

CELL PERMEABLE NUCLEOCAPSIDS AS A NOVEL TOOL
FOR EFFICIENT GENE TRANSFER & HBV BIOLOGY

INAUGURAL DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN
DR. RER. NAT.



DES FACHBEREICHS
BIOLOGIE, CHEMIE UND PHARMAZIE
DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

VORGELEGT VON

BOERRIES BRANDENBURG

AUS BERLIN

IM FEBRUAR 2005

**SELBST EIN WEG VON TAUSEND MEILEN
BEGINNT MIT EINEM SCHRITT.**

MEINEN ELTERN & ANGELA

DIE EXPERIMENTELLEN ARBEITEN WURDEN IN DER ZEIT VON JANUAR 2002 BIS DEZEMBER 2004 IM ROBERT KOCH-INSTITUT UNTER ANLEITUNG UND IN DER ARBEITSGRUPPE VON HERRN DR. EBERHARD HILDT DURCHGEFÜHRT.

1. GUTACHTER: PROF. DR. GEORG PAULI

2. GUTACHTER: PROF. DR. VOLKER ERDMANN

DISPUTATION AM: 03. JUNI 2005

I	ZUSAMMENFASSUNG / ABSTRACT	1
I.1	GENTRANSFER	1
I.2	HBV BIOLOGIE	2
I.3	GENE TRANSFER	3
I.4	HBV BIOLOGY	4
II	INTRODUCTION	5
II.1	NON VIRAL GENE TRANSFER	5
II.1.1	Learning from virus	6
II.1.2	Cell permeable peptides	7
II.1.3	Translocation motif - TLM	10
II.1.4	Relevance of TLM for the life cycle of HBV	11
II.2	HEPATITIS B VIRUS	13
II.2.1	Systems used for the study of HBV infection	14
II.2.2	Structure of HBV	15
II.2.2.1	Overview.....	15
II.2.3	Life cycle of HBV	16
II.2.4	HBV genome organization.....	18
II.2.5	HBV transcripts	20
II.2.6	Hepatitis B capsid.....	20
II.2.6.1	Assembly of HBV capsid	23
II.2.7	Surface proteins.....	25
II.2.8	HBV polymerase.....	26
II.2.8.1	Epsilon (ϵ) signal	26
II.2.9	Regulatory protein - HBx	29
II.3	EARLY STEPS OF VIRAL INFECTION	29
II.3.1	Intracellular Transport	30
II.3.2	Nuclear import.....	31
II.4	AIM OF THE STUDY	33
III	RESULTS	35
III.1	BACTERIA DERIVED NUCLEOCAPSID	35
III.1.1	Generation of cell permeable core particles	35
III.1.2	Cell permeability of the TLM capsid	38
III.1.3	<i>In vitro</i> packaging of nucleic acid into capsids.....	41
III.2	INSECT CELL DERIVED NUCLEOCAPSID	47
III.2.1	Generation of double TLM capsids.....	47
III.2.2	Cell permeability of double TLM capsid	48
III.2.3	Time course of inverse double TLM ₁₈₃ translocation	50
III.2.4	Permeability of inverse double TLM ₁₈₃ in living cells	52
III.2.5	Non-endocytotic uptake of cell permeable inverse double TLM ₁₈₃	53
III.2.6	Translocation behavior at different temperatures	55
III.2.7	Model of cell permeable capsids.....	57
III.2.8	Specific <i>in vivo</i> packaging of nucleic acid into capsids	58

III.2.8.1	HBV polymerase is packaged together with nucleic acid into nucleocapsids	61
III.2.8.2	Expression, purification and characterization of nucleocapsids	62
III.2.9	TLM nucleocapsids are cell permeable and translocate as fully assembled particles into Huh7 and primary human hepatocytes	64
III.3	EFFICIENT GENE TRANSFER BY CELL PERMEABLE TLM NUCLEOCAPSIDS	67
III.4	HEPATITIS B VIRUS BIOLOGY	72
III.4.1	Trafficking of nucleocapsids towards the nucleus.....	72
III.4.2	Nuclear import of hepatitis B capsid protein	75
IV	DISCUSSION	79
IV.1	TLM MEDIATED CAPSID TRANSLOCATION.....	79
IV.1.1	Mechanism of TLM capsid translocation.....	81
IV.2	EFFICIENT GENE TRANSFER VIA TLM NUCLEOCAPSIDS	85
IV.2.1	Cell and tissue specificity	88
IV.3	HBV BIOLOGY	89
IV.4	OUTLOOK	91
V	MATERIALS & METHODS.....	93
V.1	MATERIAL	93
V.1.1	Chemicals and reagents	93
V.1.2	Devices.....	93
V.1.2.1	Gel electrophoresis	93
V.1.2.2	Centrifugation	94
V.1.2.3	Liquid chromatography	94
V.1.2.4	Microscopes	94
V.1.2.5	Other devices.....	94
V.1.3	Size standards	95
V.1.3.1	DNA standards	95
V.1.3.2	Protein standards	95
V.1.4	Kits	95
V.1.5	Enzymes	95
V.1.6	Proteinase inhibitors	96
V.1.7	Cell culture.....	96
V.1.7.1	Cell lines	96
V.1.7.2	Bacterial strains	96
V.1.7.3	Reagents for cell culture	96
V.1.7.4	Tissue culture lab ware.....	97
V.1.8	Antibodies	97
V.1.9	High-Sensitive Stains	98
V.1.10	Primers.....	99
V.1.11	Plasmids	100
V.1.11.1	Commercially available plasmids.....	100
V.1.11.2	Generated plasmids	100
V.1.12	Recombinant baculovirus	101
V.2	METHODS.....	102
V.2.1	Molecular biology techniques.....	102

V.2.1.1	Polymerase chain reaction (PCR).....	102
V.2.1.2	TaqMan real time PCR	103
V.2.1.3	PERT assay.....	104
V.2.1.4	Extraction of plasmid DNA	105
V.2.1.5	Agarose gel electrophoresis.....	105
V.2.1.6	Isolation of DNA from agarose gel.....	106
V.2.1.7	Quantification of nucleic acids.....	106
V.2.1.8	Digestion of DNA with restriction endonucleases.....	106
V.2.1.9	Dephosphorylation of DNA	107
V.2.1.10	Ligation of DNA	107
V.2.1.11	Generation of chemically competent <i>E. coli</i>	107
V.2.1.12	Heat shock transformation of <i>E. coli</i>	108
V.2.1.13	DNA sequencing	108
V.2.2	Cell culture	109
V.2.2.1	Cultivation of HuH7 cells.....	109
V.2.2.2	Transfection of HuH7 cells.....	109
V.2.2.3	Isolation and cultivation of primary human hepatocytes	110
V.2.2.4	Cytosol preparation.....	111
V.2.2.5	Nucleus preparation	111
V.2.2.6	Translocation assay with isolated nuclei	112
V.2.2.7	Translocation assay with digitonin-permeabilized cells.....	112
V.2.2.8	Cultivation of Sf9 cells.....	113
V.2.2.9	Generation of recombinant baculovirus	113
V.2.2.10	Quantification of recombinant baculovirus	114
V.2.3	Protein biochemistry	115
V.2.3.1	Expression and Purification of recombinant proteins.....	115
V.2.3.2	Determination of protein concentration	116
V.2.3.3	Size exclusion chromatography.....	117
V.2.3.4	SDS-PAGE	117
V.2.3.5	Silver staining of SDS-polyacrylamide gels	119
V.2.3.6	Western blot	119
V.2.3.7	In vitro packaging of plasmid DNA into <i>E. coli</i> derived capsids.....	121
V.2.3.8	Affinity chromatography approach to identify potential binding partners HBV capsid.....	122
V.2.3.9	FITC labelling of core protein.....	123
V.2.3.10	ELISA Quantification	123
V.2.4	Microscopy	123
V.2.4.1	Confocal laser scanning microscopy.....	123
V.2.4.2	Transmission electron microscopy	124
V.2.5	Molecular computing.....	124
V.2.5.1	Protein charge plot	124
V.2.5.2	Molecular modeling.....	125
VI	REFERENCES	126
VII	ABBREVIATIONS	138
VIII	FIGURE INDEX	139
IX	CURRICULUM VITAE	140
X	DANKSAGUNG	142

I ZUSAMMENFASSUNG / ABSTRACT

I.1 GENTRANSFER

Um die Vorteile des viralen Gentransfers (Effizienz und Schutz der Nukleinsäure) mit denen des nicht viralen Gentransfers (Sicherheit) zu kombinieren, wurde eine neue Methode entwickelt. Sie basiert auf zellpermeablen HBV Nukleokapsiden (5000 kDa), welche mit nicht-viralen oder viralen Nukleinsäuren beladen sind. Die Zellpermeabilität wird von einem kurzen Peptid - dem TLM (12 AS) - vermittelt. Das TLM wurde sowohl in den Spike-tip inseriert als auch mit dem N-Terminus des Hepatitis B Virus (HBV) Core Proteins (HBc) fusioniert.

Die HBV Kapside wurden von *E. coli* oder Insekten Zellen exprimiert und mittels Affinitäts-Chromatographie isoliert. Vollständig assemblierte Kapside wurden von HBcAg Oligomeren mittels Größenausschluss-Chromatographie getrennt. Elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigten, dass die Modifikation durch das TLM, die Fähigkeit der Moleküle sich zu Kapsiden zusammenzulagern, nicht beeinträchtigt.

Die Zellpermeabilität vollständig assemblierter TLM Kapside konnte durch die Untersuchungen mit Konfokaler- und Elektronen-Mikroskopie in verschiedenen Zellen sowie durch Lebend-Zell Experimente mit Fluorophor markierten Kapsiden nachgewiesen werden. Um eine endozytische Aufnahme der Kapside ausschließen zu können, wurden verschiedene Endozytose-Inhibitoren in Gegenwart einer FITC markierten Transferrin Kontrolle verwendet. Es konnte nachgewiesen werden, dass zellpermeable TLM Kapside in einer Endozytose unabhängigen Translokation direkt in das Zytoplasma der Zellen gelangen können.

Um die für den Gentransfer nötige DNA in die Kapside zu verpacken, wurden zwei unterschiedliche Protokolle entwickelt. Für die *in vitro* Verpackung wurden die gereinigten, bakteriell exprimierten Kapside denaturiert und dadurch disassembliert. Die HBcAg Moleküle wurden renaturiert und dabei durch schrittweise Dialyse in Gegenwart von Plasmid DNA reassembliert (SHBs oder eGFP dienten als Marker Gene). Dies führt zur Verpackung der DNA in die Kapside. In Anlehnung an den Lebenszyklus des HBV wurde ein zweites, ein eukaryotisches *in vivo* System zum Verpacken von Nukleinsäuren in Kapside entwickelt. *Spodoptera frugiperda* Zellen wurden gleichzeitig mit Baculoviren infiziert, die für die HBV Polymerase, das Kapsid und ein Reporter-gen Konstrukt (zwei Enkapsidierungs-Signale besitzend) codieren. Innerhalb der Insektenzellen interagiert zu erst die Polymerase mit der zu verpackenden Nukleinsäure und dieser Komplex wird von den Kapsidproteinen erkannt und verpackt.

Die Menge an, in Kapsiden verpackter DNA wurde mittels TaqMan PCR quantifiziert. Die Kapazität dieser TLM Nukleokapside, Gene erfolgreich in schwer transfizierbare primäre humane Hepatozyten zu transferieren wurde mit Hilfe spezifischer ELISA und Immunfluoreszenzen analysiert. Diesen Ergebnissen folgend, stellen die von HBV abgeleiteten zellpermeablen Nukleokapside ein neues Werkzeug zum effizienten und sicheren Gentransfer dar.

I.2 HBV BIOLOGIE

Nur wenige Einzelheiten der intrazellulären Fortbewegung des HBV Nukleokapsides nach dem Eintritt des Virus in die Zelle sind bekannt. Durch Mikroinjektionen oder die Vorbehandlung mit Digitonin wird zur Untersuchung dieser Fortbewegung in den derzeitig verwendeten Modellen die Integrität der Zellen beeinträchtigt. In dieser Arbeit wurden zellpermeable Nukleokapside verwendet, um ein Modellsystem der HBV Infektion zu etablieren, welches mehr der physiologischen Situation entspricht. Mit den zellpermeablen HBV Nukleokapsiden ist es möglich, deren intrazelluläre Fortbewegung zu untersuchen ohne die Integrität der Zelle zu beeinträchtigen.

TLM Nukleokapside translozieren als intakte Partikel rasch (schon nach 5 Minuten) vom Medium durch die Plasmamembran in nahezu alle Zellen (z.B. primäre humane Hepatozyten). Im Falle der kein TLM besitzenden Wildtyp Kapside konnte hingegen keine signifikante Internalisierung beobachtet werden. Um mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie komplette Partikel von HBcAg Dimeren unterscheiden zu können, wurden monoklonale Antikörper verwendet, die ausschließlich vollständig assemblierte Partikel erkennen, sowie polyklonale Antikörper die sowohl komplette Kapside als auch HBcAg Dimere erkennen.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass sich internalisierte Nukleokapside als komplette Partikel entlang des Zytoskeletts zur Kernmembran und den Kernporen-Komplexen mit einer Geschwindigkeit von etwa 0,15 $\mu\text{m}/\text{min}$ bewegen. Es konnte eine Kolokalisierung der vollständig assemblierten Nukleokapside während ihrer intrazellulären Wanderung mit dem Mikrotubuliorganisationszentrum als auch mit F-Actin sowie eine signifikante Reorganisation des F-Actins beobachtet werden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass β -Tubulin spezifisch an assemblierte Kapside bindet.

Zu keinem Zeitpunkt konnten (bis zu 48 Stunden nach Inkubation) komplette zellpermeable Kapside im Kern der Zellen detektiert werden. Wurde jedoch die Lokalisierung der Kapside in Digitonin permeabilisierten

Zellen untersucht, konnten im Gegensatz zum neu beschriebenen Model, HBcAg Dimere nach 120 Minuten im Kern detektiert werden.

Die in dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse zeigen, dass TLM Nukleokapside eine detaillierte Analyse des intrazellulären Transportes nach dem Eintritt von HBV in die Zelle erlauben. Dies macht es möglich, Interaktion des Nukleokapsides mit subzellulären Strukturen (wie dem Zytoskelett oder dem Kernporen-Komplex) sowie die Dissoziation der Kapside in Zellen zu beobachten ohne deren Integrität zu beeinträchtigen.

1.3 GENE TRANSFER

In order to combine the advantages of viral gene transfer (efficacy and protection of the nucleic acid) and of non-viral gene transfer (safety) a novel tool in gene transfer technology was developed. This new system is based on cell permeable HBV nucleocapsids which are loaded with non-viral or viral nucleic acids. Cell permeability is mediated by a short peptide (12aa, TLM). The TLM was inserted in the spike tip or fused to the N-terminus of the hepatitis B virus (HBV) core protein (HBc).

HBV capsids expressed by *E. coli* or insect cells were isolated by affinity chromatography. To separate fully assembled capsids from HBcAg oligomers size exclusion chromatography was performed. Electron microscopy revealed that insertion of the TLM in the HBcAg molecule does not affect the assembly to capsids.

The cell permeability of fully assembled TLM capsids was verified in cells by using confocal and electron microscopy as well as a life cell assay with fluorophore-labeled capsids. To exclude an endocytotic uptake of capsids, several endocytosis inhibitors were used in the presence of a FITC-labeled transferrin control. It was demonstrated that cell permeable TLM capsids translocate directly in an endocytosis-independent manner into the cytoplasm of different cell types.

In order to package DNA for gene transfer into the capsids, two different protocols were developed. For the *in vitro* packaging, the purified bacterial expressed capsids were subjected to partial denaturation to dissociate them. The HBcAg oligomers were renatured and thereby reassembled by stepwise dialysis in the presence of the plasmid DNA to be packaged (SHBs or eGFP served as marker genes). According to the life cycle of HBV a second, an eukaryotic *in vivo* expression system for packaging of nucleic acids into capsids was developed. *Spodoptera frugiperda* cells were triple infected with baculoviruses encoding HBV polymerase, HBc and the reporter gene construct (harboring two encapsidation signals). Inside of the insect cells the polymerase first interacts with encapsidation signals of the mRNA

to be packaged and then this complex was recognized and packaged by the core protein.

The amount of packaged DNA was quantified by TaqMan PCR. The capacity of these TLM nucleocapsids to successfully transfer genes into poorly transfectable primary human hepatocytes was analyzed by specific ELISA and immunofluorescence, monitoring the expression of reporter genes. These results indicate that cell permeable HBV-derived nucleocapsids provide a novel tool for safe and efficient gene transfer.

1.4 HBV BIOLOGY

The post entry intracellular trafficking of the HBV nucleocapsid and transport of the viral genome is still poorly understood. The current models to investigate this affect the integrity of the cell by using digitonin or microinjection. To establish a physiological model system cell permeable HBV nucleocapsids were used in this study. Without affecting the integrity of cells it is possible to investigate intracellular trafficking of these particles. TLM nucleocapsids rapidly translocate across the plasma membrane as intact particles (already after 5 minutes) from the medium into almost all cells (e.g. HuH7 and primary human hepatocytes), whereas no significant internalization was seen in case of wild type nucleocapsids, lacking the TLM. To distinguish between complete particles and HBcAg dimers by confocal microscopy a monoclonal antibody that recognizes complete particles selectively and a rabbit-derived serum that recognizes particles as well as HBcAg dimers were used.

Initial results suggest that internalized nucleocapsids move as complete particles directed by the cytoskeleton towards the nuclear membrane and nuclear pore complex (NPC) with a speed of $\sim 0,15 \mu\text{m}/\text{min}$. A colocalisation of fully assembled nucleocapsids with the microtubule organization center as well as with F-actin and a significant reorganization of F-actin during trafficking can be observed. A specific binding of assembled HBV capsids at β -tubulin was found. There were not any complete capsids or HBcAg dimers detectable inside of the nucleus (up to 48 hours post incubation). However, if the intracellular localization of wt or TLM nucleocapsids was analyzed by using digitonin-permeabilized cells, in contrast to the described new model HBcAg dimers were detected after 120 minutes inside of the nucleus.

The results presented in this study suggest that TLM nucleocapsids allow a detailed analysis of HBV post entry processes. This makes it possible to study the intracellular trafficking of HBV nucleocapsid, the interaction with subcellular structures (e.g. cytoskeleton and NPC) and the disassembly without affecting the integrity of the cell.