

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Das Hepatitis-B-Virus (HBV) | 1 |
| 1.1.1 Epidemiologie und Pathogenese | 1 |
| 1.1.2 Prävention, Diagnose und Therapie | 3 |
| 1.1.3 Klassifizierung | 5 |
| 1.1.4 Aufbau des Viruspartikels | 6 |
| 1.1.5 HBV-Genom | 8 |
| 1.1.6 Oberflächenproteine (HBsAg) | 10 |
| 1.1.6.1 SHBsAg | 10 |
| 1.1.6.2 MHBsAg | 10 |
| 1.1.6.3 LHBsAg | 10 |
| 1.1.7 Lebenszyklus von HBV | 11 |
| 1.2 Intrazellulärer Vesikeltransport | 13 |
| 1.2.1 Rab-Proteine | 13 |
| 1.2.2 SNARE-Komplex | 13 |
| 1.2.3 NSF und SNAP | 15 |
| 1.2.4 Sec1/Munc18 (SM)-Proteine | 15 |
| 1.3 ESCRT-System | 15 |
| 1.4 ESCRT und HBV | 18 |
| 1.5 α -Taxilin | 20 |
| 2 Zielsetzung | 21 |
| 3 Material | 22 |
| 3.1 Bakterienstämme und Zelllinien | 22 |
| 3.1.1 Bakterienstämme | 22 |
| 3.1.2 Zelllinien | 22 |
| 3.2 Mäuse | 23 |
| 3.3 Gewebeproben | 23 |
| 3.4 Plasmide | 23 |
| 3.4.1 Kommerziell erhältliche Plasmide | 23 |
| 3.4.2 Hergestellte Plasmide | 23 |

| | |
|---|-----------|
| 3.5 Oligonukleotide | 24 |
| 3.6 Antikörper | 24 |
| 3.7 Größenstandards | 26 |
| 3.8 Enzyme | 26 |
| 3.9 Reagenzien für die Zellkultur | 26 |
| 3.10 Inhibitoren | 27 |
| 3.11 Chemikalien | 27 |
| 3.12 Verwendete Kits | 28 |
| 3.13 Geräte | 28 |
| 3.13.1 Elektrophorese- und Blotsysteme | 28 |
| 3.13.2 Mikroskope | 28 |
| 3.13.3 Software | 29 |
| 3.13.4 PCR Cycler | 29 |
| 3.13.5 Zentrifugen | 29 |
| 3.13.6 Sonstige | 29 |
| 3.14 Puffer, Lösungen und Medien | 30 |
| 3.15 Verbrauchsmaterialien | 32 |
| 4 Methoden | 34 |
| 4.1 Zellbiologische Methoden | 34 |
| 4.1.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> | 34 |
| 4.1.2 Kultivieren und Passagieren von eukaryotischen Zellen | 34 |
| 4.1.3 Transfektion von Expressionsplasmiden | 34 |
| 4.1.4 Ernte und Lyse von eukaryotischen Zellen | 35 |
| 4.1.4.1 Proteinlysate | 35 |
| 4.2 Molekularbiologische Methoden | 35 |
| 4.2.1 Gewinnung kompetenter <i>E. coli</i> | 35 |
| 4.2.2 Transformation von <i>E. coli</i> mit rekombinanter DNA | 35 |
| 4.2.3 Präparation und Konservierung von Plasmiden | 36 |
| 4.2.4 Quantifizierung isolierter Plasmid-DNA | 36 |
| 4.2.5 Agarosegelektrophorese und Reinigung der DNA | 36 |
| 4.2.6 RNA-Isolierung | 37 |
| 4.2.7 cDNA-Synthese | 37 |
| 4.2.8 Real-time PCR (RT-PCR) | 37 |
| 4.3 Proteinbiochemische Methoden | 38 |
| 4.3.1 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford Assay | 38 |
| 4.3.2 SDS-Polyacrylamidgelektrophorese (SDS-PAGE) | 38 |
| 4.3.3 Western-Blot-Analyse (WB-Analyse) | 39 |
| 4.4 Immunologische Methoden | 40 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 4.4.1 | Coimmunpräzipitation (Co-IP) | 40 |
| 4.4.2 | Indirekte Immunfluoreszenz (IF) | 40 |
| 4.4.3 | <i>Enzym-linked-immunosorbent-assay (ELISA)</i> | 41 |
| 4.5 | Mikroskopie | 41 |
| 4.5.1 | Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) | 41 |
| 4.6 | Methoden zur Charakterisierung HBV-transgener Mäuse | 41 |
| 4.6.1 | Serumgewinnung von Mäusen | 41 |
| 4.6.2 | Messung von ALT und AST | 42 |
| 4.6.3 | Gewinnung von Organen | 42 |
| 4.6.4 | Präparation von Organlysaten | 42 |
| 4.6.5 | Isolierung von RNA aus Lebergewebe | 42 |
| 4.6.6 | Paraffinpräparate und Färbeverfahren | 42 |
| 4.6.7 | Immunfärbung von Paraffinschnitten | 43 |
| 5 | Ergebnisse | 44 |
| 5.1 | Erhöhte Mengen α -Taxilin in HBV-exprimierenden Zellkulturen | 44 |
| 5.2 | Erhöhte Mengen von α -Taxilin <i>in vivo</i> | 46 |
| 5.2.1 | Expression von α -Taxilin in HBV-transgenen Mäusen | 46 |
| 5.2.2 | Expression von α -Taxilin in HBV-infizierten Patienten | 50 |
| 5.3 | Überexpression von α -Taxilin | 52 |
| 5.4 | <i>Knockdown</i> von α -Taxilin | 53 |
| 5.5 | Colokalisation von HBV mit α -Taxilin | 55 |
| 5.6 | Interaktion zwischen α -Taxilin und LHBs | 56 |
| 5.7 | Interaktion zwischen gereinigtem α -Taxilin und der PreS1PreS2-Domäne | 57 |
| 5.8 | Einfluss von α -Taxilin auf die Expression von Komponenten des ESCRT-Systems | 58 |
| 5.9 | α -Taxilin colokalisiert mit tsg101 | 60 |
| 5.10 | Interaktion zwischen α -Taxilin und tsg101 | 61 |
| 6 | Diskussion | 63 |
| 7 | Summary | 70 |
| 8 | Zusammenfassung | 73 |
| 9 | Abkürzungen | 87 |
| 10 | Publikationsverzeichnis | 89 |
| 11 | Danksagung | 90 |