedener Retroviren entdeckt, darunter HIV-1. Im Vergleich zur Wirtszelle liegt Ub in Virionen in etwa fünffach höherer Konzentration vor, allerdings sind Funktion und Herkunft dieses freien Ub bis heute unbekannt. Schon vor Jahren wurden monoubiquitinierte Formen von HIV-1 p6 identifiziert,

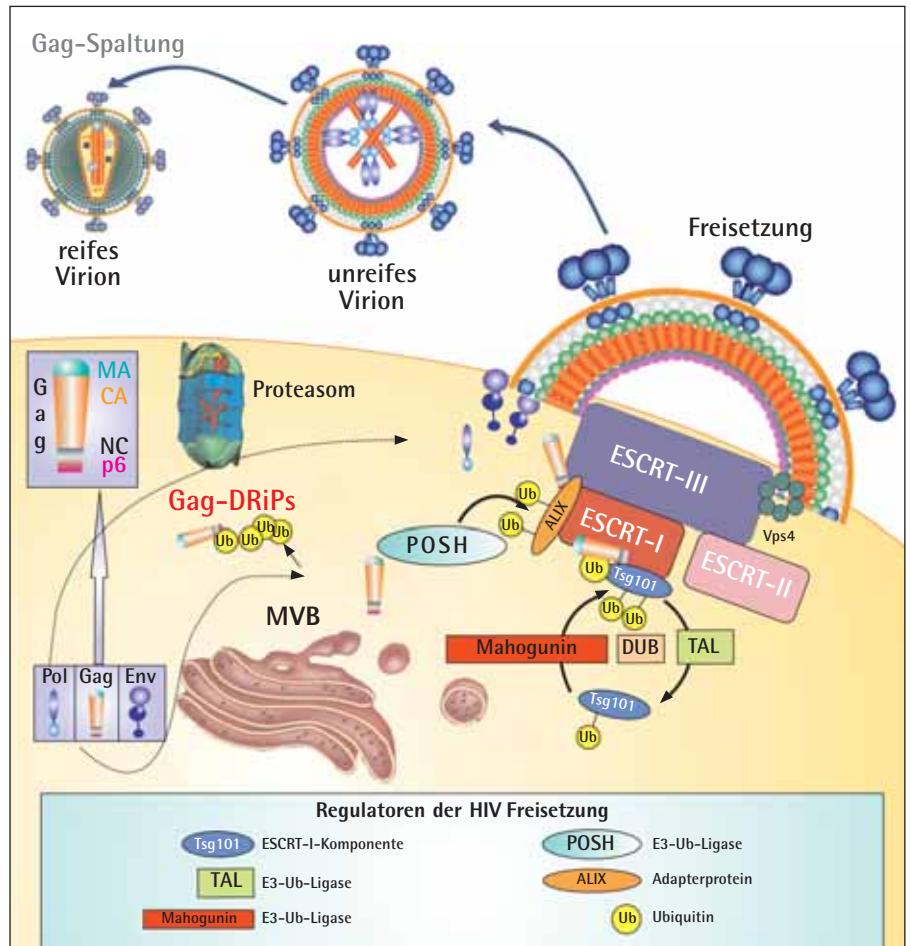


Abb.2: ESCRTs und Ubiquitin-Ligasen regulieren die Freisetzung von HIV-1. Über die L-Domänen in p6 rekrutiert HIV-1 Komponenten ESCRTs und ermöglicht so die Freisetzung von HIV-1. Drei E3-Ligasen wurden bereits identifiziert, welche zumindest indirekt die Freisetzung von HIV-1 regulieren: TAL und Mahogunin ubiquitinieren Tsg101 und regulieren dessen Aktivität, und POSH, welches ALIX ubiquitiniert.

und jüngste Studien zeigen, dass auch andere Domänen von Gag ubiquitiniert werden (Gottwein et al., J Virol 2005). Dabei scheint die Ubiquitinierung von HIV-1 Gag mit dessen Multimerisierung und Anheftung an der Plasmamembran assoziiert zu sein (Jäger et al., J Virol 2007). Jedoch konnte bislang kein direkter Zusammenhang zwischen der Ubiquitinierung von Gag und der ESCRT-Funktion bei der HIV-1 Freisetzung nachgewiesen werden.

Bei anderen Retroviren, wie dem murinen Leukämie-Virus (MuLV), wird die Freisetzung über eine PPXY-Typ L-Domäne reguliert, wodurch E3-Ub-Ligasen aus der sogenannten NEDD4-Familie rekrutiert werden. Diese induzieren die Ubiquitinierung von MuLV Gag und ermöglichen so die Virusfreisetzung. Einige NEDD4-Ligasen, speziell NEDD4L, interagieren auch mit HIV-1-Gag, haben jedoch, solange die PTAP-L-Domäne aktiv ist, keinen nennenswerten Einfluss auf die Freisetzung von HIV-1. Im Gegensatz dazu wird von der HIV-1-PTAP-L-Domäne selbst nur Tsg101 rekrutiert, ein Protein, das für sich genommen keine enzymatische Aktivität besitzt. Darüber hinaus korreliert die unterstützende Funktion der PTAP und YPX_nL L-Domänen Motive bei der Virusfreisetzung mit einem verminderten Le-

vel an ubiquitinierten Gag. Somit bleibt sowohl die Rolle von Ub als auch die der Ubiquitinierung von HIV-1-Gag im Zusammenhang mit der Virusfreisetzung weiter rätselhaft.

UPS als möglicher Angriffspunkt für Therapien?

In Anbetracht der zentralen Bedeutung des UPS für den Zellmetabolismus stellte sich schon früh die Frage, ob sich das UPS zu Therapiezwecken nutzen lässt. Jedoch kam erst 2003 mit dem Proteasominhibitor Bortezomib (Velcade™) das erste Medikament aus diesem Sektor auf den Markt. Velcade™ wird seit erfolgreich zur Behandlung von rezidivierenden multiplen Myelomen eingesetzt und ist seit kurzem auch für die Primärtherapie dieser ansonsten schwer zu behandelnden Krebserkrankung zugelassen. Studien hinsichtlich der Wirksamkeit von Velcade™ auf weitere Krankheiten wie Leukämien, Hodgkin und non-Hodgkin Lymphome oder sogar Autoimmunerkrankungen sind zum Teil sehr vielversprechend. Diese Substanz zeigte zum ersten Mal, dass das UPS auch für Therapiezwecke nutzbar gemacht werden kann und ebnete den Weg für eine ganz neue Klasse von Medikamenten (Adams et al., Cancer Invest 2004).

■ Jedoch sind die beobachteten Nebenwirkungen der Therapie beträchtlich, und so wird auch weiter an der Entwicklung neuer Substanzen geforscht. In diesem Zusammenhang rücken seit Jahren Faktoren des UPS, insbesondere die E3-Ligasen, in den Mittelpunkt der Forschung. E3-Ligasen sind hochspezifisch hinsichtlich ihrer Substrate, und schon über 500 dieser Enzyme wurden identifiziert. Darüber hinaus bieten auch die bereits über 80 bekannten Ub-Hydrolasen spezifische Angriffspunkte für neuartige Therapien. Durch die hohe Spezifität dieser Enzyme für bestimmte Proteine sollte eine gezielte Inhibition eines dieser Enzyme eine hohe Selektivität der Wirkung sowie geringe Nebenwirkungen aufweisen.

■ Aufgrund der Tatsache, dass eine HIV-1-Infektion zwar therapiert, aber gegenwärtig nicht geheilt werden kann, bleibt HIV-1 eines der interessantesten Ziele hinsichtlich der Entwicklung neuartiger Therapeutika. In verschiedensten Stadien wirken Enzyme des UPS auf die Virusreplikation ein, und es ist gut möglich, dass noch einige unentdeckte Faktoren in den nächsten Jahren dazukommen. Das Blockieren des Proteasoms hat eine Reihe antiviraler Effekte: Zusätzlich zu der bereits erwähnten Inhibition der Freisetzung von Virionen von der Oberfläche verhindert die Hemmung des Proteasoms den von HIV-1-Proteinen induzierten Abbau von mindestens zwei antiviral wirkenden Faktoren der Wirtszelle: APOBEC3G und CD-317 (auch bekannt als Tetherin). Medikamente gegen das UPS, insbesondere gegen spezifische E3-Ligasen,

könnten eine Ergänzung der gegenwärtigen anti-retroviralen Therapie sein. Jedoch muss dafür noch die größte Barriere überwunden werden: Derzeit gibt es noch keine Strategie, mit der man E3-Ligasen spezifisch hemmen kann, da der enzymatische Mechanismus dieser Enzyme nach wie vor nicht vollständig aufgeklärt ist. Darüber hinaus besitzen insbesondere RING-Finger-E3-Ligasen kein enzymatisch aktives Zentrum im klassischen Sinn, sondern üben ihre katalytische Funktion dadurch aus, dass sie wie ein Gerüst die Reaktionspartner – Ub, gebunden an E2 und das Zielprotein, – in räumliche Nähe bringen. Das erfordert eine spezifische Protein-Protein-Interaktion zwischen der E3-Ligase und den Reaktionspartnern, und diese Interaktionen sind schwer mit Inhibitoren zu blockieren.



Dr. Jörg Votteler
Virologisches Institut,
Nationales Referenzzentrum für Retroviren,
Universitätsklinikum Erlangen
joerg.votteler@viro.med.uni-erlangen.de

Literatur

Adams, J. and M. Kauffman. Development of the proteasome inhibitor Velcade (Bortezomib). *Cancer Invest* 2004; 22(2): 304-11.

Fisher, RD. et al., Structural and biochemical studies of ALIX/AIP1 and its role in retrovirus budding. *Cell* 2007;128(5): 841-52.

Garrus, JE. et al., Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* 2001; 107(1): 55-65.

Gottwein, E. et al, Analysis of human immunodeficiency virus type 1 Gag ubiquitination. *J Virol* 2005; 79(14): 9134-44.

Hurley, J. H., ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Curr Opin Cell Biol* 2008; 20(1): 4-11.

Jäger, SE. et al, Ubiquitination of human immunodeficiency virus type 1 Gag is highly dependent on Gag membrane association. *J Virol* 2007; 81(17): 9193-201.

Martin-Serrano, J., The Role of Ubiquitin in Retroviral Egress. *Traffic* 2007; 8(10): 1297-1303.

Martin-Serrano, J. et al, HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat Med* 2001; 7(12): 1313-9.

Strack, B. et al, AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell* 2003; 114(6): 689-99.

VerPlank, et al, Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55Gag. 2001; *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(14): 7724-9.

Votteler, J. Ubiquitin ligases as therapeutic targets in HIV-1 infection. *Expert Opin Ther Targets* 2008; 12(2): 131-43.

KONGRESSBERICHT

Neuigkeiten vom Humanen T-Zell-Leukämie Virus (HTLV) – Eindrücke vom HTLV-Weltkongress

■ Vom 1. bis 4. Juli 2009 fand der HTLV-Weltkongress, die »14th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and related retroviruses«, unter der Sonne Brasiliens in Salvador im Bundesstaat Bahia statt. Knapp 300 Wissenschaftler und Ärzte fanden sich bei tropischen Temperaturen vor einer atemberaubenden Kulisse an der Küste Brasiliens ein, um die neuesten Forschungsergebnisse rund um HTLV in 75 Vorträgen und ca. 200 Postern auszutauschen. Unter der Schirmherrschaft des Brasilianers Carlos Brites wurde der Kongress von der »International Retrovirus Association« ausgerichtet.

Brady-Grassmann-Harrington-Preis

Zu Beginn wurde in »Memorial Lectures« der verstorbenen HTLV-Forscher Bill Harrington

(Miller School of Medicine, University of Miami, USA), Ralph Grassmann (Virologisches Institut – Klinische und Molekulare Virologie, Universitätsklinikum Erlangen) und John Brady (NIH, Bethesda, USA) gedacht. Im Gedenken an die Verstorbenen wurde der »HTLV Retrovirology Prize«, welcher jedes zweite Jahr verliehen wird, in »Brady-Grassmann-Harrington Prize« umbenannt und an Carlos Brites (Federal University of Bahia, Salvador, Brasilien) in Anerkennung seiner wissenschaftlichen Leistungen verliehen. Im Anschluss daran begann das wissenschaftliche Programm, das eine Vielzahl von Forschungsrichtungen beinhaltete. Im folgenden Beitrag sollen dabei nach einer kurzen Einführung in HTLV-1 die Schwerpunkte auf Therapie, Pathogenese und Epidemiologie gelegt werden.

Was ist HTLV-1?

HTLV-1, das Humane T-Zell-Leukämie-Virus Typ 1, ist ein Retrovirus, das im Menschen eine Krebserkrankung auslösen kann. Nach Infektion von CD4⁺-T-Lymphozyten und jahrzehntelanger Persistenz des Virus entwickeln ca. 5 % der Infizierten eine aggressive Leukämie, die Adulte T-Zell-Leukämie/Lymphom (ATLL). Aufgrund ausgeprägter Resistenz gegenüber konventioneller Chemotherapie verläuft diese meist rasch letal. Neben der Leukämie können mit einer HTLV-1-Infektion eine Vielzahl weiterer Erkrankungen assoziiert sein (Proietti et al., *Oncogene* 2005), wobei vor allem die HTLV-1-assoziierte Myelopathie/Tropische Spastische Paraparese (HAM/TSP), eine neurodegenerative Entzündung des Rückenmarks, in ca. 3 % der Infizierten auftritt. Welt-

weit sind 15 bis 20 Millionen Menschen mit HTLV-1 infiziert, die Endemiegebiete liegen in Japan, der Karibik, Teilen Afrikas sowie Südamerika. Über die Virusprävalenz in Deutschland gibt es keine genauen Angaben, Schätzungen gehen von ca. 6000 Infizierten aus.

Therapeutische Perspektiven bei der ATLL

Fortschritte in der ATLL-Therapie stellte Olivier Hermine (Paris, Frankreich) vor. Eine Metaanalyse publizierter Daten zu Therapieverläufen kam zu dem Schluss, dass eine Kombinationstherapie aus Interferon alpha ($IFN\alpha$) und dem Reverse-Transkriptase-Inhibitor Zidovudin (AZT) als Mittel der ersten Wahl bei akuter, chronischer und schwelender ATLL eingesetzt werden sollte (Tsukasaki et al., J Clin Oncol 2009). Dafür sprechen Ansprech-Raten von 66% und die Tatsache, dass bei akuter ATLL zehn Jahre nach Therapie 82% der Patienten überlebten. Von einer klassischen Che-

motherapie (CHOP) als erstem Therapieansatz wurde bei den genannten ATLL-Typen abgesehen, da die Selektion eines Tumorzellklons mit mutiertem p53 begünstigt werden würde. Beim Lymphom-Typ der ATLL zeigte die antivirale Therapie allerdings nur geringe Effekte, der initiale Einsatz von Chemotherapeutika war hier prognostisch besser.

■ Ali Bazarbachi (Beirut, Libanon) stellte eine Therapieform aus Arsen-Trioxid (As_2O_3) und $IFN\alpha$ vor, die im Mausmodell zum Abbau des viralen Onkoproteins Tax führte. In einer Phase-II-Studie wurde die Wirksamkeit und Sicherheit einer Kombinationstherapie aus As_2O_3 , AZT und $IFN\alpha$ bei zehn chronischen ATLL-Patienten überprüft (Khour et al., Blood 2009). Alle Patienten sprachen auf die Therapie an und die provirale HTLV-1-DNA in den Blutzellen nahm signifikant ab. Langzeitstudien sollen zeigen, ob sich mit dieser Therapie die ATLL heilen lassen könnte.

■ Weitere therapeutische Strategien sind die Suche nach neuen Substanzen, die zur Induktion des programmierten Zelltods (Apoptose) in den Tumorzellen führen (Britta Moens, Löwen, Belgien) sowie der Einsatz des Proteasom-Inhibitors Bortezomib oder die Verwendung von therapeutischen Antikörpern gegen CCR4 (Atae Utsunomiya, Kagoshima, Japan). Auch prognostische Marker, die die Entstehung einer ATLL begünstigen könnten, wurden thematisiert (Adrienne Phillips, New York, USA).

Therapie der HAM/TSP

Die Arbeitsgruppe von Luc Willems (Gembloux, Belgien) konnte in der Vergangenheit im Tiermodell zeigen, dass Valproinsäure (VPA), ein Histon-Deacetylase-Inhibitor, zu einem Anstieg der viralen Genexpression bei bovinem Leukämievirus (BLV), einem nahen Verwandten von HTLV, führte. Dies hatte zur Folge, dass infizierte Zellen verstärkt der Immunantwort durch zytotoxische $CD8^+$ -T-Zellen ausgesetzt waren und es zu einer Abnahme der proviralen Last in BLV-infizierten Schafen kam (Achachi et al., PNAS 2005). Die Effekte von VPA wurden nun in HAM/TSP-Patienten in einer klinischen Studie mit 19 Patienten zwei Jahre lang getestet (Stephane Olindo, Fort-de-France, Martinique). Dabei war der Einsatz von VPA zwar nebenwirkungsarm, nahm aber weder Einfluss auf die zelluläre Immunantwort, noch konnte der Verlauf der HAM/TSP verbessert werden. In Kombination mit AZT führte VPA allerdings zu



Der Brady-Grassmann-Harrington-Preis ging 2009 an den Brasilianer Carlos Brites.

entnommen aus: Willems Retrovirology 2009 6:77 doi:10.1186/1742-4690-6-77



Salvador da Bahia bildete 2009 die Kulisse des HTLV-Weltkongresses

einer Abnahme der proviralen Last in asymptomatischen Pavianen (*Papio papio*), die mit HTLV-1, einem Verwandten von HTLV-1, infiziert waren (Renard Mahieux, Lyon, Frankreich). Dies wurde auf eine CD8⁺-T-Zell-vermittelte Lyse von HTLV-1-infizierten Zellen zurückgeführt. Nach wie vor bleibt aber unklar, ob diese Strategie auch bei HAM/TSP Erfolg haben wird. Als weitere therapeutische Perspektiven wurden auch die Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen CD122, einer Rezeptorkette des Interleukin-2- und Interleukin-15-Rezeptors (Steven Jacobson, Bethesda, USA) sowie der Einsatz des Immunsuppressivums Ciclosporin diskutiert (Fabiola Martin, London, UK).

Neues zur Pathogenese

Neben der HAM/TSP können auch andere neurologische Manifestationen mit einer HTLV-1-Infektion assoziiert sein. Hierzu stellte Edward Murphy (San Francisco, USA) einen neuen Begriff für dieses durch HTLV-1-Infektion hervorgerufene Krankheitsbild vor: NASH (*neurological abnormality short of HAM*). Zeichen von NASH sind u. a. eine Verschlechterung des Gehvermögens, urogenitale Beschwerden sowie Abnormalitäten im Vibrationsempfinden. Zudem wurde von Murphy eine Studie zur Aufklärung der HTLV-2-Pathogenese vorgestellt. Neben HTLV-1 wurden bisher drei weitere Delta-Retroviren entdeckt, HTLV-2, -3 und -4. HTLV-2 wurde erstmals aus einem Patienten mit einer atypischen Haarzell-Leukämie isoliert, konnte aber im Gegensatz zu HTLV-1 kaum mit Leukämie oder anderen Krankheitsbildern in Zusammenhang gebracht werden. Murphy stellte nun eine Langzeit-Studie (18 Jahre) mit 810 nicht-infizierten sowie 160 HTLV-1- und 291 HTLV-2-infizierten Patienten vor, die zeigte, dass bei HTLV-2-Infizierten häufig gesundheitliche Probleme wie Herzerkrankung, Bronchitis, Pneumonie oder sogar Krebs auftraten. So entwickelten z. B. HTLV-2-Infizierte 3,6-mal häufiger eine Krebserkrankung als Nicht-infizierte. Zudem blieben HTLV-2-Infizierte wesentlich häufiger der Arbeit fern als HTLV-1-Infizierte und Gesunde, was darauf hindeutet, dass eine HTLV-2-Infektion schlechten Einfluss auf die Lebensqualität hat. Molekulare Ursachen für diese Beobachtungen sind noch weitgehend unklar.

Epidemiologie

Antoine Gessaine vom Institut Pasteur, Paris, präsentierte epidemiologische Studien zu HTLV-2. Interessanterweise konnten sehr starke genetische Homologien zwischen HTLV-2-Isolaten von afrikanischen Bakola-Pygmäen aus Südkamerun und denen von Indianerstämmen aus Amerika gefunden werden. Diese Befunde unterstützen die These, dass HTLV-2 seinen Ursprung in Zentralafrika hat, aber es werden zugleich Fragen hinsichtlich der Retrovirus-Evolution sowie der Wanderung von Populationen aufgeworfen.

■ Auch zur Epidemiologie von HTLV-1-assoziierten Erkrankungen gab es zahlreiche

Berichte. Auffallend ist, dass in der brasilianischen Region Bahia, dem Austragungsort des Kongresses, außergewöhnlich viele HAM/TSP-Patienten auch eine ATLL entwickelten. Ein Poster von Andrea Mangano (Buenos Aires, Argentinien) zeigte, dass auch im Norden Argentiniens gehäuft Infektionen mit HTLV-1 auftreten, wobei auch dort der Phänotyp einer HAM/TSP mit einer hohen proviralen Last assoziiert war. Aus Peru berichtete Eduardo Gotuzzo (Lima), dass ca. 20 % aller peruanischen HAM/TSP-Patienten einen ungewöhnlich schnellen Verlauf der ansonsten langsam fortschreitenden Erkrankung zeigten.

Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Kongress ein sehr breites Spektrum an wissenschaftlichen Fragestellungen in einer angenehmen Atmosphäre abdeckte. Bei weiterführendem Interesse empfiehlt sich die Lektüre des ausführlichen Kongressberichts von Luc Willems (Willems, *Retrovirology* 2009). In zwei Jahren wird der 15. Internationale HTLV-1-Kongress wieder auf europäischem Boden statt finden. Die belgische Stadt Leuven (Löwen) wird 2011 das Ziel der HTLV-Forscher sein.



Dipl. Mol. Med. Andrea Kress
Virologisches Institut,
Nationales Referenzzentrum für Retroviren,
Universitätsklinikum Erlangen
andrea.kress@viro.med.uni-erlangen.de

Literatur:

Achachi, A. et al., *Valproate activates bovine leukemia virus gene expression, triggers apoptosis, and induces leukemia/lymphoma regression in vivo*. *PNAS*; 2005; 102: 10309–10314.

Khour, G. et al., *Phase 2 study of the efficacy and safety of the combination of arsenic trioxide, interferon alpha, and zidovudine in newly diagnosed chronic adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL)*. *Blood*. 2009; 113: 6528–6532.

Proietti, F. A. et al., *Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases*. *Oncogene*. 2005; 24: 6058–6068.

Tsukasaki, K. et al., *Definition, prognostic factors, treatment, and response criteria of adult T-cell leukemia-lymphoma: a proposal from an international consensus meeting*. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 453–459.

Willems L., *The 14th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and related retroviruses (July 1–4, 2009; Salvador, Brazil)*. *Retrovirology*. 2009; 6: 77



Impressum

Herausgeber: Virologisches Institut
Klinische und Molekulare Virologie

Universitätsklinikum Erlangen

Sprecher des NRZ: Prof. Bernhard Fleckenstein

Stellv. Sprecher des NRZ: Dr. Klaus Korn

Koordinator des NRZ: Dr. Hauke Walter

Schlossgarten 4 · D-91 054 Erlangen

Tel.: 09 131 / 85 - 2 - 40 10

Fax: 09 131 / 85 - 2 - 21 01

E-mail: nrzretro@viro.med.uni-erlangen.de

http://www.virologie.uni-erlangen.de

Redaktion:

Verantwortliche Redakteurin Dr. Monika Gröne

Tel.: 09 131 / 852 57 90

E-mail: magroene@viro.med.uni-erlangen.de

Manuskriptbearbeitung: Dr. Klaus Korn

Grafische Gestaltung:

Grafikstudio Hoffmann, Dresden

Druck: Druckerei Mayer, Erlangen

AUSBLICK AUF DAS NÄCHSTE BULLETIN

- Afrika ohne AIDS – ein Traum?

WIR DANKEN FOLGENDEN FIRMEN FÜR IHRE FREUNDLICHE UNTERSTÜTZUNG

