

Abschlussbericht

des Forschungsprojekts mit Förderung durch die ARGUS-Stiftung, Berlin
(zu Hd. Herrn Prof. Dr. Lode, Geschäftsführer, Postfach 191119 Berlin, 13001 Berlin)

Titel des Projektes

„Funktionsanalyse der Proteinkinase pUL97 des humanen Cytomegalovirus – ein Zielmolekül für neue antivirale Therapieansätze“

Antragsteller

Prof. Dr. Manfred Marschall

Dienststellung: wissenschaftlicher Angestellter, Hochschullehrer

Institution/Dienstadresse:

Virologisches Institut

des Klinikums der Universität Erlangen-Nürnberg,

Klinische und Molekulare Virologie,

Schlossgarten 4, 91054 Erlangen

Tel. (09131) 85-26089

E-mail manfred.marschall@viro.med.uni-erlangen.de

Projekinhalt

Das humane Cytomegalovirus (HCMV) zählt zu den wichtigsten Pathogenen des Menschen (Familie Herpesviridae) und verursacht schwere klinische Symptomatiken bei Personen mit eingeschränktem Immunstatus sowie bei Neugeborenen. Aufgrund von Limitierungen bei den zugelassenen anti-herpesviralen Medikamenten werden neue Medikamente mit verbesserten pharmakologischen Eigenschaften und bisher nicht ausgeschöpften Wirkmechanismen dringend gesucht. Ein neues Zielmolekül für die anti-cytomegalovirale Therapie stellt die virale Proteinkinase pUL97 dar. Diese Serin-/Threonin-Proteinkinase übt eine sehr vielschichtige und wichtige Funktion im Replikationszyklus des HCMV aus. Sie interagiert mit einer Reihe von viralen und zellulären Substratproteinen, welche dadurch phosphoryliert und in ihrer Aktivität hoch- bzw. herunterreguliert werden. Die Effizienz der HCMV-Replikation ist stark von der Funktionalität der Proteinkinase pUL97 abhängig. Die Deletion des UL97-Gens aus dem viralen Genom oder die Inhibition der pUL97-Aktivität führt zu einer Reduktion der HCMV-Replikation um den Faktor 100 bis 1000. Eine Evaluierung der Proteinkinase pUL97 als effektives antivirales Target ist bereits vor einiger Zeit erfolgt. Proteinkinase-Inhibitoren aus unterschiedlichen chemischen Klassen haben sich als geeignete Inhibitoren der pUL97-Aktivität und demzufolge als wirksame Blocker der HCMV-Replikation erwiesen. Generell ist bei klassischen Proteinkinase-Inhibitoren eine kritische Einschränkung dadurch gegeben, dass es schwierig ist, eine wirklich selektive Wirkung zu erreichen. In fast allen Fällen wird nicht allein die gewünschte Zielkinase, sondern darüberhinaus auch weitere, strukturell ähnliche Proteinkinasen inhibiert (Off-target effects). Da das Humangenom für mehr als 500 Proteinkinasen kodiert, würde der Einsatz von pUL97-gerichteten Proteinkinase-Inhibitoren höchstwahrscheinlich auch zu einer Kreuzinhibition von zellulären Proteinkinasen führen. Aus dieser Eigenschaft könnte eine unerwünschte Hemmung von zellulären Signalübertragungswegen mit toxischen Nebeneffekten resultieren.

Vor diesem Hintergrund lag ein neuer Ansatz darin, nicht die Hemmung einer Proteinkinase durch klassische Proteinkinase-Inhibitoren zu verfolgen, sondern deren intrazellulären Transport zu seinem Substrat zu blockieren. Diese Strategie würde sich für die cytomegalovirale

Proteinkinase pUL97 sehr anbieten, da pUL97 die wichtigsten Funktionen im Zellkern (Nukleus) ausübt. Ein Angriffspunkt für die antivirale Intervention ist somit in der Translokation der Kinase vom Zytoplasma in den Nukleus gegeben. Nach aktueller Datenlage unterliegt diese nukleäre Translokation von pUL97 einer komplexen Regulation, welche sich von der entsprechenden Transportregulation zellulärer nukleärer Proteinkinasen unterscheidet. Im aktuell durgeführten Projekt wurde (und wird weiterhin) die nukleäre Translokation der Kinase pUL97 untersucht. Es ergaben sich überraschende Befunde hinsichtlich der Existenz von zwei unabhängig voneinander funktionierenden NLS-Sequenzen (nukleäre Lokalisationssignale) in der N-terminalen Hälfte des Proteins, welche belegten, dass bisherige publizierte Hinweise auf eine NLS-Sequenz falsch waren. Insbesondere konnte das Auftreten von zwei Isoformen der Kinase pUL97 beschrieben werden, welche ein bzw. zwei dieser NLS-Sequenzen beinhalten und auf unterschiedliche Weise in ihrer Zellkern-Translokation reguliert werden. Die Nutzung dieser regulatorischen Besonderheiten für die Entwicklung von therapeutisch einsetzbaren Hemmstoffen ist Gegenstand weiterführender Untersuchungen.

Zielpunkte

Die Zielpunkte betrafen eine experimentelle Aufklärung

- (i) der Frage, ob die virale Proteinkinase pUL97 auf klassische Weise in den Nukleus virusinfizierter Zellen transportiert wird
- (ii) der Frage, in welcher Proteindomäne die dafür verantwortlichen NLS-Sequenzen zu finden sind
- (iii) des Befundes, dass zwei Isoformen der Kinase pUL97 auftreten und in wieweit diese unterschiedlichen nukleären Transportregulationen unterliegen
- (iv) der These, dass eine Hemmung der nukleären Translokation von pUL97 zu einer Blockierung der Virusreplikation führt.

Erfolge aus der einjährigen Förderperiode

Publikation in einem wissenschaftlichen Journal

Webel, R., Milbradt, J., Auerochs, S., Schregel, V., Held, C., Nöbauer, K., Razzazi-Fazeli, E., Jardin, C., Wittenberg, T., Sticht, H. & Marschall, M. (2011). Two isoforms of the protein kinase pUL97 of human cytomegalovirus are differentially regulated in their nuclear translocation. *J. Gen. Virol.* 92: 638-649.

Ghosh, T., Auerochs, S. Saha, S., Ray, B. & Marschall, M. (2010). Anti-cytomegalovirus activity of sulfated glucans generated from a commercial preparation of rice bran. *Antiviral Chem. Chemother.* 21: 85-95.

Milbradt, J., Webel, R., Auerochs, S., Sticht, H. & Marschall, M. (2010). Novel mode of phosphorylation-triggered reorganization of the nuclear lamina during nuclear egress of human cytomegalovirus. *J. Biol. Chem.* 285: 13979-13989.

Kongressbeiträge

Webel, R., Milbradt, J. & Marschall, M. (2010). The UL97 gene of human cytomegalovirus encodes two isoforms showing regulatory similarities and differences. 35th Int. Herpesvirus Workshop, Salt Lake City, Utah, USA.

Webel, R., Milbradt, J., Auerochs, S., Held, C., Dach, C., Wittenberg, T., Jardin, C., Sticht, H. & Marschall, M. (2011). Identification of two NLS sequences within the HCMV protein kinase pUL97 differentially regulating the nuclear translocation of two isoforms. 12th Int. CMV Workshop, Nürnberg, Germany.

Webel, R., Milbradt, J., Auerochs, S., Held, C., Dach, C., Wittenberg, T., Jardin, C., Sticht, H. & Marschall, M. (2011). The HCMV protein kinase pUL97 contains two NLS sequences responsible for regulation of nuclear translocation of two isoforms. Annual Meeting of the German Society for Virology (GfV), Freiburg, Germany.

Seminarvortrag

Webel, R. (November 22, 2010). The two pUL97 isoforms of HCMV are differentially regulated in their nuclear translocation. Seminar in Methods in Molecular Virology, Institute for Clinical and Molecular Virology, University of Erlangen-Nuremberg, Germany.

Antragstellung (im weiterreichenden Kontext des Themas)

Marschall, M. & Thoma, C. (Feb. 2011, in Bearbeitung). Entwicklung von Kinase-Inhibitoren für die Therapie der Cytomegalovirus-Infektion bei immunsupprimierten Knochenmarkstransplantierten und Krebspatienten. Projektantrag an die Wilhelm Sander-Stiftung

Intensivierung der Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern

Prof. Dr. Thomas Stamminger

Virologisches Institut, FAU (siehe diverse gemeinsame Publikationen)

Prof. Dr. Heinrich Sticht

Abt. Bioinformatik, Inst. Biochemie, FAU (gemeinsame Publikationen Webel et al., 2001 und Milbradt et al., 2010)

Dr.-Ing. Thomas Wittenberg

Department for Image Processing and Medical Engineering, Fraunhofer Institute for Integrated Circuits (IIS), Erlangen

Prof. Dr. Ebrahim Razzazi-Fazeli

VetOMICS Core Facility for Research/Proteomics and Metabolomics, University of Veterinary Medicine, Wien

Dr. Vera Schregel

MRC, University of Glasgow Centre for Virus Research, Scotland, UK

Prof. Dr. Bimalendu Ray

Department of Chemistry, Natural Product Laboratory (N.P.L.), The University of Burdwan, W.B. India

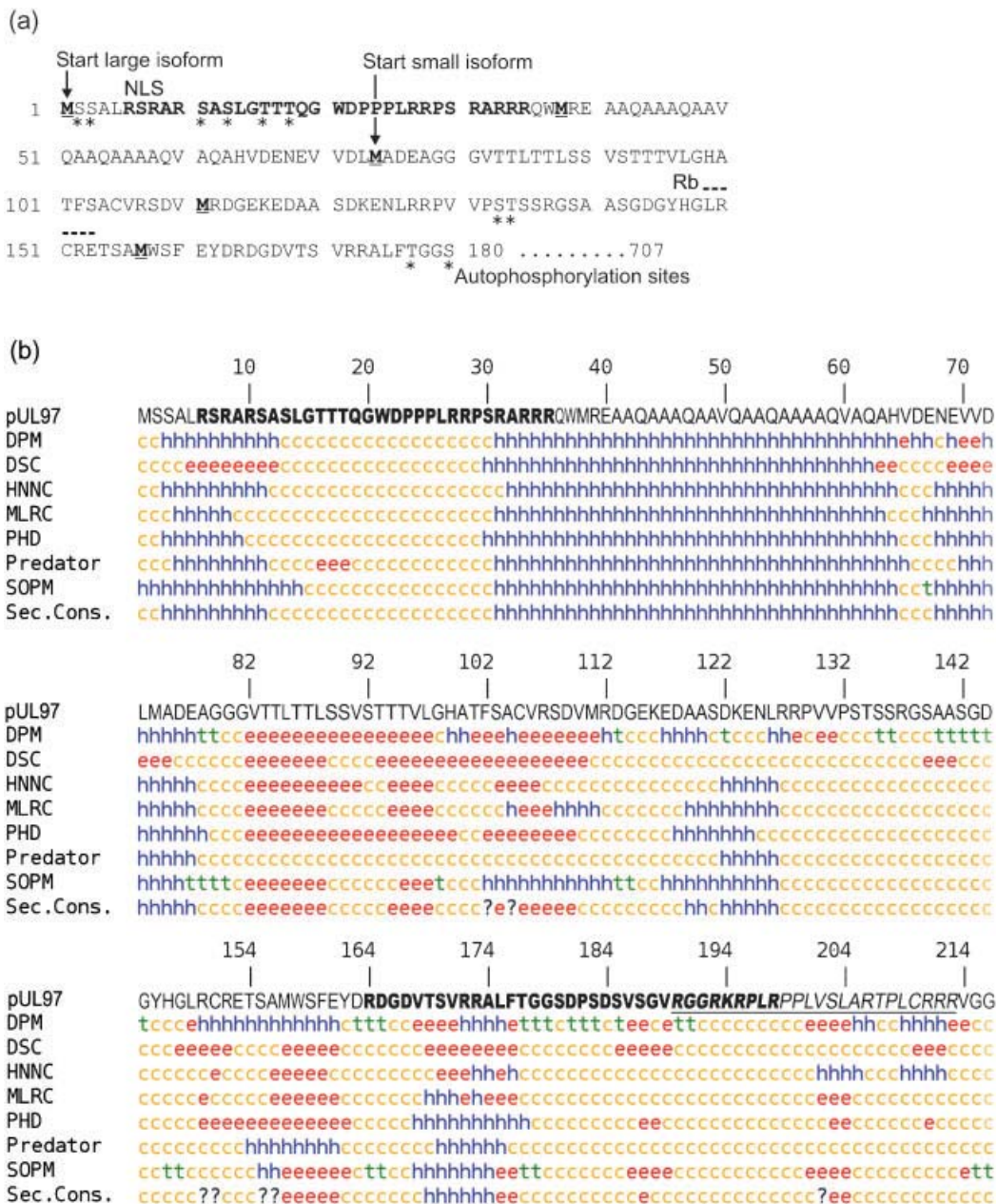


Abb. 1: N-terminale Aminosäuresequenzen des offenen Leserahmens UL97 und Sekundärstrukturvorhersage. (a) Schematische Darstellung, welche zwei alternative translationale Startcodons (fett/unterstrichen) des pUL97 zeigt; NLS, nuclear localization signal; Rb, retinoblastoma protein binding motif; *, autophosphorylation sites. **(b)** Ergebnisse für sieben verschiedene Vorhersagemethoden und die dadurch erhaltene Consensussequenz (unterste Linie; Sec. Cons.) der pUL97-Sekundärstrukturvorhersage. h, Helix; s, Sheet; t, Turn; c, Coil. Vorhergesagte "bipartite" NLS-Sequenzen sind fettgedruckt dargestellt (6–35 and 164–198) oder kursiv/unterstrichen (190–213). DPM, Double prediction method; DSC, discrimination of protein secondary structure class; HNNC, hierarchical neural network; MLRC, multivariate linear-regression combination; PHD, profile network Heidelberg; SOPM, self-optimized prediction method.

Zusammenfassung

Die virale Proteinkinase pUL97 ist eine multifunktionale Determinante der Effizienz der HCMV-Replikation und phosphoryliert sowohl virale als auch zelluläre Substratproteine. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass pUL97 in Form von zwei Isoformen exprimiert wird (90 und 100 kDa). Der Leserahmen UL97 weist eine ungewöhnliche Kodierungsstrategie auf, indem fünf ATG-Startcodons in demselben Leseraster innerhalb der N-terminalen 157 Aminosäuren angeordnet sind. Ein *Site-directed*-Mutageneseansatz ermöglichte die transiente Expression von Punkt- sowie Deletionsmutanten und Proteomics-Analysen führten zu der Evidenz, dass die Ausbildung der großen und kleinen Isoformen eine alternative Initiation der Proteintranslation zugrunde liegt, mit den jeweiligen Startpunkten bei Aminosäuren 1 bzw. 74. *In vitro*-Kinaseassays demonstrierten, dass die katalytische Aktivität (in Form von Autophosphorylierung sowie Histon-Substratphosphorylierung) für beide Isoformen gleichermaßen nachweisbar ist. Eine Analyse der intrazellulären Verteilung des pUL97 durch konfokale Laserscanning-Mikroskopie demonstrierte, dass beide Isoformen eine ausgeprägte nukleäre Lokalisation aufweisen. Überraschenderweise zeigten Mapping-Experimente zum Ziel der Identifizierung der zugrundeliegenden nukleären Lokalisationssignale (NLS) von pUL97, dass der Mechanismus der nukleären Translokation für die zwei Isoformen unterschiedlich ist. Während der extreme N-Terminus (große Isoform) ein hocheffizientes „bipartite“ NLS trägt (amino acids 6–35), wurde für den weiter innen im Protein liegenden Abschnitt (hinter Aminosäure 74 gelegen; kleine und große Isoformen) eine zweite, weniger effiziente NLS-Sequenz identifiziert. Zusammenfassend lässt sich aussagen, dass für die nukleäre Translokation der Kinase pUL97 ein komplexer Mechanismus existiert, welcher auf regulatorische Unterschiede zwischen den Isoformen hinweist und welcher möglicherweise für die Entwicklung therapeutisch einsetzbarer Inhibitoren genutzt werden kann.

Unterschrift



Unterschrift des Antragstellers

Erlangen, 01.03.2011

Prof. Dr. Manfred Marschall