

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 Membranpermeabilitästest 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	Summery	104
8	Literaturverzeichnis	105
9	Danksagung	121
10	Selbstständigkeitserklärung	122