

- Zusammenfassung -

Christina Kaufman

Dr. med.

Synthesis of putative extracellular domains of sodium-taurocholate cotransporting polypeptide and assessment of their impact on hepatitis B virus infection and use for the production of specific antibodies

Fach/ Einrichtung: Hygiene

Doktorvater: Prof. Dr. Stephan Urban

Das Hepatitis-B-Virus und sein Satellitenvirus Hepatitis-Delta-Virus sind die wichtigsten Erreger der viralen Hepatitis. Beide dringen über den hepatozytenspezifischen Rezeptor Natrium-Taurocholate Cotransporting Polypeptide in die Zielzelle ein. Bulevirtide (früher Myrcludex B), ein vom viralen L-Protein abgeleitetes myristoyliertes Peptid, wird derzeit in klinischen Studien untersucht und kann als Prototyp eines Entryinhibitors angesehen werden, der die Aufnahme des Virus durch Bindung an Natrium-Taurocholate Cotransporting Polypeptide verhindert. Einige wichtige Domänen welche an der Interaktion zwischen dem Virus/ bulevirtide und dem Rezeptor beteiligt sind, wurden bereits beschrieben.

Ziel dieses Projekts war es, noch mehr über diese Interaktion zu lernen und möglicherweise zusätzliche primäre Bindungsstellen im Natrium-Taurocholate Cotransporting Polypeptide zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurden Peptide von den extrazellulären Domänen des Natrium-Taurocholate Cotransporting Polypeptide abgeleitet und auf ihren Einfluss auf die Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus als sogenannte "lösliche Rezeptoren" untersucht. Da zum Zeitpunkt der Studie keine strukturellen Daten des Rezeptors vorlagen, wurde mit Hilfe eines *in silico*-Vorhersagetools ein Modell des humanen Natrium-Taurocholate Cotransporting Polypeptide erstellt. Entsprechend diesem Modell wurden insgesamt sechs extrazelluläre Domänenpeptide, so genannte Loop-Peptide, entworfen. Loop 1 entspricht dabei dem N-Terminus des Transporters und die Loops 2-5 repräsentieren die übrigen extrazellulären Domänen. Ein zusätzliches Peptid mit der Bezeichnung 3b wurde ebenfalls hergestellt: Die Sequenz überlappt teilweise mit dem Loop 3, reicht jedoch weiter in die Transmembrandomäne hinein und deckt zusätzlich die Hepatitis-B-Virus-Interaktionsstelle ab. Im Jahr 2022 wurden die 3D Struktur des Rezeptors mittels Kryoelektronenmikroskopie aufgedeckt, die vorhergesagte Struktur mit 9 Transmembrandomänen und 5 extrazellulären Regionen wurde dabei bestätigt. Die auf der Grundlage des Modells entworfenen Peptide stimmen mit den extrazellulären Domänen überein, reichen jedoch weiter in die Transmembranbereiche hinein als zuvor vorhergesagt.

Alle designten Loop-Peptide wurden erfolgreich mittels Festphasen-Peptidsynthese hergestellt, wobei leichte Modifikationen erforderlich waren, um ausreichend reine Loops 3 und 3b herzustellen. Von jedem Peptid wurde eine native Form und eine myristoylierte Form hergestellt, in der Annahme, dass die native Form als "löslicher Rezeptor" im Überstand wirken kann, während die myristoylierte Version die natürliche Situation nachahmt, indem sie an der Membrangrenzfläche interagiert. Alle Peptide mit Ausnahme des myristoylierten Loop 4, das in allen getesteten Lösungen völlig unlöslich war, wurden erfolgreich mit präparativer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit einer Reinheit >95% hergestellt.

Die nicht modifizierten und N-Terminal myristoylierten Loop Peptide wurden im Hepatitis B-Virus Infektionsassay untersucht. Von den elf Peptiden zeigte nur eines der myristoylierten Peptide, M3b, welches von der zuvor beschriebenen Virusinteraktionsstelle abgeleitet ist, eine konzentrationsabhängige Inhibition der Hepatitis-B-Virus Infektion. Die halbmaximale Hemmkonzentration lag bei 4,94 μM . Eine Wirkung auf die intrinsische Rezeptorfunktion als Taurocholat-Transporter konnte ausgeschlossen werden, was auf einen alternativen Wirkmechanismus als dem von bulevirtide hinweist.

Um diesen Effekt näher zu untersuchen, wurden zwei zusätzliche, als Negativkontrollen intendierte, Peptide synthetisiert. Eines ist von der nicht an Hepatitis-B-Virus bindenden Natrium Taurocholate Cotransporting Polypeptide Sequenz vom Cynomolgus-Affen abgeleitet (CM3b) und das andere besteht aus einer zufällig angeordneten Sequenzfolge des M3bPeptids (ScrM3b). Beide Kontrollpeptide zeigten eine vergleichbare Inhibition der Hepatitis B Virus Infektion. Potentielle zytotoxische Effekte konnten mit zwei verschiedenen Zytotoxizitätstests ausgeschlossen werden. Eine Analyse der Zusammensetzung und Sekundärstruktur der drei Peptide mit Hilfe verschiedener Online-Tools ergab eine domänenartige Organisation der Peptide mit einer hydrophilen, positiv geladenen, gecoilten Region am N-Terminus und einer hydrophoben C-terminalen Domäne. Dies deutete auf einen alternativen, möglicherweise unspezifischen Inhibitionsmechanismus hin. Diese Hypothese wurde durch Beobachtungen eines kooperierenden Labors unterstützt, die eine ähnliche Wirkung der drei Peptide auf die Infektion mit dem behüllten Herpes simplex Virus Typ 2 zeigen konnten. Weitere Untersuchungen sind notwendig um den Wirkmechanismus besser zu verstehen und um zu evaluieren ob die Peptide möglicherweise als antivirale Breitspektrum-Medikament eingesetzt werden können.

In einem zweiten Teilprojekt wurden die zuvor synthetisierten Natrium-Taurocholate Cotransporting Polypeptide -abgeleiteten Peptide N-Terminus mit Biotin modifiziert und in einer Streptavidin-Bead-basierten Phagen-Display Methode von unserem Kollaborationspartner verwendet, um receptorspezifische Antikörper zu erzeugen. Insgesamt wurden 6 verschiedene Antikörper gegen die biotinylierten Loop-Peptide 1, 3, 3b und 5 für weitere Tests bereitgestellt. Zusätzlich wurden 3 Antikörper, die gegen Natrium-Taurocholat Cotransporting Polypeptid-überexprimierende Zellen generiert wurden, zur Verfügung gestellt.

Die Antikörper wurden in Konzentrationen von bis zu 10 $\mu\text{g/ml}$ im Taurocholataufnahme- und Hepatitis-B-Virus-Infektionsassay getestet. Keiner der Antikörper zeigte eine Wirkung auf die Transportfunktion des Rezeptors oder auf die Virusinfektion. Um zu überprüfen, ob die Antikörper zum immunologischen Nachweis von Natrium-Taurocholate Cotransporting Polypeptide für Forschungszwecke verwendet werden könnten, wurden die Antikörper in einem Immunfluoreszenztest auf nativen und fixierten Zellen sowie im Western Blot getestet. In allen Assays zeigte keiner der getesteten Antikörper eine spezifische Interaktion. Eine mögliche Erklärung für die nicht funktionierenden Anti-Loop-Antikörper wäre, dass lineare Peptide, die von den extrazellulären Domänen eines Membranrezeptors abgeleitet sind, nicht die tatsächliche in vitro/ in vivo-Situation widerspiegeln. Die Peptide könnten in wässriger Lösung eine andere Konformation einnehmen, als wenn sie in die hydrophile/ hydrophobe Grenzfläche der Membran eingebettet sind. Bei Loop 1 könnte zudem die fehlende N-Glykosylierung die Nichtdetektion des nativen Rezeptors durch Loop-1-spezifische Antikörper erklären. In Zukunft könnte dies durch eine zusätzliche Myristoylierung der Peptide und eine Präsentation der Peptide in einer liposomalen Formulierung verbessert werden.