

Clemens Busse
Dr. sc. hum.

Genetische Analyse von Glykoproteinen des Epstein-Barr Virus - Implikationen für die Pseudotypisierung

Geboren am 05.10.1980 in Mainz

Diplom der Fachrichtung Biotechnologie am 19.01.2006 an der Hochschule Darmstadt

Promotionsfach: DKFZ

Doktorvater: Herr Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Henri-Jacques Delecluse

Gp350 ist ein Glykoprotein der Epstein-Barr Virushülle, das für eine effiziente Infektion von B-Lymphozyten erforderlich ist, und das an das zelluläre Oberflächenprotein CD21 bindet. Die EBV-Infektion ist ein komplexer Prozess, in dem das Virus an die Zelle adsorbiert und in das Endosom transportiert werden muss. Erst nach Fusion der endosomalen Membranen kann dann das virale Kapsid in das Zytoplasma gelangen. Es ist nicht geklärt, ob die Funktion von gp350 nur auf die Interaktion mit CD21 beschränkt ist.

Um eine eventuelle Beteiligung von gp350 an weiteren Etappen der Infektion untersuchen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst eine Deletionsmutante des EBV hergestellt. Durch homologe Rekombination wurde das für gp350 kodierende BLLF1-Gen aus dem EBV-Genom entfernt. In einem zweiten Abschnitt wurde diese Deletionsmutante mit Fusionsproteinen aus gp350 und Antikörpern komplementiert. Die Chimären wurden so konstruiert, dass nur die gp350-Domänen, die zur Verankerung in der Virushülle notwendig sind, mit schweren Immunglobulinketten fusioniert wurden. Nach Co-Transfektion der leichten Ketten konnten so Viren produziert werden, die an ihrer Oberfläche Antikörper, die gegen die B-Zell-Antigene CD19, CD21 oder CD22 gerichtet sind, tragen.

In Bindungsstudien mit Lymphozyten konnte ich zeigen, dass an der Bindung von EBV neben gp350 noch weitere Moleküle beteiligt sein müssen, da in Abwesenheit von gp350 die Bindungseffizienz im Vergleich zu gp350-komplementierten Viren nur um weniger als die Hälfte verringert war. Die endozytotischen Prozesse, die die rekombinanten Viren durchlaufen, wurden indirekt durch eine Analyse der durch sie ausgelösten T-Zell-Antwort untersucht. Die Endozytose wurde durch ein Fehlen von gp350 nicht gravierend beeinträchtigt. Erstaunlicherweise war die Infektiosität der Deletionsmutante verglichen mit gp350-komplementierten Viren aber massiv eingeschränkt. Gp350 muss somit neben der Bindung des Virus an die Zelloberfläche und dem darauffolgenden Eintritt in das Endosom eine weitere Funktion ausüben, die die starke Reduzierung der Infektiosität in Abwesenheit dieses Glykoproteins verursacht.

Durch einen anti-CD21 Antikörper konnte die Infektiosität nicht vollständig wiederhergestellt werden. Die Infektionsrate ist bei einer durch diesen Antikörper vermittelten Infektion signifikant niedriger als bei der durch gp350 vermittelten Infektion, obwohl auch hier die Bindungseffizienz vergleichbar und der Übergang in das Endosom nur unwesentlich niedriger ist. Dies bedeutet ebenfalls, dass sich die Rolle von gp350 bei der Infektion von EBV nicht auf die bloße Bindung an CD21 reduzieren lässt.

Die Interaktion mit CD21 erwies sich in den durchgeführten Experimenten als für eine

effiziente Infektion unbedingt notwendig. Antikörper gegen CD19 und CD22 können zwar genauso effizient wie der anti-CD21 Antikörper an Lymphozyten binden und die Endozytose in gleicher Stärke vermitteln, sie können jedoch im Gegensatz zu diesem die Infektiosität nicht messbar erhöhen.

Diese Arbeit zeigt, dass das bisher beschriebene Funktionsspektrum von gp350 unvollständig ist und um eine Beteiligung an Prozessen, die nach der Endozytose stattfinden, erweitert werden muss.