

Sandra Gerlach  
Dr. med. dent.

## **Erzeugung von rekombinantem Hepatitis C Virus NS3 Protein und dessen Einsatz zur Untersuchung potentieller Protein-Protein-Interaktionen**

Geboren am 24.11.1969 in Berlin  
Reifeprüfung am 12.06.1990 in Berlin  
Studiengang der Fachrichtung Zahnmedizin vom SS 1991 bis WS 1996/97  
Physikum am 22.03.1994 an der Freien Universität Berlin  
Klinisches Studium in Berlin  
Staatsexamen am 23.12.1996 an der Freien Universität Berlin

Promotionsfach: Innere Medizin  
Doktorvater: Prof. Dr. med. W. Stremmel

Etwa 1% der Weltbevölkerung ist mit dem Hepatitis C Virus infiziert. Die Erkrankung nimmt in 50-80% der Fälle einen chronischen Verlauf und nur ca. 40% der Patienten können durch kombinierte Interferon- $\alpha$ / Ribaverin Behandlung geheilt werden. Daher wird intensiv nach antiviralen Medikamenten gegen das HCV gesucht. Aufgrund seiner zentralen Stellung in der HCV Replikation stellen das HCV-NS3 Protein sowie spezifische Komplexe zwischen HCV-NS3 Protein und viralen oder zellulären Faktoren mögliche Angriffspunkte einer antiviralen Therapie dar.

Für die Untersuchung potentieller Protein-Protein-Interaktionen mit HCV-NS3 wurde NS3 Protein in rekombinanter Form hergestellt. Es erfolgte die Konstruktion eines rekombinanten Bakulovirus in mehreren Schritten. Mit diesem Virus wurden später Insektenzellen infiziert, die dann rekombinantes NS3 Protein erzeugten. Im ersten Schritt wurde der rekombinante Transfervektor pBak Pak His 2/ NS3 konstruiert und sequenziert. Im nächsten Schritt wurden Insektenzellen mit dem rekombinanten Transfervektor pBak Pak His 2/ NS3 und dem Expressionsvektor pBak Pak 6 kotransfiziert. Durch homologe Rekombination zwischen den viralen Sequenzen des rekombinanten Transfervektors pBak Pak His 2/ NS3, die das NS3-Gen flankieren und den korrespondierenden Sequenzen des Expressionsvektors pBak Pak 6 entstand der rekombinante Expressionsvektor Bak Pak 6/ NS3. Dieser wurde selektiert, auf Genexpression kontrolliert und amplifiziert. Insektenzellen wurden mit rekombinantem Bak Pak 6/ NS3-Virus infiziert und rekombinante HCV-NS3 Proteine isoliert. Das NS3 Protein wurde als 6xHistidin-Fusionsprotein gebildet. Die Reinigung des NS3 Proteins erfolgte über Nickelaffinitätschromatographie durch Bindung des Histidinrestes.

Die Analyse der Reinigung des HCV-NS3 Proteins erfolgte über Western Blotting mit NS3-Maus-Antikörpern und bestätigte, dass NS3 Protein von allen NS3 Spaltprodukten getrennt wurde, die sich zuvor im nicht gereinigten Zelllysate mit NS3-Maus-Antikörpern nachweisen ließen. Die Überprüfung der Reinheit des gereinigten NS3 Proteins fand über Elektrophorese in einem SDS Polyacrylamid Gel und anschließender Coomassie Blue Färbung statt. Die Färbung zeigte, dass das NS3 Protein von einem großen Teil der zellulären Proteine getrennt werden konnte, jedoch verblieben einige zelluläre Proteine als Verunreinigungen.

Die Analyse des angereicherten NS3 Proteins auf potentielle Homooligomerbildung wurde mit Hilfe von <sup>35</sup>S-markiertem gereinigtem NS3\* Protein über Far Western Dot Blotting durchgeführt. Das Ergebnis zeigte die Bindung von NS3\* Protein an Komponenten innerhalb der an NS3 Protein angereicherten Fraktion in An- und Abwesenheit von ATP.

Weiterhin wurde die an NS3 Protein angereicherte Fraktion in einem Polyacryamid-Gel unter nativen Bedingungen aufgetrennt und über Coomassie Blue Färbung visualisiert. Das relativ hohe Molekulargewicht der einzigen unter diesen Bedingungen erkennbaren Bande der an NS3 Protein angereicherten Fraktion ist mit einer Struktur des NS3 Proteins als Homo- bzw. Heterooligomer vereinbar.

Zusätzlich wurde die an NS3 Protein angereicherte Fraktion über Far Western Dot Blotting auf Protein-Protein-Interaktionen mit Komponenten aus <sup>35</sup>S-markierten HepG2\* Extrakten untersucht. Das Ergebnis zeigte eine Bindung von HepG2\*-Komponenten an die an NS3 Protein angereicherte Fraktion in An- und Abwesenheit von ATP. Die gebundenen Proteine wurden eluiert und über SDS Page analysiert. Es zeigten sich multiple HepG2 Proteine unbekannter Identität.