

Kilian Weigand
Dr. med.

Regulation des Kerntransportes vom Kapsid Protein des Hepatitis B Virus

Geboren am 23.03.1976 in Würzburg
3. Staatsexamen am 14.11.2003 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Hygiene
Doktorvater: Professor Dr. med. Hans-Georg Kräusslich

Das Hepatitis B Virus (HBV) ist einer der Hauptverursacher für virale Hepatitiden. Trotz eines bestehenden Impfschutzes infizieren sich jährlich weltweit noch immer etwa 80000 Menschen neu und mehr als 300 Millionen sind chronisch erkrankt. Letztere haben ein deutlich erhöhtes Risiko ein hepatozelluläres Karzinom zu entwickeln. Eine medikamentöse Therapie ist nur bei etwa 50 Prozent chronisch infizierter Patienten erfolgreich.

Um weitere Therapiemöglichkeiten zu finden und der Idee HBV, aufgrund seines Hepatotropismus, als Vektor für leberspezifische Gentherapie nutzen zu können, ist es sinnvoll sich mit dem intrazellulären Replikations- und Lebenszyklus des Virus zu beschäftigen.

In dieser Arbeit wurde das Augenmerk auf das virale Core-Protein (HBc) gelegt. Nach Infektion bildet dieses Protein im Zytoplasma die Nukleokapside. Diese dienen als Entstehungsort des viralen Genoms durch reverse Transkription. Daneben besitzt das Core-Protein ein basisches Signal, welches als Kernlokalisierungssignal (NLS) fungieren soll. Es besteht aus einer argininreichen Sequenz, sowie drei Serin-Prolin (SP) Motiven, welche phosphoryliert werden können. Daher wurde angenommen, Phosphorylierung könnte den Kerntransport von HBc beeinflussen.

Um den Kerntransport des Core-Proteins unabhängig von der Kapsidbildung zu untersuchen, haben wir die Transportregulation anhand eines Fusionsproteins aus dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) und HBc untersucht. Die N-terminale Fusion von GFP an das Core-Protein verhinderte die Kapsidbildung und erlaubte gleichzeitig die Verteilung des Proteins in lebenden Zellen zu beobachten. Mit diesem System erhielten wir folgende Ergebnisse.

Das Fusionsprotein verteilte sich gleichmäßig über die gesamte Zelle. Um den Einfluß der SP-Motive auf die intrazelluläre Lokalisierung zu untersuchen mutierten wir anschließend die Serine in der basischen Sequenz.

Der Austausch mit der Aminosäure Alanin, Aspartat oder Glutamat erhöhte den Anteil intranukleären Core-Fusions-Proteins, was eine wichtige Rolle der SP-Motive bestätigte. Andererseits fand sich nach Behandlung mit Breitband-Kinaseinhibitoren keine Veränderung der intrazellulären Verteilung des Fusionsproteins.

Eine Phosphorylierung über Expression einer SRPKinase hingegen führt zu einer fast ausschließlich zytoplasmatischen Lokalisation. Dies zeigt, daß eine Phosphorylierung von HBc durch SRPK einen Export herbeiführt (bzw. einen Import verhindert).

Weiterhin zeigen unsere Daten, daß die negative Ladung der Phosphoserine nicht ausreicht, um die beschriebene Funktion zu erfüllen. Vermutlich wird die Struktur des phosphorylierten SP-Motives an sich durch ein Adapterprotein erkannt, welches dann den Export katalysiert.

Die Ausschaltung des bislang angenommenen NLS führte nicht zu einer zytoplasmatischen Verschiebung der HBc Lokalisation. Damit wird fraglich ob es wirklich als dominantes Kernimportsignal dient, oder ob sich ein weiteres NLS im Kapsidprotein von HBV befindet, separiert von den Phosphorylierungsstellen, wie es zum Beispiel im DHBV Core Protein der Fall ist. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß das bekannte NLS in vivo über eine katalytische Funktion verfügt.

Um auch den Einfluß der Kapsidbildung auf die nukleozytoplasmatische Verteilung von HBc zu untersuchen, wurde das beschriebene Modell abgewandelt. Zusätzlich wurde unfusioniertes und damit assemblykompetentes Core Protein, mit jeweils dem gleichen Mutationszustand, coexprimiert. Dies resultierte in zytoplasmatischer Retention der GFP-Fusionen durch die Bildung gemischter Kapside. Das in Kapside integrierte Core-Protein entzieht sich somit der intrazellulären Transportmaschinerie.

In diesem Kapsid bildenden System führte die Behandlung mit Breitband-Kinaseinhibitoren, Zellzyklusinhibitoren oder Chemikalien, welche die intrazelluläre Calciumkonzentration beeinflussen, teilweise zu einer Verteilung des GFP-Core-Fusionsproteins, welche der Expression der assemblyunfähigen Fusionen alleine entspricht.

Der Zellzyklus scheint die primär wichtige Kapsid-Assemblierung durch Phosphorylierung zu beeinflussen, indem er die Kapsidstabilität reduziert und somit die Menge an freiem HBc erhöht. Dadurch könnte er indirekt den Transport zwischen Zellkern und Zytoplasma beeinflussen.