

Joanna Caroline Bellos
Dr. med.

Herstellung und Aufreinigung eines rekombinanten Hepatitis C Nichtstrukturproteins 4B und dessen Einsatz zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen auf viraler und zellulärer Ebene

Geboren am 01.03.1976 in Karlsruhe
Staatsexamen am 29.04.2003 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. J. Encke

Weltweit sind etwa 170 Millionen Menschen chronisch mit dem Hepatitis C Virus (HCV) infiziert. Durch ihre möglichen Spätfolgen zählt die Infektion mit HCV zu den Hauptursachen von Leberzirrhose und hepatozellulärem Karzinom (HCC). Bis zum heutigen Tag existiert weder eine effiziente Therapie der Erkrankung noch war es möglich, einen Impfstoff zur Verfügung zu stellen.

HCV gehört der Familie der Flaviviridae an und sein Genom kodiert ein ca. 3000 Aminosäuren langes Vorläuferprotein, welches durch zelluläre und virale Proteasen in 10 unterschiedliche Proteine gespalten wird. Das Nichtstrukturprotein 4B ist das am wenigsten bekannte Protein des HCV-Genoms. Hierbei handelt es sich um ein sehr hydrophobes Protein, dessen Funktion bislang gänzlich unklar ist. Bei verwandten Virusfamilien, wie z.B. dem Kunjin Virus, ist eine *cis* Expression dieses Proteins für die Virusreplikation essentiell.

In dieser Arbeit wurde ein System zur Herstellung größerer Quantitäten an rekombinantem NS4B etabliert um ein reines, isoliertes Protein für die weitere Forschung zur Verfügung zu stellen. Hierzu diente ein Bakulovirusexpressionssystem, welches eine möglichst physiologische Bedingung zur Expression der rekombinanten Produkte, im Sinne von eukaryontischen posttranslationalen Prozessen, darstellt und die Aufreinigung über unterschiedlichste Verfahren der Isolationstechnik von Proteinen. Es gelang, ein absolut reines Protein in hoher Quantität herzustellen, was über Immundetektion im Western Blot Verfahren verifiziert wurde.

Im weiteren Verlauf wurde das isolierte und gereinigte Protein mit humanen Hepatozyten, die sowohl radioaktiv markiertes S³⁵-Methionin verstoffwechselt hatten als auch mit HCV-Vollängenkonstrukten einschließlich p53-Konstrukten transfiziert waren, inkubiert um mögliche Interaktionspartner im Rahmen von Protein-Protein-Interaktionen zu isolieren. Die durchgeführten Versuche erbrachten nur einen vagen Anhalt für mögliche spezifische Partnerproteine, welche aus der HepG2 und der Huh7 Zellreihe stammen könnten und ein Molekulargewicht von 20-30 kD bzw. 50 kD und 70 kD aufweisen. Da diese Spezifität jedoch einerseits nicht in allen Versuchen nachzuvollziehen war und andererseits auch durch eine geringe Quantität und Qualität nicht eindeutig zu beurteilen war, ist anzunehmen, dass es sich einerseits um instabile vorübergehende Verbindungen handelt, die NS4B mit seinen jeweiligen Interaktionspartnern eingeht, und andererseits liegt die Vermutung nahe, dass NS4B keinen spezifischen Bindungspartner hat, sondern mit mehreren Faktoren kooperiert. Zusätzlich wurde im Rahmen dieser Arbeit ein monoklonaler Antikörper gegen NS4B hergestellt. Dieser Kaninchen-Antikörper bindet spezifisch NS4B, so dass er für weitere Versuche eine optimale Voraussetzung zur Immundetektion von NS4B darstellt. Somit wurden einige Grundlagen zum weiteren Verständnis in der Erforschung des NS4B geschaffen, die eine Unterstützung für die weitere Arbeit an HCV-Proteinen darstellen.