

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Literaturübersicht.....	3
2.1	Das Hepatitis C-Virus (HCV) und die assoziierte Hepatitis	3
2.1.1	Epidemiologie	3
2.1.2	Geschichte und Taxonomische Einordnung	4
2.1.3	Morphologie, Genomaufbau und Proteinbiosynthese.....	4
2.1.4	Übertragung.....	6
2.1.5	Immunantwort.....	7
2.1.5.1	Die Immunantwort allgemein	7
2.1.5.2	Immunantwort bei einer HCV-Infektion	12
2.1.5.2.1	Humorale Immunantwort	12
2.1.5.2.2	Zelluläre Immunantwort	13
2.1.6	Klinik, Verlaufsformen und Diagnose.....	14
2.1.7	Therapie.....	16
2.2	HCV-Vakzine	18
2.2.1	Stand der Forschung	18
2.2.2	Virus like Particles (VLPs) – HBV core als Epitopträger	20
2.2.2.1	Struktur des HBV	21
2.2.2.2	Das HBV core-Protein (HBcAg) und seine Modifikationen	21
2.3	Zellpermeable Peptide.....	23
2.3.1	Membranen.....	23
2.3.2	Eigenschaften und Synopsis bedeutender zellpermeabler Peptide	24
2.3.2.1	Antennapedia-Homöodomäne	26
2.3.2.2	HIV-Tat-Protein	26
2.3.2.3	Kaposi-Fibroblasten-Wachstumsfaktor	27
2.3.2.4	Transportan.....	27
2.3.2.5	VP22.....	27
2.3.3	Das Translokationsmotiv (TLM).....	28
3	Material und Methoden.....	30
3.1	Material.....	30
3.1.1	Virus-DNA.....	30
3.1.1.1	Hepatitis C-Virus.....	30
3.1.1.2	Baculovirus	30

3.1.2	Zelllinien und Bakterienstämme.....	30
3.1.2.1	Eukaryotische Zellen.....	30
3.1.2.2	Prokaryotische Zellen	30
3.1.3	Mäuse.....	31
3.1.4	Plasmide.....	31
3.1.5	Oligonukleotide.....	31
3.1.6	Enzyme zum Klonieren.....	32
3.1.7	Antikörper	32
3.1.8	DNA- und Proteinmarker	33
3.1.9	Inhibitoren	33
3.1.10	Komponenten für die Zellkultur.....	33
3.1.11	Komponenten für die Bakterienkultur	33
3.1.12	Kitsysteme	34
3.1.13	Chemikalien.....	34
3.1.14	Verbrauchsmaterial.....	35
3.1.15	Geräte.....	36
3.1.16	Bilderstellung.....	37
3.1.17	Software.....	37
3.1.18	Puffer und Lösungen	37
3.2	Methoden.....	42
3.2.1	Molekularbiologie.....	42
3.2.1.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien.....	42
3.2.1.2	Transformation kompetenter Bakterien.....	42
3.2.1.3	Plasmid-DNA-Isolierung.....	42
3.2.1.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	43
3.2.1.5	Agarose-Gelelektrophorese	43
3.2.1.6	Restriktionsverdau	43
3.2.1.7	Präparative DNA-Fragmentisolierung.....	44
3.2.1.8	Dephosphorylierung von Vektor-DNA.....	44
3.2.1.9	Ligation von DNA.....	44
3.2.1.10	DNA-Reinigung.....	44
3.2.1.11	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	44
3.2.1.11.1	Analytische PCR.....	45
3.2.1.11.2	Präparative PCR.....	46
3.2.1.12	DNA-Sequenzierung.....	46

3.2.2	Zellkultur	46
3.2.2.1	Zellzählung.....	46
3.2.2.2	Sf9-Zellen.....	46
3.2.2.2.1	Kultivierung von Sf9-Zellen.....	46
3.2.2.2.2	Co-Transfektion von Sf9-Zellen	47
3.2.2.2.3	Virusamplifizierung und Infektion von Sf9-Zellen.....	47
3.2.2.3	Huh7.5-Zellen	48
3.2.2.3.1	Kultivierung von Huh7.5-Zellen.....	48
3.2.2.3.2	Membranpermeabilitätstest in Huh7.5-Zellen	48
3.2.3	Proteinbiochemie	48
3.2.3.1	Synthese rekombinanter Proteine.....	48
3.2.3.1.1	Proteinproduktion durch Sf9-Zellen	48
3.2.3.1.2	Proteinproduktion in E-coli-Induktionskulturen	48
3.2.3.2	Reinigung von rekombinanten Proteinen.....	49
3.2.3.2.1	Lyse	49
3.2.3.2.2	Strep-Tag Affinitätschromatografie	49
3.2.3.2.3	Gelfiltration.....	49
3.2.3.2.4	Dichtegradientenzentrifugation	49
3.2.3.2.5	Konzentrierung von Proteinlösungen.....	50
3.2.3.2.6	Dialyse.....	50
3.2.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	50
3.2.3.4	TCA-Fällung.....	50
3.2.3.5	Nachweis von Proteinen	51
3.2.3.5.1	SDS-PAGE	51
3.2.3.5.2	Silberfärbung von Polyakrylamidgelen	51
3.2.3.5.3	Westernblot.....	52
3.2.3.5.4	Immunfluoreszenzmikroskopie	53
3.2.3.5.5	HBeAg ELISA	54
3.2.3.5.6	Elektronenmikroskopie	54
3.2.3.6	Funktionalität der rekombinanten Proteine	54
3.2.3.6.1	Membranpermeabilitätsversuch in Huh7.5-Zellen	54
3.2.3.6.2	Membranpermeabilitätstest in Mäusen	55
3.2.3.6.3	Immunisierung von Mäusen.....	55
4	Ergebnisse.....	56
4.1	Generierung der HBc-VLP-Konstrukte im Baculovirus-Sf9-Expressionssystem	56
4.1.1	Herstellung der pBacPAK9-Konstrukte.....	56
4.1.1.1	2xTLM, Strep-Tag, leader, core 1-184, 6xHIS (HBV core 1-184-Konstrukt)....	56

4.1.1.2	2xTLM,Strep-Tag,leader,core 1-78,E2a,core 79-184,6xHIS (HBV core 1-184, E2a-Konstrukt)	57
4.1.1.3	2xTLM,Strep-Tag,leader,core 1-78,E2_1,79-184,6xHIS (HBV core 1-184, E2_1-Konstrukt)	58
4.1.1.4	2xTLM,Strep-Tag,leader,core 1-78,E2_1,79-184,6xHIS (HBV core 1-184, E2_3-Konstrukt)	58
4.1.2	Nachweis der Infektion	59
4.1.3	Nachweis der Proteinsynthese	60
4.1.3.1	Nachweis der Proteinsynthese im Westernblot	60
4.1.3.2	Nachweis der Proteinsynthese durch HBeAg ELISA	61
4.1.3.3	Nachweis der Proteinsynthese durch Immunfluoreszenzmikroskopie	62
4.1.4	Proteinreinigung und -charakterisierung	64
4.1.4.1	Anreicherung des Fusionsproteins durch Strep-Tag Affinitätschromatografie	64
4.1.4.2	Isolierung von assemblierten Kapsiden durch Gelfiltrationschromatografie	66
4.2	Generierung der HBc-VLP-Konstrukte im <i>E. coli</i> -Expressionssystem	69
4.2.1	Herstellung der pet24d(+)-Konstrukte	69
4.2.1.1	2xTLM,Strep-Tag,leader,core 1-151,6xHIS (HBV-core 1-151-Konstrukt) ..	69
4.2.1.2	2xTLM,Strep-Tag,leader,core 1-78,E2a,core 80-151,6xHIS (HBV-core 1- 151, E2a-Konstrukt)	69
4.2.2	Proteinsynthese – strukturelle Charakterisierung	70
4.2.2.1	Evaluierung der besten Konditionen zur Optimierung der Partikelausbeute	70
4.2.2.1.1	Nachweis von HBV core 1-151- und HBV core 1-151, E2a- Fusionsproteinen in nativ hergestellten Zelllysaten	71
4.2.2.1.2	Nachweis von HBV core 1-151- und HBV core 1-151, E2a- Fusionsproteinen in denaturierend hergestellten Dialysaten	72
4.2.2.1.3	Beste Partikelausbeute in Rosetta-Lysat bei 37 °C	74
4.2.2.2	Proteinsynthese und Nachweis der Proteinsynthese	77
4.2.3	Proteinreinigung unter nativen Bedingungen	77
4.2.3.1	Anreicherung des Fusionsproteins durch Strep-Tag Affinitätschromatografie	77
4.2.3.1.1	Strep-Tag Reinigung des HBV core 1-151-Fusionsproteins	78
4.2.3.1.2	Strep-Tag Reinigung des HBV core 1-151, E2a-Fusionsproteins	80
4.2.3.2	Isolierung und Charakterisierung von assemblierten Kapsiden durch Gelfiltrationschromatografie	81

4.2.3.2.1	Nachweis von HBV core 1-151-Partikeln.....	82
4.2.3.2.2	Nachweis von HBV core 1-151, E2a-Partikeln	84
4.2.4	Proteinfunktionalität – Zellbiologische Charakterisierung	85
4.2.4.1	Nachweis der Membranpermeabilität generierter VLPs <i>in vitro</i>	85
4.2.4.2	Nachweis der Membranpermeabilität generierter VLPs <i>in vivo</i>	87
4.2.4.3	Induktion einer Immunantwort in Mäusen	88
5	Diskussion	89
5.1	Generierung, Reinigung und strukturelle Charakterisierung der VLPs.....	89
5.1.1	Wahl des Expressionssystems und Proteinsynthese	89
5.1.1.1	Baculovirus-Sf9-Expressionssystem.....	90
5.1.2	E. coli-Expressionssystem	91
5.1.3	Proteinreinigung.....	94
5.1.3.1	pBacPAK9-Konstrukte	94
5.1.3.2	pet24a(+)-Konstrukte	95
5.1.4	Proteinnachweis	96
5.1.4.1	Spezifität HBeAg ELISA.....	96
5.1.4.2	Spezifität HBc-Antikörper.....	97
5.1.4.3	Nachweis der generierten VLPs	97
5.2	Zellbiologische Charakterisierung der generierten VLPs.....	98
5.2.1	Zellpermeabilität	98
5.2.2	Induktion einer Immunantwort	99
5.2.2.1	Induktion einer B-Zellantwort	100
5.3	Ausblick: Zellpermeable HBV-LPs mit HCV-Epitopen als HCV-Vakzine.....	100
6	Zusammenfassung	103
7	Summary	104
8	Literaturverzeichnis	105
9	Danksagung	121
10	Selbstständigkeitserklärung	122