

Björn Schwer  
Dr. med.

## Molekulare Charakterisierung des Hepatitis-C-Virus Core-Proteins

Geboren am 11.11.1975 in Marburg  
Staatsexamen am 19.11.2003 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)  
Doktorvater: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Harald zur Hausen

Weltweit sind circa 170 Millionen Menschen chronisch mit dem Hepatitis-C-Virus (HCV) infiziert. Eine effiziente Entwicklung von Behandlungs- und Präventionsstrategien setzt das Verständnis der molekularen Vorgänge in der HCV-Infektion auf zellulärer Ebene voraus. Ziel dieser Arbeit war es, das Verständnis der molekularen Virologie des Hepatitis-C-Virus durch eine systematische Untersuchung der Funktionen und Eigenschaften des Core-Proteins zu erweitern.

In einem ersten Teil beschreibt die vorliegende Dissertation die Herstellung von Modellsystemen zur Untersuchung des HCV Core-Proteins.

In einem zweiten Teil wurden durch das Core-Protein bedingte Effekte auf die Immunfunktion von T-Zellen untersucht. In verschiedenen Core-induzierbaren Jurkat-T-Zellklonen und nach Infektion von Jurkat-T-Zellen mit Core-exprimierenden lentiviralen Vektoren wurde kein entscheidender Einfluß der Core-Expression auf die spontane oder induzierte Produktion des IL-2-Proteins oder anderer Zytokine gefunden. Hinweise auf eine Rolle des Core-Proteins in der Etablierung der HCV-Infektion durch eine direkte Modulation der Immunabwehr konnten somit nicht bestätigt werden. Weiterhin wurden die erzeugten Modellsysteme zur Untersuchung einer möglichen Rolle des Core-Proteins in Zellzyklus- und Apoptoseregulation in transformierten Zelllinien und humanen Primärzellen eingesetzt.

In einem dritten Teil wurde die subzelluläre Lokalisation des Core-Proteins untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, daß Core nicht nur an der Oberfläche intrazellulärer Lipidtropfen lokalisiert ist, sondern ursächlich für die Akkumulation dieser Strukturen verantwortlich ist, was für eine ätiologische Rolle des Core-Proteins in der HCV-assoziierten Hepatosteatose spricht.

Die detaillierte Untersuchung der subzellulären Lokalisation des Core-Proteins ergab weiterhin, daß das Core-Protein nach vollständiger Prozessierung am endoplasmatischen Retikulum (ER) mit Mitochondrien assoziieren kann.

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmalig, daß das Core-Protein auch im Kontext des gesamten HCV-Genoms und unter autonomer RNA-Replikation an Mitochondrien binden kann.

Diese Ergebnisse wurden in verschiedenen, unabhängigen Systemen bestätigt. Mittels Immunelektronenmikroskopie und *In-vitro*- und *In-vivo*-Proteaseverdauversuchen wurde gezeigt, daß Core mit der äußeren Mitochondrienmembran interagiert. Diese Interaktion wurde durch Carbonat-Extraktionsexperimente weiter charakterisiert und es konnte gezeigt werden, daß das mitochondriale Core-Protein - wie auch das an die ER-Membran gebundene Core-Protein - ein peripheres Membranprotein ist, das nur lose mit der Membran verbunden ist.

In Zusammenarbeit mit Dr. Shaotang Ren und Dr. T. S. Yen (University of California, San Francisco) wurde eine kurze, sehr konservierte Region im Carboxyterminus des prozessierten Core-Proteins identifiziert, die die mitochondriale Lokalisation des prozessierten Core-Proteins vermitteln kann. Versuche, in denen diese Region des Core-Proteins mit dem grün-fluoreszierenden Protein (GFP) fusioniert wurde, zeigten, daß das resultierende heterologe Protein ebenfalls an der äußeren

Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Insgesamt zeigen diese Versuche erstmalig, daß der Carboxyterminus des HCV-Core-Proteins eine Region enthält, die eine mitochondriale Lokalisation des Proteins vermitteln kann. Darüber hinaus wurde gefunden, daß das Core-Protein nicht nur mit Mitochondrien und dem ER assoziiert ist, sondern auch an sogenannten Mitochondrien-assoziierten ER-Membranen (MAM) vorhanden ist.

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit wurde ein neues Modell der subzellulären Lokalisation des Core-Proteins entwickelt, das die verschiedenen Aspekte der Core-Lokalisation vereint.

Dieses Modell schlägt vor, daß das prozessierte und lose mit dem äußeren Blatt der ER-Membran verbundene Core-Protein lateral diffundiert und so auf die Oberfläche von sich neu bildenden Lipidtropfen und in andere Subregionen des ER gelangen kann. Von dort ist es dem Core-Protein möglich, über teilweise fusionierte Membranen oder Membranbrücken, auf die Oberfläche von Mitochondrien zu gelangen.

Die spezifische Assoziation des Core-Proteins mit Mitochondrien stützt die Idee, daß das Core-Protein während der HCV-Infektion mitochondriale Funktionen moduliert.

Eine Core-bedingte Beeinflussung mitochondrialer Funktionen könnte die zelluläre Physiologie in einer Weise verändern, die der HCV-Replikation dient. Sie könnte außerdem zu einer Beeinflussung des programmierten Zelltodes und des zellulären Fettstoffwechsels führen und durch erhöhte zelluläre Produktion von Sauerstoffradikalen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der HCV-Infektion spielen.

Insgesamt ergänzen und erweitern die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse das Verständnis der molekularen Virologie des Hepatitis-C-Virus und der Rolle des HCV Core-Proteins in der HCV-Pathogenese.