

Luis Jaime Vallejo Castano

Dr. med

Production of anti-norovirus protein antibodies and the role of NS1/2 in blocking innate immune response

Fach/Einrichtung: Infektiologie

Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. Paul Schnitzler

Es ist eine große Herausforderung am humanen Norovirus zu forschen, da es zurzeit unmöglich ist, das Virus in einem Zellkultursystem zu replizieren und es ein Mangel an Reagenzien zur Detektion einer Norovirus Infektion gibt. Die Forschung an humanem Norovirus stellt eine beträchtliche Herausforderung dar, da es zurzeit sowohl an einem Zellkultursystem zur Replikation des Virus als auch an Reagenzien zur Detektion des Virus mangelt. Das primäre Ziel der nachfolgenden Thesis ist die Generierung von Antikörpern gegen Norovirus Proteine. Der *Escherichia coli* Strang BL21 (DE3) wurde als Wirt ausgewählt, um die rekombinanten Proteine zu generieren und die Norovirus Proteine NS5, NS6, NS7, VP1 und VP2 wurden erfolgreich synthetisiert. Die Proteine wurden dann mittels immobilisierter Metall-Affinitätschromatographie gereinigt und die eluierten Fraktionen mit der reinsten und höchsten Proteinkonzentration wurden zur Immunisierung von Meerschweinchen verwendet. Das so erhaltene Serum wurde isoliert und getestet, um zu beweisen, ob Antikörper gegen die jeweiligen Norovirus Proteine vorhanden waren. Die Herstellung von Antikörpern gegen die Norovirus Proteine NS5, NS6, NS7, VP1 und VP2 war erfolgreich. Es wurde gezeigt, dass sie im Western Blot in einer 1:2000 Verdünnung weniger als 0.5 µg Norovirus Protein detektieren können, und im Immunfluoreszenz-Assay in einer 1:5000 Verdünnung verwendet werden können. Mit den neu generierten Antikörpern ist es fortan möglich neuartige Experimente zur weiteren Forschung der Norovirus-Biologie zu durchzuführen.

Das zweite Ziel dieser Thesis besteht in der Untersuchung einer möglichen Funktion des humanen Norovirus, das angeborene Immunsystem modulieren zu können. In anderen Studien wurde gezeigt, dass das murine Norovirus NS1 Protein eine mögliche Rolle in der Umgehung der Interferon λ gemittelten antiviralen Immunabwehr spielt und eine D94E Mutation im murinen Norovirus NS1/2 Protein eine Veränderung der Art der Infektion bewirkt, die von einer akuten zu einer chronischen Infektion führt. Dies suggeriert, dass die Aminosäure an der 94. Stelle vom NS1/2 ein bestimmender Faktor für das NS1/2 Proteins ist, damit es die Interferon λ gemittelte antivirale Immunabwehr umgehen kann. Um dies zu beweisen, wurden humane Norovirus Stränge von verschiedenen Ausbrüchen miteinander verglichen. Dies hat gezeigt, dass das humane Norovirus, ähnlich wie beim murinen Norovirus, an Stelle 94 vom NS1/2 Protein zwischen einer Asparaginsäure und einer Glutaminsäure variiert. In Anbetracht dieser Ergebnisse, wurde direkt getestet, ob NS1/2 94D oder NS1/2 94E die Induktion einer Immunreaktion beeinflussen können. Dabei wurden Zellen, die entweder NS1/2 94D oder NS1/2 94E exprimieren mit Reovirus infiziert und im Anschluss deren Immunantwort gewertet. Die ersten Ergebnisse zeigten eine Minderung in der Immuninduktion, aber weitere Ergebnisse deuteten darauf hin, dass das humane Norovirus NS1/2 Protein die Replikation-/Infektionsrate des Reovirus vielleicht hemmen könnte und darüber hinaus zu einer Minderung der Immunantwort geführt hat. Um die vermeintliche Hemmung des Norovirus NS1/2 Proteins

über die Interferon Produktion beweisen zu können, wurde Polyinosinic-polycytidylic-Säure (pIC), ein replikationsunabhängiger, doppelsträngiger Ribonukleinsäure Imitator, den NS1/2 exprimierenden Zellen gegeben. Nach der Gabe von pIC war eine stärkere Hemmung der Produktion von Interferon und Interferon induzierten Protein mit Tetratricopeptidwiederholungen (IFIT) durch das NS1/2 94 E als das NS1/2 94 D Protein zu sehen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das NS1/2 94 E Protein wahrscheinlich eine stärkere Inhibition des vesikulären Transports von Proteinen und Zytokinen als das NS1/2 94D Protein bewirken kann, und dadurch zu einer chronischen Infektion führen kann. Dies wurde nicht schlüssig bewiesen, da die Kontroll-Zellen nicht mit einem Kontroll-Plasmid transfiziert wurden und die Inhibition der Immunantwort auch durch die Transfektion mit dem NS1/2 Plasmid hervorgerufen werden könnte. Obwohl noch bewiesen werden muss, ob das NS1/2 Protein durch seine Interaktion mit dem vesikulären Transport die Immunabwehr modulieren kann, handelt es sich um einen bekannten Mechanismus anderer enterischer Viren. Dieser sollte, zusammen mit anderen Mechanismen, die möglicherweise die Immunität modulieren, weiter erforscht werden.