

Zusammenfassung

Kobra Venom Faktor (CVF) ist das Komplement-aktivierende Protein im Gift der indischen Kobra (*Naja naja kaouthia*). CVF ist ein strukturelles und funktionelles Analogon zu der aktivierten Komplementkomponente C3b und bildet wie C3b eine C3- und C5-Konvertase. Im Gegensatz zu dem C3-abhängigen Enzym (C3b,Bb), besitzt das CVF-abhängige Enzym (CVF,Bb) größere physikochemische Stabilität, ist aktiv in der flüssigen Phase und wird nicht durch die Komplementfaktoren H und I reguliert.

Um die Struktur/Funktionsbeziehung von CVF zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit fünf hybride Proteine hergestellt, indem molekularbiologisch Segmente der CVF cDNA durch homologe Kobra C3 cDNA ersetzt wurde, so daß insgesamt die vollständige CVF Sequenz abgedeckt wurde.

CVF und die CVF/Kobra C3 cDNA Konstrukte wurden rekombinant mit dem Baculovirus-Expressionssystem in Insektenzellen exprimiert. Die Hybridproteine wurden anschließend aus dem Kulturüberstand über eine zweistufige Ionenaustauschchromatographie gereinigt. Die Hefe *Pichia pastoris* wurde als alternatives Expressionssystem für CVF untersucht. Es zeigte sich, daß trotz korrekter Transkription der CVF cDNA keine nachweisbare Proteinexpression erfolgte. Die Eignung von *Pichia pastoris* zur sekretorischen Expression einzelner CVF-Ketten oder Proteindomänen konnte jedoch durch die erfolgreiche Expression der CVF β - und γ -Kette demonstriert werden.

Die funktionale Aktivität der hybriden Proteine wurde mit dem Komplementverbrauchstest und dem hämolytischen Test untersucht. Außerdem wurde die C3-Konvertase Bildung, die Faktor B-Bindungseigenschaften und die Stabilität der gebildeten C3-Konvertasen überprüft. Natives Kobra C3 selbst zeigte keine Bindung und Aktivierung von humanem Faktor B.

Es konnte gezeigt werden, daß die Substitution der 550 Aminosäuren am N-Terminus von CVF, die fast die gesamte CVF α -Kette darstellen, durch C3 keinen Einfluß auf die funktionale Aktivität, die C3-Konvertase Bildung und die Faktor B-Bindung hatten. Allerdings reduzierte sich die Stabilität der gebildeten C3-Konvertase. Die Substitution eines Großteils der CVF γ -Kette durch C3 hatte keinen Effekt auf die C3-Konvertase Aktivität, Stabilität und die Faktor B Bindung, reduzierte aber selektiv die C5-Konvertase Aktivität. Das Ersetzen der CVF β -Kette oder des Zwischenbereichs der CVF β - und γ -Kette („C3d“-Region) durch C3 führte zu einem deutlichen Verlust der C3/C5-Konvertase Aktivität, reduzierter C3-Konvertase Bildung und verminderter Faktor B Bindung. Die Ergebnisse legen nahe, daß Sequenzen innerhalb der CVF β - und CVF γ -Kette Kontaktstellen für Faktor B und C5 bereitstellen und für die Bildung der stabilen C3-Konvertase essentiell sind.