

*”Den markanta ökningen av TBE-fall i kombination med bristen på behandlingsalternativ belyser vikten av att utveckla antivirala behandlingar.”*



De senaste åren har en markant ökning av antalet TBE-fall noterats i Sverige. I dag finns inte någon behandling mot TBE-virus. På Institutionen för klinisk mikrobiologi vid Umeå universitet studerar forskningsingenjör **Emma C Nilsson** och virolog **Anna K Överby** hur cellerna försvarar sig mot TBE-virus med målet att kunna utveckla en verksam behandling. Deras forskning har bland annat lagt grunden till en djupare förståelse för hur det tidiga immunförsvaret känner igen och bekämpar TBE-virus tillväxt inne i cellen.

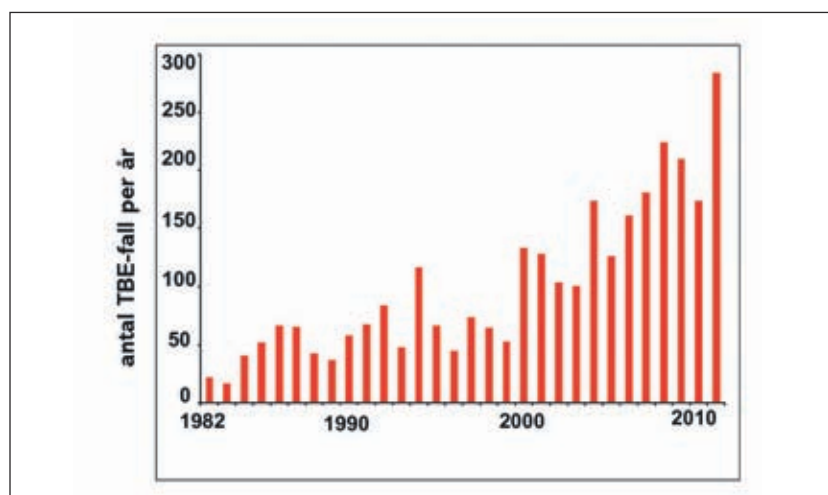
# Det tidiga immunförsvaret nyckel i kampen mot TBE-virus

**Varje år infekteras** miljontals människor av flavivirus. Några kända sjukdomar orsakade av flavivirus är: denguefeber (DV), West Nile-feber (WNV), japansk encefalit (JEV), gula febern (YF) och fästingburen encefalit (TBEV). Dessa virusinfektioner är vektorburna och sprids via bitt från infekterade myggor eller fästingar. Det vanligast förekommande flaviviruset i Europa och Asien är TBEV.

TBE diagnostiserades första gången i Sverige 1954 och antal fall har varit relativt få ända fram till 2000-talet då en kraftig ökning observerades (figur 1)<sup>1</sup>. 2011 och 2012 var rekordår med 284 respektive 288 fall rapporterade<sup>2</sup>. Majoriteten av patienterna smittades i eller i närheten av Stockholmsområdet, men en ökad utbredning har dokumenterats de senaste 30 åren (figur 2)<sup>1</sup>.

Sjukdomssymtomen är kraftigt varierande och sträcker sig från helt asymtomatiska till allvarlig encefalit och meningit<sup>3</sup>. Själva sjukdomsförloppet vid TBE karaktäriseras ofta av ett tvåfasinsjuknande: ett initialt tillstånd med muskelvärk och övergående feber vilket efterföljs av några symtomfria dygn, för

TBE-FÖREKOMST I SVERIGE 1982–2010



Figur 1. A. Totala antal fall av TBEV i Sverige sedan 1982.

Källa: 2012 Jaenson et al.; licensee BioMed Central Ltd. (ref 1).

att sedan eskalera med hög feber och CNS-påverkan. Hos överlevande patienter noteras ofta kvarvarande neurologiska symtom (27–58 procent), exempelvis minnessvårigheter, koncentrationsproblem och förlamningar<sup>3</sup>.

Trots ett fungerande vaccin mot TBE smittas varje år ungefär 10 000 personer i världen<sup>3</sup>. Vaccinet ger ett bra skydd men är dessvärre relativt kortverkande och det finns fall rapporterade där personer trots vaccination insjuknat.

I dag finns ingen behandling för de som drabbas av TBE, utan det som finns tillgängligt är symtomatisk behandling.

Den markanta ökningen av TBE-fall i kombination med bristen på behandlingsalternativ belyser vikten av att utveckla antivirala behandlingar. Basen för vår forskning är att studera och förstå cellens försvarsmekanismer mot TBE-virus och förhoppningsvis i framtiden kunna dra nytta av denna kunskap för behandling.

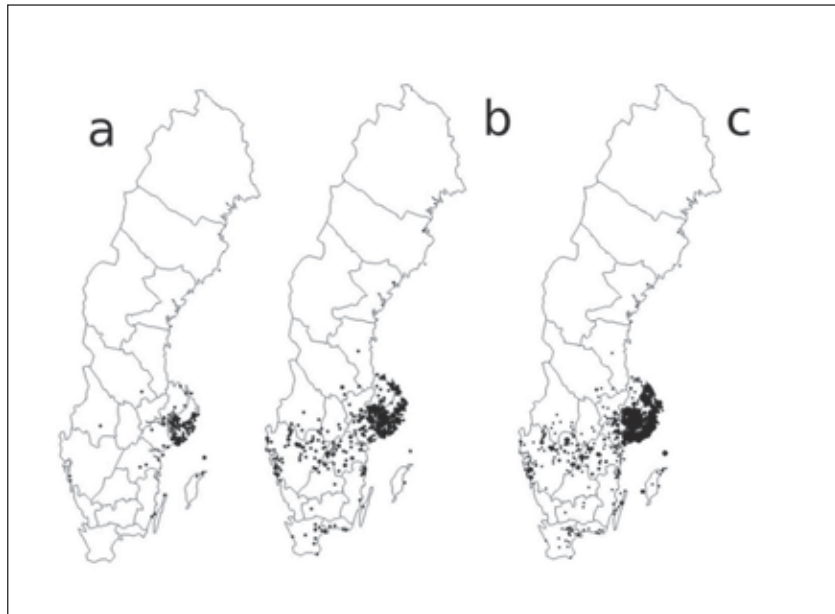
#### VIRUSETS LIVSCYKEL

Flavivirus är höljeförsedda virus med ett genom av plussträngat RNA. Det plussträngade RNA-genomet translateras direkt vid infektion till ett polyprotein. Detta polyprotein klyvs sedan av virala och cellulära enzymer för att i slutändan generera tre strukturella och sju icke-strukturella proteiner. De strukturella proteinerna omger virus-genomet, och vad gäller de icke-strukturella proteinerna så är de alla involverade i RNA-replikation och bildandet av virusfabriker för optimal förökning. Dessa virusfabriker är placerade vid endoplasmatiska retikulum (ER) och där sker också replikationen av virus-RNA. Nyproducerade RNA-molekyler packas sedan in i nybildade viruspartiklar. Dessa bildas genom att knoppa in sig i ER och frigörs sedan från cellen via exocytos.

När ett virus infekterar en cell och förökar sig kommer cellen att försvara sig, detta sker via det medfödda immunförsvaret. En viktig del av detta första försvar mot virusangrepp är Typ I-interferoner ( $IFN\alpha/\beta$ )<sup>4</sup>.  $IFN$  är signalmolekyler som produceras och utsöndras av infekterade celler för att varna intilliggande icke-infekterade celler. När en cell infekteras av virus bildas dubbelsträngat RNA (dsRNA) som en biprodukt.

Dessa molekyler känns igen av receptorer inne i cellen som kallas PRRs (pattern-recognition receptors)<sup>4</sup>. PRRs (exempelvis RIG-I och MDA-5) har till uppgift att identifiera virus-specifika markörer, så kallade PAMPs (pathogen-associated molecular patterns). Några exempel på PAMPs är dsRNA, RNA med tre fosfat i 5-prim ändan (5'PPP-RNA), DNA och LPS (lipopolysackarid). När PRRs aktiveras initieras en signaleringsskaskad som resulterar i

#### UTBREDNING AV TBE-OMRÅDEN I SVERIGE 1987–2011



Figur 2. Sammanställning av de områden där en eller flera personer smittats med TBE. Karta a) antal fall rapporterade av SMI under en femårsperiod (1987–1991). Karta b) antal fall som rapporterats 20 år senare (2007–2011). Karta c) en sammanställning för hela tidsperioden (1987–2011)

Källa: 2012 Jaenson et al.; licensee BioMed Central Ltd. (ref 1).

transkription av  $IFN\alpha/\beta$ <sup>4</sup>.  $IFN\alpha/\beta$  utsöndras från den infekterade cellen och binder till interferonreceptorn på närliggande celler. Dessa börjar i sin tur uttrycka antivirala proteiner från interferonstimulerade gener (ISGs). Proteinerna har till uppgift att hindra virusets spridning<sup>4</sup>.

Att med hjälp av ett fungerande  $IFN$ -system kunna ta hand om en virusinfektion är av yttersta vikt för cellens överlevnad. Och andra sidan, för att kunna etablera en infektion så har virus utvecklat ett antal olika strategier för att motverka cellens försvar. Vissa flavivirus, som DENV och WNV, har hittat vägar för att förhindra cellens försvar genom att blockera uppreglering, signalering eller verkan av  $IFN$ <sup>5</sup>. För TBEV har man identifierat det virala polymeraset NS5 som  $IFN$ -signaleringsblockare i cellen<sup>6</sup>.

#### VIRUS GÖMMER SIG FÖR FÖRSVARET

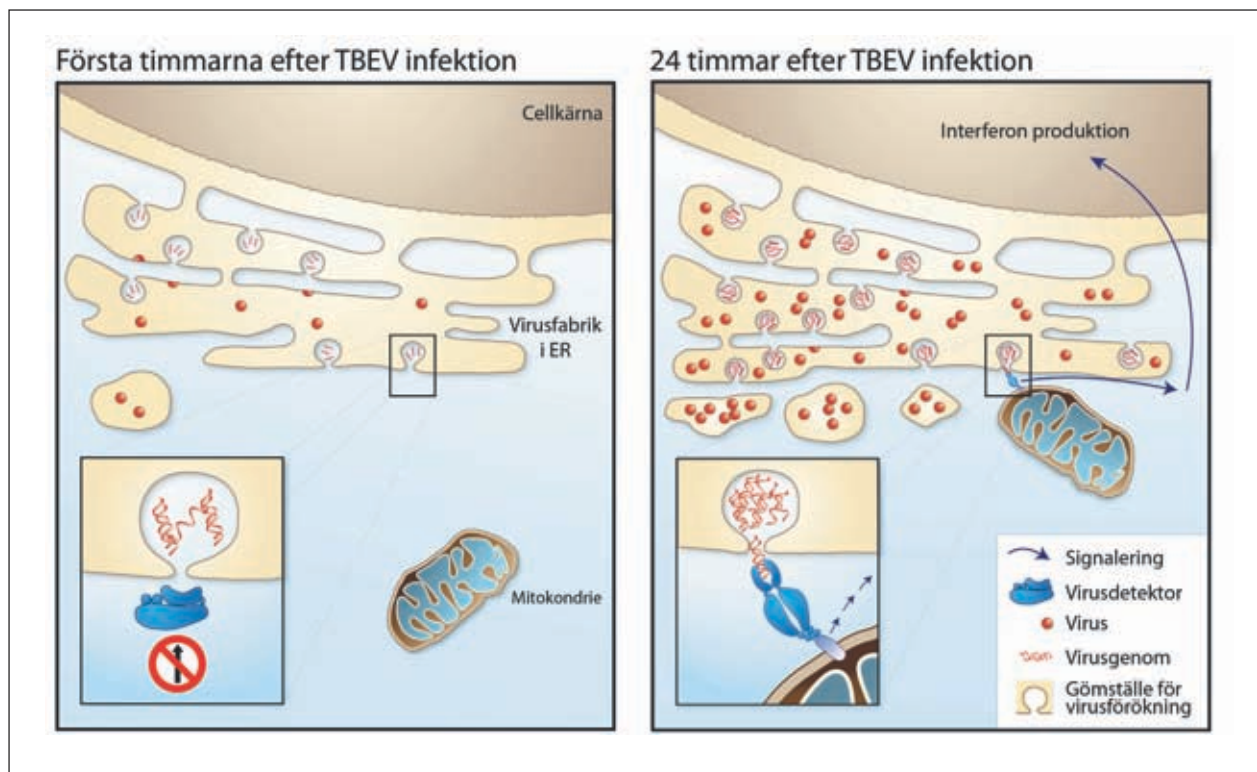
Det första steget i att förstå hur cellen försvarar sig mot TBEV var att undersöka om cellen känner igen TBEV och uppreglerar  $IFN$ . Vi har visat att  $IFN$ -

responsen är fördröjd efter TBEV-infektion, denna fördröjning beror inte på att viruset blockerar signalering, transkription eller utsöndringen av  $IFN$ , utan fördröjningen beror på att viruset "gömmar" sitt dsRNA i replikationsvesiklar (figur 3)<sup>7,8</sup>. På detta sätt finns inte dsRNA tillgängligt i cellens cytoplasma för upptäckt av PRRs.

Till skillnad från vissa andra virus bekämpar inte TBEV specifikt uppreglering av  $IFN$ -responsen i cellen utan hindrar i stället upptäckt genom att undvika att PRRs får tillgång till virusets RNA. Under senare delen av virusreplikationen ackumuleras så mycket dsRNA inne i cellen att det läcker ut ur vesiklarna, signaleringen kommer igång och  $IFN$  uppregleras. Denna strategi leder till att stora mängder virus hinner produceras och infektera andra celler innan alarmsignalen  $IFN$  släpps ut för att varna andra celler och förhindra virus-spridning.

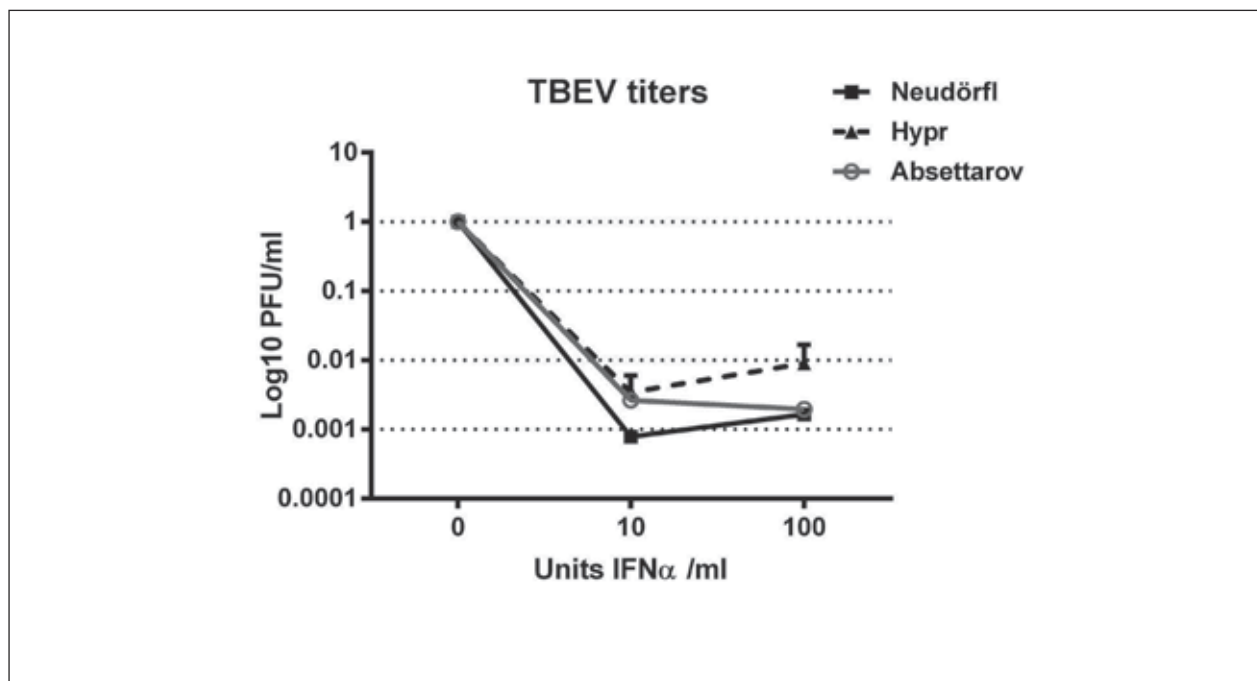
Vad händer då med viruset när  $IFN$  väl utsöndrats? När  $IFN$  kommer efter virusinfektionen kan NS5-proteinet från TBEV förhindra  $IFN$ -signalering

## TBE:S VIRUSFABRIKER I ER



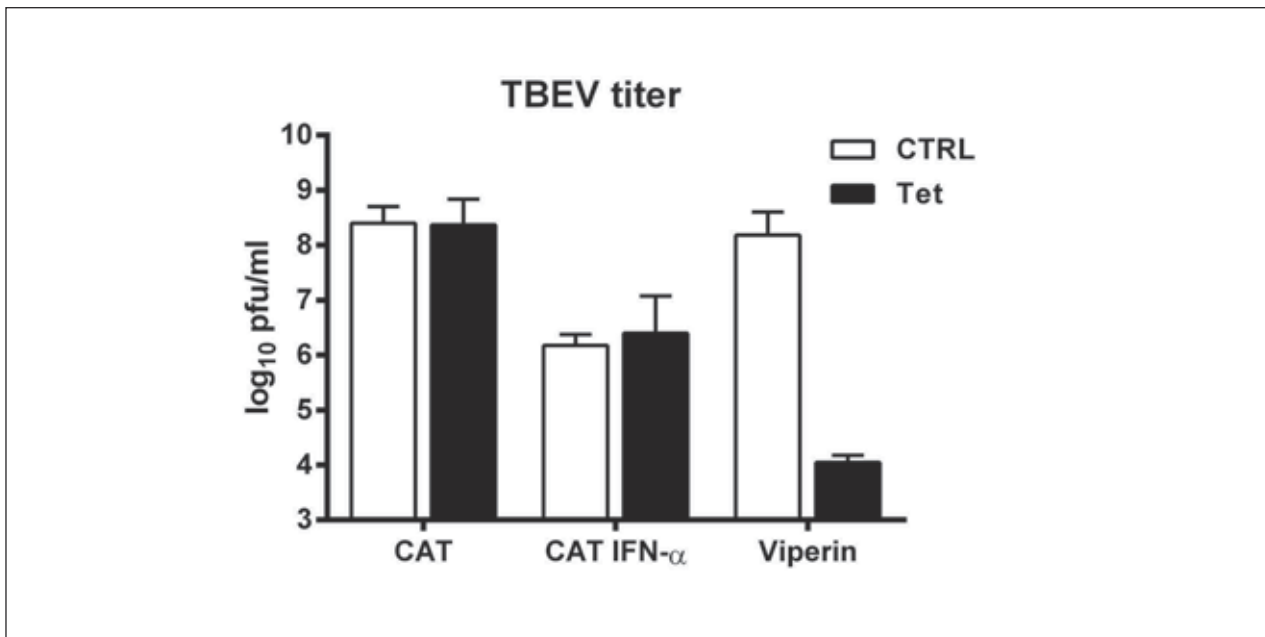
Figur 3. TBEV inducerar virusfabriker med vesiklar i ER som används för replikation av virus-RNA. Vesiklarna skyddar RNA från att upptäckas av cellens virusdetektorer (RIG-I och MDA5). Under senare del av infektionsförloppet har det producerats stora mängder partiklar och dsRNA läcker ut från vesiklarna. Detta leder i sin tur till en uppreglering av IFN $\beta$  via signalering från RIG-I och MDA5 (modifierad från ref 8).

## INTERFERON HÄMMAR VIRUSVÄXT



Figur 4. Tre TBEV-stammar uppvisar interferonkänslighet. Neudörfl räknas som en lågpatogen stam som isolerades 1971 från en Ixodes ricinus-fästing i Österrike. Hypr räknas som en högpato-gen stam och är ett blodisolat från ett avlidet barn 1953 i Tjeckien. Absettarov isolerades 1951 från en sjuk patient i Ryssland och har en oklar patogenicitet.

## PROTEINET VIPERIN MINSKAR TBEV-TILLVÄXT 10 000 GÅNGER



Figur 5. Tillväxten av TBEV är kraftigt påverkad av närvaron av det antivirala proteinet viperin (ref 9). Virustillväxt mättes 24 timmar efter infektion i cellinjer (FLP-IN T Rex). Dessa celler uttrycker kontrollproteinet CAT eller viperin efter tetracyklinbehandling (Tet), obehandlade celler (CTRL) uttrycker inte dessa proteiner. Virusväxt hämmas också av IFN $\alpha$ -behandling.

och den antivirala responsen i form av ISG-uppreglering<sup>6</sup>. Men vi ser en helt annan bild om cellerna behandlas med IFN före infektion. Vid närvaro av IFN $\alpha$  hämmas tillväxten av TBEV tusenfaldigt, även vid mycket låga doser (10 units). Tre olika stammar av TBEV analyserades och effekten av IFN verkar vara densamma för alla tre (figur 4).

Denna starka effekt av IFN beror på att över 300 ISGs uppregleras. Vissa av dessa ISG har potent antiviral effekt mot många olika virus, och det är dessa effektorproteiner som förhindrar virus-spridning just efter infektion. Vilken eller vilka ISGs är då effektiva mot TBEV? För att besvara denna fråga screenades olika ISGs för dess antivirala effekt mot TBEV och viperin identifierades. Närvaro av viperin minskade TBEVs tillväxt med 10 000 gånger (figur 5)<sup>9</sup>.

#### STUDERAT VIPERIN I DETALJ

Viperin är ett protein som i ett antal studier visats ha en hämmande roll vid infektion med andra för människan relevanta virus, som influensa A, cytomegalovirus (HCMV), hepatit C (HCV),

*”Vad som krävs är riktiga randomiserade studier som är dubbelblinda med placebokontroll för att med säkerhet kunna fastställa att IFN är en potentiell antiviral behandling mot TBE.”*

DENV, WNV och HIV<sup>10</sup>. Den antivirala mekanismen verkar skilja sig från ett virus till ett annat och vara specifik för de olika virusfamiljerna. Vi har därför studerat detta protein i detalj för att reda ut hur viperin attackerar TBEV. Resultat från våra studier har tydligt visat att viperin hämmar virus RNA-syntes och inte bindning till cellytan eller inträde i cellen<sup>9</sup>.

Nästa steg blir nu att i detalj studera och analysera viperins antivirala mekanism, för att kunna hitta läkemedelsstrategier mot TBE och andra flavivirus. Ett sätt skulle kunna vara att sätta igång viperinuttryck i kroppen vid infektion, men svårigheten med detta är

att administrera verksamma ämnen så att de korsar blodhjärnbarriären.

Man har dock sett i musmodellen att IFN $\alpha$ -administration intraperitonealt påverkar hjärnan och leder till uppreglering av olika ISG i bland annat cerebellum<sup>11</sup>. Många studier i Ryssland under 80-talet har också varit inne på en liknande linje, det vill säga att behandla möss med ämnen som inducerar interferon för att förhindra TBE<sup>12</sup>. DENV är som TBEV mycket känslig för IFN-behandling i cellkultur. I infekterade apor har dock interferonbehandling inte samma starka effekt på DENV, även om tidig IFN-behandling under pågående viremi har effekt på virusreplikation<sup>13</sup>.

I två andra studier med totalt fem patienter infekterade med WNV gav IFN $\alpha$ 2b-behandling, mellan 5–9 dagar efter CNS-symtom, förbättrad neurologisk funktion<sup>14,15</sup>. Medan en annan fallbeskrivning inte uppvisade positiva effekter av IFN $\alpha$ 2b 17 dagar efter symtom<sup>16</sup>.

Vid TBE är det dock sällan att patienter söker vård under den viremiska fasen, utan diagnosen ställs oftast först när CNS-symtom uppvisas. Därmed kan man spekulera om den möjliga effekt som IFN-behandling skulle ha i ett så pass sent skede av infektionen. Det finns dock en fallbeskrivning som tyder på en positiv effekt även vid en sen IFN-behandling när en patient infekterats av

WNV. Patienten i fråga inledde IFN-behandling så sent som tre veckor efter sjukdomsdebut<sup>17</sup>.

#### KRÄVS RANDOMISERADE STUDIER

Frågan kvarstår dock om denna strategi är rimlig för TBE-patienter, med tanke på biverkningar av IFN-behandling (www.fass.se) och att TBEV kan blockera IFN-signalering efter infektion<sup>6</sup>. En sätt att undvika biverkningar kan vara att bara administrera IFN vid ett tillfälle, som i fallet med de dengueinfekterade aporna.

Vad som krävs är riktiga randomiserade studier som är dubbelblinda med placebokontroll för att med säkerhet kunna fastställa att IFN är en potentiell antiviral behandling mot TBE. Men

innan dessa kan genomföras finns det fortfarande många frågor som måste besvaras i djurmodellen. Några av dem är om viferin uppregleras i CNS efter IFN-behandling, om IFN-behandling har effekt på symtom och överlevnad hos möss infekterade med TBEV och vad som kan göras för att minimera sidoeffekterna av IFN-behandling.

Våra studier har lagt grunden till en djupare förståelse för hur det tidiga immunförsvaret känner igen och bekämpar TBEV:s tillväxt inne i cellen. Vi kommer att fortsätta studera TBEV i detalj för att i framtiden kunna hjälpa och förkorta TBE-patienters lidande.



EMMA C NILSSON  
första forskningsingenjör, Institutionen för klinisk mikrobiologi, Virologi, Umeå universitet  
emma.nilsson@climi.umu.se



ANNA K ÖVERBY  
docent i virologi, Institutionen för klinisk mikrobiologi, Virologi, Umeå universitet  
anna.overby@climi.umu.se

## Vill du hålla dig uppdaterad på vad som skrivs om neurologiska sjukdomar i pressen?

Vi tillhandahåller sedan en tid tillbaka en kostnadsfri tjänst som innebär att vi skickar ett veckovis mail med de nyheter vi fångar upp som har koppling till neurologiska sjukdomar. Nyheterna läggs ut på [www.neurologiisverige.se](http://www.neurologiisverige.se) och det är dessa vi sammanställer en gång i veckan och skickar ut till er.

Om du vill hålla dig uppdaterad anmäler du dig på [www.neurologiisverige.se](http://www.neurologiisverige.se) alternativt skickar ett mail till oss med dina uppgifter. Namn, e-post, specialitet, arbetsplats. Skicka detta till oss på [redaktionen@pharma-industry.se](mailto:redaktionen@pharma-industry.se)

**Håll dig uppdaterad!**



## REFERENSER

1. 3. Jaenson, T.G., et al., Why is tick-borne encephalitis increasing? A review of the key factors causing the increasing incidence of human TBE in Sweden. *Parasit Vectors*, 2012. 5: p. 184.
2. 1. SMI, Epidemiologisk årsrapport 2012. 2012. p. 73-75.
3. 2. Charrel, R.N., et al., Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clin Microbiol Infect*, 2004. 10(12): p. 1040-55.
4. Randall, R.E. and S. Goodbourn, Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol*, 2008. 89(Pt 1): p. 1-47.
5. Diamond, M.S., Mechanisms of evasion of the type I interferon antiviral response by flaviviruses. *J Interferon Cytokine Res*, 2009. 29(9): p. 521-30.
6. Werme, K., M. Wigerius, and M. Johansson, Tick-borne encephalitis virus NS5 associates with membrane protein scribble and impairs interferon-stimulated JAK-STAT signalling. *Cell Microbiol*, 2008. 10(3): p. 696-712.
7. Overby, A.K., et al., Tick-borne encephalitis virus delays interferon induction and hides its double-stranded RNA in intracellular membrane vesicles. *J Virol*, 2010. 84(17): p. 8470-83.
8. Overby, A.K. and F. Weber, Hiding from intracellular pattern recognition receptors, a passive strategy of flavivirus immune evasion. *Virulence*, 2011. 2(3): p. 238-40.
9. Upadhyay, A.S., et al., Viperin is an iron-sulfur protein that inhibits genome synthesis of tick-borne encephalitis virus via radical SAM domain activity. *Cell Microbiol*, 2013.
10. Mattijssen, S. and G.J. Pruijn, Viperin, a key player in the antiviral response. *Microbes Infect*, 2011.
11. Wang, J., I.L. Campbell, and H. Zhang, Systemic interferon-alpha regulates interferon-stimulated genes in the central nervous system. *Mol Psychiatry*, 2008. 13(3): p. 293-301.
12. Ershov, F.I., et al., [Optimization of the schemes for using interferon inducers]. *Antibiotiki*, 1982. 27(4): p. 280-4.
13. Espada-Murao, L.A. and K. Morita, Dengue and soluble mediators of the innate immune system. *Trop Med Health*, 2011. 39(4 Suppl): p. 53-62.
14. Kalil, A.C., et al., Use of interferon-alpha in patients with West Nile encephalitis: report of 2 cases. *Clin Infect Dis*, 2005. 40(5): p. 764-6.
15. CDC, Clinical trials for treating West Nile virus disease. 2005.
16. Chan-Tack, K.M. and G. Forrest, Failure of interferon alpha-2b in a patient with West Nile virus meningoencephalitis and acute flaccid paralysis. *Scand J Infect Dis*, 2005. 37(11-12): p. 944-6.
17. Lewis, M. and J.R. Amsden, Successful treatment of West Nile virus infection after approximately 3 weeks into the disease course. *Pharmacotherapy*, 2007. 27(3): p. 455-8.