

Aus dem  
**Institut für Virologie**  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Generierung, Isolierung und funktionelle Charakterisierung von  
zellpermeablen *virus like particles* (HBV-Kapside) als *Carrier* für  
HCV-Antigene zur effizienten Induktion einer B- und T-Zellantwort**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
eines Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Michael Heilmann**  
Tierarzt aus Bad Oldesloe

**Berlin 2013**

**Journal Nr.: 3606**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Klaus Osterrieder  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Eberhard Hildt  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Günther Schönrich

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

hepatitis C, hepatitis C virus, virus-like particles, immune response, vaccine development, vaccines, viral antigens

Tag der Promotion: 17.06.2013

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-345-5

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2013**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2013

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

[verlag@menschundbuch.de](mailto:verlag@menschundbuch.de) – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

# 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 Nucleinsäuren.....	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	Summery .....	104
8	Lieraturverzeichnis .....	105
9	Danksagung .....	121
10	Selbstständigkeitserklärung .....	122

# Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Weltweit geschätzte Anzahl und Prävalenz von HCV-Infektionen .....	3
Abb. 2	Schematische Darstellung des HCV-Genoms der HCV-Proteine. ....	5
Abb. 3	Immunantwort nach einer HCV-Infektion.....	14
Abb. 4	Typischer Verlauf einer HCV-Infektion. ....	15
Abb. 5	Struktur des HBV-Kapsids.....	22
Abb. 6	Bedeutende zellpermeable Peptide und ihre Eigenschaften.....	24
Abb. 7	Verschiedene Modellvorstellungen für die Translokation zellpermeabler Peptide. ...	25
Abb. 8	Struktur und Eigenschaften des TLM-Peptids.....	28
Abb. 9	Schematische Darstellung der kodierenden Sequenz des Expressionskonstrukts pBacPAK9 2xTLM,Strep-Tag,leader,core 1-184,6xHIS (HBV core 1-184-Konstrukt). ....	56
Abb. 10	Schematische Darstellung der kodierenden Sequenz des Expressionskonstrukts pBacPAK9 2xTLM,Strep-Tag,leader,core 1-78,E2a,core 79-184,6xHIS (HBV core 1-184, E2a-Konstrukt).....	57
Abb. 11	Schematische Darstellung der kodierenden Sequenz des Expressionskonstrukts pBacPAK9 2xTLM,Strep-Tag,leader,core 1-78,E2_1,79-184,6xHIS (HBV core 1- 184, E2_1-Konstrukt). ....	58
Abb. 12	Schematische Darstellung der kodierenden Sequenz des Expressionskonstrukts pBacPAK9 2xTLM,Strep-Tag,leader,core 1-78,E2_1,79-184,6xHIS (HBV core 1- 184, E2_3-Konstrukt). ....	58
Abb. 13	Nachweis der generierten rekombinanten Baculoviren.....	59
Abb. 14	Nachweis der Proteinsynthese durch Westernblotanalyse (14 %-Gel). ....	60
Abb. 15	Nachweis der Proteinsynthese durch HBeAg ELISA-Analyse.....	61
Abb. 16	Nachweis infizierter Sf9-Zellen 72 h p.i. durch Konfokal- Immunfluoreszenzmikroskopie.....	63
Abb. 17	Strep-Tag Aufreinigung des HBV core 1-184-Fusionsproteins (ca. 27,5 kDa). ....	65
Abb. 18	Nachweis von korrekt assemblierten HBV core 1-184-Partikeln. ....	67
Abb. 19	Elektronenmikroskopische Aufnahme korrekt assemblierter HBV core 1-184, E2a-Kapside.....	68
Abb. 20	Schematische Darstellung der kodierenden Sequenz des Expressionskonstrukts pet24d(+) 2xTLM,Strep-Tag,leader,core 1-151,6xHIS (HBV core 1-151--Konstrukt).....	69



Abb. 21 Schematische Darstellung der kodierenden Sequenz des Expressionskonstruktes pet24d(+)2xTLM,Strep-Tag,leader,core 1-78,E2a,core 80-151,6xHIS (HBV core 1-151, E2a-Konstrukt).....	70
Abb. 22 Nachweis von HBV core 1-151- und HBV core 1-151, E2a- Fusionsproteinen in Lysaten mittels HBe-Antigen-ELISA.....	71
Abb. 23 Nachweis von HBV core 1-151- und HBV core 1-151, E2a- Fusionsproteinen in Dialysaten nach Denaturierung mittels HBe-Antigen-ELISA.....	73
Abb. 24 HBV core 1-151-Partikel ausbeute in Rosetta-Lysat bei einer Wachstumstemperatur von 37 °C. ....	75
Abb. 25 HBV core 1-151-Partikel ausbeute in Rosetta-Dialysat bei einer Wachstumstemperatur von 37 °C. ....	76
Abb. 26 Strep-Tag Aufreinigung des HBV core 1-151-Fusionsprotein (ca. 24 kDa).....	78
Abb. 27 Strep-Tag Reinigung des HBV core 1-151, E2a-Fusionsproteins (ca. 36 kDa).....	80
Abb. 28 Nachweis korrekt assemblierter HBV core 1-151-Partikel.....	82
Abb. 29 Nachweis korrekt assemblierter HBV core 1-151, E2a-Partikel.....	84
Abb. 30 Nachweis der Membranpermeabilität der generierten VLPs in Huh7.5-Zellen durch konfokale Laser-Rastermikroskop-Aufnahme.....	86
Abb. 31 HBe-Antigen-ELISA der Strep-Tag gereinigten, dialysierten und ankonzentrierten HBV core 1-151-und HBV core 1-151, E2a-Fusionsproteine.....	87
Abb. 32 Nachweis der generierten Fusionsproteine im Mäuseserum durch HBe-Antigen-ELISA.....	88



# 1 Einleitung

Die Infektion mit dem Hepatitis C-Virus (HCV) kann neben einer akuten Leberentzündung (Hepatitis) zu einer chronischen Infektion führen, aus der heraus eine Leberzirrhose und schließlich ein hepatozelluläres Karzinom (HCC) entstehen können (Tsai et al., 2010; Castello et al., 2010). Gegenwärtig sind ca. 170 Mio. Menschen weltweit mit HCV infiziert. Dabei gibt es, abhängig vom Genotyp, nur begrenzte Therapiemöglichkeiten. Ein Impfstoff gegen das Virus ist bis heute nicht vorhanden, wobei sich bereits verschieden Kandidaten in klinischen Studien der Phase 1 bzw. 2 befinden (Habersetzer 2011; Torresi, Johnson et al. 2012).

Im Rahmen dieses Projektes sollen weitere Grundlagen für die Entwicklung einer HCV-Vakzine gelegt werden. Dies soll auf der Basis rekombinanter Hepatitis B-Virus (HBV) Kapside, welche HCV-spezifische Antigene tragen, erfolgen.

Durch die geordnete Struktur der Antigene auf der Partikeloberfläche soll einerseits eine effiziente Induktion der humoralen Immunantwort erfolgen, andererseits soll durch die Membranpermeabilität ein Transfer der Partikel ins Cytoplasma und somit eine proteasomale Degradation erlaubt werden, um eine effiziente Beladung von MHC-Klasse I Komplexen für die Induktion einer T-Zellantwort zu erzielen.

Durch Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass es grundsätzlich möglich ist, auf der Grundlage des HBV-Kapsids und des Zellpermeabilität vermittelnden TLM-Peptids membranpermeable *virus like particles* (VLPs) zu generieren (Brandenburg, Stockl et al. 2005). Weiterhin konnte durch die Fusion eines Antigens an das TLM-Peptid eine effiziente T-Zellantwort erzielt werden (Bleifuss, Kammertoens et al. 2006) und es ist bekannt, dass es möglich ist, relativ große Proteine in die *Spike-tips* der HBV-VLPs zu inserieren, ohne dass die Fähigkeit zur Partikelbildung verloren geht (Kratz, Bottcher et al. 1999).

Der erste Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Generierung und der strukturellen und zellbiologischen Charakterisierung HCV-Antigene tragender zellpermeabler VLPs. Diese wurden im Baculovirus-Sf9- und im *E. coli*-Expressionssystem hergestellt und mit Hilfe eines eingefügten N-terminalen Strep-Tags über Strep-Tag Affinitätschromatografie isoliert. Die Charakterisierung hinsichtlich der Fähigkeit zur Partikelbildung wurde mittels Gelfiltration und elektronenmikroskopischer Untersuchungen durchgeführt.

Die Fähigkeit der Membranpermeabilität der VLPs wurde zunächst *in vitro* in Zellkulturexperimenten mittels konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie unter Verwendung eines Antikörpers untersucht, der exklusiv assemblierte Kapsidpartikel detektierte.

Anschließend wurde auch *in vivo* im Mausexperiment untersucht, ob nach oraler Gabe der zellpermeablen VLPs diese über den Verdauungstrakt absorbiert werden.

In weiteren *in vivo* Experimenten gilt es noch herauszufinden, inwieweit es möglich ist, nach oraler Gabe eine effiziente Immunantwort zu erzielen.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Das Hepatitis C-Virus (HCV) und die assoziierte Hepatitis

Hepatitis C ist eine durch das Hepatitis C-Virus verursachte Infektionskrankheit des Menschen, die weltweit verbreitet ist. Die Infektion mit HCV kann neben einer meist symptomlosen akuten Leberentzündung zu einer chronischen Entzündung der Leber führen, in deren Verlauf eine Leberzirrhose und schließlich ein hepatozelluläres Karzinom (HCC) entstehen können (Castello, Scala et al. 2010; Tsai and Chung 2010).

#### 2.1.1 Epidemiologie

Weltweit sind etwa 170 Millionen Menschen chronisch mit dem Hepatitis C-Virus infiziert, was einer Prävalenz von etwa 3,1 % entspricht. Im Unterschied zu vielen anderen Infektionskrankheiten ist HCV nicht nur ein Problem in Entwicklungsländern, sondern auch in den Industriestaaten (**Abb.1**). So betrug die Prävalenz in Deutschland für das Jahr 2009 0,4 %, die Zahl der Infizierten also 400.000 bis 500.000. Die Zahl der gemeldeten Erstdiagnosen in Deutschland belief sich für das Jahr 2009 auf 5412 Fälle (Higuchi, Tanaka et al. 2002; RKI 2010). In den USA liegt die Prävalenz bei 1,8 % (3,9 Millionen HCV-Infizierte), in Japan bei 2 % (2 Millionen HCV-Infizierte) (Higuchi, Tanaka et al. 2002) und in Ägypten wird eine Prävalenz von über 20 % angegeben (Darwish, Abbas et al. 1995).

WHO Region	Total population (Millions)	HCV prevalence rate (%)	Infected population (Millions)	Number of countries by WHO region where no data are available
Africa	602	5.3	31.9	12
Americas	785	1.7	13.1	7
Eastern Mediterranean	466	4.6	21.3	7
Europe	858	1.03	8.9	19
South-East Asia	1500	2.15	32.3	3
Western Pacific	1600	3.9	62.2	11
Total	5811	3.1	169.7	57

Abb. 1 Weltweit geschätzte Anzahl und Prävalenz von HCV-Infektionen (WHO, Sy et al. 2006).

### **2.1.2 Geschichte und Taxonomische Einordnung**

Mit der Entwicklung und Etablierung spezifischer Bluttests zur Diagnostik von Hepatitis A und Hepatitis B in den 1970er Jahren wurde deutlich, dass nur etwa 25 % der mit einer Bluttransfusion assoziierten Hepatitisfälle auf die oben genannten Erreger zurückzuführen war. Daraufhin wurden 75 % der als Folge einer Bluttransfusion auftretenden Leberentzündungen als Non-A-Non-B-Hepatitis bezeichnet (Feinstone and Purcell 1978). Erst 1989 gelang durch die Klonierung von Genomfragmenten aus dem Serum eines künstlich mit HCV infizierten Schimpansen die Entdeckung und im darauf folgenden Jahr die Sequenzierung des Hepatitis C-Virus, welches in die Familie Flaviviridae eingegliedert wurde (Choo, Kuo et al. 1989).

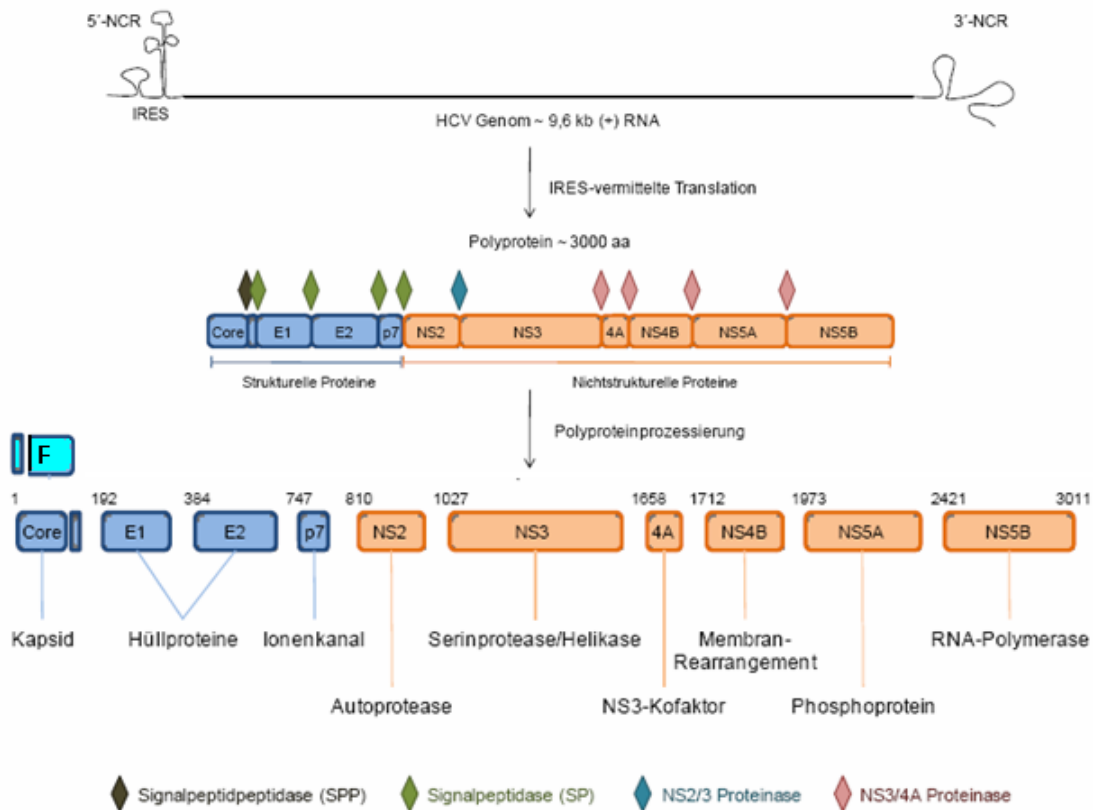
Die Flaviviridae sind 40-60 nm groß und enthalten eine lineare, einsträngige, Positiv-Strang RNA. Die Partikel haben eine Lipidhülle und sind ikosaedrisch. Die Tenazität der Flaviviridae ist relativ gering, wohingegen die Kontagiosität hoch ist. Die Familie gliedert sich in die Genera Flaviviren, Pestiviren und Hepaciviren (Harris, Holden et al. 2006). Dem Genus Flavivirus werden 76 Spezies zugeordnet, u.a. das Gelbfieber-Virus, das West-Nile-Virus, das Dengue-Virus, das Japanische Enzephalitis-Virus und das Aroa-Virus. Zu den Pestiviren gehören 13 Erreger. Von Bedeutung sind hier in erster Linie das Virus der klassischen Schweinepest, das Border Disease-Virus sowie das Bovine-Virusdiarrhoe-Virus. Das Hepatitis C-Virus ist der einzige Vertreter der Hepaciviren.

Die Analyse der RNA-Sequenzen führte zur Gruppierung der Isolate in 6 Genotypen (1 bis 6), mit weiterer Untergliederung in Subtypen (a, b, c etc.). Dabei unterscheiden sich die Nukleotidsequenzen zwischen den verschiedenen Genotypen um bis zu 30 % und innerhalb der Subtypen um 15-20 % (Lyra, Fan et al. 2004). Durch das Fehlen einer *proof-reading* Funktion der viralen RNA-abhängigen-RNA-Polymerase ergeben sich hohe Mutationsraten und in deren Folge eine große Sequenzheterogenität. Diese im Zuge von Mutationen einhergehenden Abweichungen des ursprünglichen viralen Genoms führen zur Entstehung von Quasispezies. Die Bildung von Quasispezies stellt einen Mechanismus der Immunevasion dar und wird mit der Fähigkeit des Virus zur Chronizität und der Entwicklung von Resistenzen während einer antiviralen Therapie in Verbindung gebracht (Farci, Shimoda et al. 2000; Brown, Juttla et al. 2005; Argentini, Genovese et al. 2009; Chayama and Hayes 2010).

### **2.1.3 Morphologie, Genomaufbau und Proteinbiosynthese**

Das Hepatitis C-Kapsid ist ca. 45 nm groß, ikosaedrisch und besitzt eine lineare Einzelstrang-RNA mit positiver Orientierung. Umgeben wird es von einer Membranhülle aus Lipoproteinen. Der Durchmesser infektiöser Viren beträgt in etwa 70 nm (Li, Jeffers et al. 1995).

Das HCV-Genom ist etwa 9,6 kb groß und bildet einen offenen Leserahmen, der für ein ca. 3000 Aminosäuren großes Polyprotein kodiert. Die Prozessierung des Polyproteins erfolgt durch wirtseigene und virale Proteasen, so dass ausgehend von dem Polyprotein 10 verschiedene HCV-Proteine gebildet werden. Diese lassen sich in die Strukturproteine (core, E1, E2, p7) und die Nicht-Strukturproteine (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) einteilen (**Abb. 2**) (Giannini and Brechot 2003; Penin, Dubuisson et al. 2004).



**Abb. 2 Schematische Darstellung des HCV-Genoms der HCV-Proteine.**

Dargestellt ist die Translation des Virus-Genoms und die Prozessierung der Virus-Proteine (modifiziert nach Moradpour et al., 2007)

Am N-Terminus wird zunächst das ca. 21 kDa große core-Protein abgespalten (Yasui, Wakita et al. 1998). Das core-Protein ist an der Bildung des Nukleokapsids beteiligt (Baumert, Ito et al. 1998). Durch Verschiebung des Leserahmens kann an Stelle des core-Proteins das ca. 17 kDa große F-Protein hergestellt werden, dessen Funktion aber noch weitgehend unklar ist (Branch, Stump et al. 2005). Im Anschluss folgt die Abspaltung der Glykoproteine E1 und E2, die in die Membranhülle des Virus eingelagert sind und dort Heterodimere bilden (Deleersnyder, Pillez et al. 1997; Vieyres, Thomas et al. 2010). Danach wird das 7 kDa große Protein p7 freigesetzt, welches in der Wirtszelle Ionenkanäle ausbilden kann (Griffin, Beales et al. 2003; Pavlovic, Neville et al. 2003; Luik, Chew et al. 2009). Die Spaltung zwischen den Strukturproteinen erfolgt durch eine zelluläre Signalpeptidase. Bei

dem NS2 handelt es sich um eine Metalloprotease, die sich zusammen mit NS3 autokatalytisch von diesem abspaltet (Santolini, Pacini et al. 1995; Yamaga and Ou 2002). NS3 besitzt am N-terminalen Ende eine Serin-Proteaseaktivität und ist, zusammen mit NS4A als co-Faktor, für die Abspaltung aller weiteren Nichtstrukturproteine verantwortlich (Grakoui, McCourt et al. 1993). Am C-terminalen Ende verfügt das NS3 über eine Helikasefunktion (Tai, Chi et al. 1996; Frick, Rypma et al. 2004). Das NS4B-Protein stellt ein integrales Membranprotein dar und das NS5B ist die RNA-abhängige RNA-Polymerase (Lesburg, Cable et al. 1999; Bressanelli, Tomei et al. 2002). Das NS5A-Protein ist ein essentieller Teil des HCV-Replikon-Komplexes (Gosert, Egger et al. 2003; Burckstummer, Kriegs et al. 2006) und spielt eine wichtige Rolle bei der Replikation von HCV, wobei die genaue Funktion noch nicht bekannt ist. Mutationen des NS5A haben Einfluss auf die Replikationsrate von HCV (Krieger, Lohmann et al. 2001).

Flankiert wird der Leserahmen beidseitig von zwei nicht-kodierenden Regionen (non-coding regions, NCR), denen regulatorische Funktionen während der Virusreplikation zugeordnet werden. Vor dem Startcodon befindet sich die ca. 340 Basen lange 5'-NCR, die eine komplexe Faltung und außerdem eine sehr hohe Sequenzübereinstimmung innerhalb der verschiedenen Genotypen zeigt, weshalb sie auch zum diagnostischen Genomnachweis mittels RT-PCR herangezogen wird. Des Weiteren bildet diese Region eine IRES-Sequenz (internal ribosomal entry site), die direkt an die 40S-Ribosomen-Untereinheit binden kann (Honda, Brown et al. 1996; Spahn, Kieft et al. 2001; Lytle, Wu et al. 2002). Am Ende des Genoms befindet sich die 250-300 Basen lange 3'-NCR, die ebenfalls eine wichtige Rolle in der Virusreplikation spielt. Sie besteht aus einer variablen Region, einem Poly(U)-Schwanz und einer hochkonservierten, 98 Nukleotide langen Sequenz, die als x-tail bezeichnet wird (Tanaka, Kato et al. 1996; Friebe and Bartenschlager 2002).

### **2.1.4 Übertragung**

Eine Übertragung von HCV erfolgt in der Regel durch Kontakt mit infiziertem Blut. Bis zum Jahr 1990 spielte eine Übertragung bei Bluttransfusionen und Organtransplantationen eine wichtige Rolle. Auch Medikamente, die aus Blut hergestellt wurden, wie z.B. Immunglobuline und Gerinnungsfaktoren, stellten ein Infektionsrisiko dar. Ebenfalls bestand für Dialysepatienten eine erhöhte Gefahr, sich mit HCV zu infizieren (Brettler, Alter et al. 1990; Oguchi, Terashima et al. 1990; Ruffatti, Bortolotti et al. 1992). Seit der Etablierung und Durchführung von HCV-Tests (ELISA und RT-PCR) im Jahr 1990 ging die Infektionsrate nach Bluttransfusionen und Organspenden deutlich zurück. So sank z.B. die Infektionsinzidenz für HCV nach einer Bluttransfusion in den USA von 3,84 % auf 0,57 % (Donahue, Munoz et al. 1992), wo hingegen die Ansteckung nach Bluttransfusionen in Ländern, in denen kein Spenderscreening stattfindet, noch immer eine Rolle spielt. Ebenfalls



sank die Infektionsgefahr für Dialysepatienten. Allerdings liegt hier durch unsachgemäße Reinigung und fehlerhafte Sterilisation von Dialysemaschinen noch immer eine erhöhte Ansteckungsgefahr vor (Djordjevic, Stojanovic et al. 2000; Zampieron, Jayasekera et al. 2006).

Heute spielt in erster Linie die parenterale Übertragung von HCV eine Rolle (Alter 2002). Ein erhöhtes Infektionsrisiko haben dabei vor allem Drogenkonsumenten, die sich Drogen intravenös verabreichen und das Drogenbesteck mit anderen Konsumenten teilen (Laufs, Polywka et al. 2002; Burt, Thiede et al. 2009; Sakoman 2009). Hierbei geht das HENCORE-Netzwerk (Hepatitis C European Network for co-operative Research) davon aus, dass die Prävalenz für Hepatitis C unter den Konsumenten intravenös zu verabreichender Drogen etwa 80 % beträgt (Pradat and Trepo 2000). Eine weitere Risikogruppe, die etwa 4 % der Neuinfektionen ausmacht, stellen Beschäftigte im Gesundheitswesen dar. Hier spielen v.a. Verletzungen mit spitzen oder scharfen Instrumenten (Nadelstichverletzungen) mit kontaminiertem Blut eine Rolle (Yazdanpanah, De Carli et al. 2005). Seltene Übertragungswege sind Lebertransplantationen und die Übertragung durch verunreinigten Tätowier- und Akkupunkturadeln. Ebenfalls von Bedeutung ist die perinatale Übertragung von der Hepatitis C-positiven Mutter auf das ungeborene Kind (Indolfi and Resti 2009), bei der eine Infektionswahrscheinlichkeit von 4 bis 7 % angegeben wird (Roberts and Yeung 2002; Parthiban, Shanmugam et al. 2009). Die Wahrscheinlichkeit einer sexuellen Übertragung des Hepatitis C-Virus gilt als sehr wahrscheinlich (Cavalheiro Nde 2007), wobei es als gesichert gilt, dass Personen aus Risikogruppen, z.B. Personen mit häufig wechselnden Sexualpartnern, ein erhöhtes Infektionsrisiko haben (Alary, Joly et al. 2005). Zu beachten ist, dass sich bei 20 bis 40 % der HCV-Infizierten der Infektionsweg im Nachhinein nicht mehr nachvollziehen lässt (Karmochkine, Carrat et al. 1998).

## **2.1.5 Immunantwort**

### **2.1.5.1 Die Immunantwort allgemein**

Als Immunantwort bezeichnet man die Abwehrreaktion des Immunsystems auf als fremd erkannte Organismen oder Substanzen, mit denen das Immunsystem in Berührung kommt. Die Immunabwehr basiert hierbei auf zwei eng verknüpften Funktionseinheiten, dem angeborenen, nicht-adaptiven und dem erworbenen, adaptiven Immunsystem. Die angeborenen Abwehrmechanismen reagieren sofort. Sie bestehen zum einen aus den mechanischen Barrieren, löslichen Abwehrstoffen und der natürlichen Keimflora, durch die die Oberflächen vor Infektionen geschützt werden. Weitere Bestandteile sind lösliche antibakterielle und antivirale Faktoren wie Lysozym, Defensine, Lactoferrin und Interferone, die von vielen Körperzellen sezerniert werden sowie die Aktivierung des Komplementsystems, die zur Opsonierung, Chemotaxis und Zellyse führt. Die Zellen des

angeborenen Immunsystems, Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen, erkennen Infektionserreger über spezifische Rezeptoren bzw. nach Opsonierung und haben Aufgaben wie Phagozytose, Zerstörung von Mikroorganismen, die Sekretion von Botenstoffen und die Aktivierung von Lymphozyten. Des Weiteren spielen Cytokine eine wichtige Rolle, die zu lokalen Entzündungsreaktionen und zu systemischen Reaktionen im Gehirn, in der Leber und im Knochenmark führen (Beutler 2004; Martinelli and Reichhart 2005).

Das erworbene Immunsystem kommt erst nach 5-7 Tagen zum Tragen. Dabei sind die Träger des erworbenen Immunsystems die Lymphocyten. B-Lymphocyten bilden nach Antigenstimulation die humorale adaptive Immunantwort durch die Produktion hochspezifischer Antikörper, wobei verschiedene Antikörperklassen unterschiedliche Funktionen wie lokalen Immunschutz, Komplementaktivierung und Neutralisation einnehmen. T-Lymphocyten sind die Träger der zellvermittelten adaptiven Immunantwort. Dabei unterscheidet man cytotoxische T-Lymphocyten und Helfer-T-Lymphocyten, denen unterschiedliche Aufgaben zukommen (Chaplin 2010).

### **Die zelluläre und humorale Immunantwort:**

Nach ihrer Bildung aus pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks reifen B-Lymphocyten im Knochenmark und T-Lymphocyten im Thymus, den zentralen Lymphorganen. Diejenigen Lymphocyten, die mit körpereigenen Strukturen reagieren, werden im Zuge der negativen Selektion ausgesondert (Kappler, Roehm et al. 1987). Die reifen Lymphocyten zirkulieren nun als naive Lymphocyten im Blut und gelangen über die Blutbahn zu den peripheren lymphoiden Organen. Hier ist die Antigenkonzentration besonders hoch, da einerseits durch die Zellen des angeborenen Immunsystems, insbesondere durch die dendritischen Zellen, das phagozytierte Material über die afferente Lymphe in die Lymphknoten gelangt. Andererseits werden Antigene über die Lymphe in die Lymphknoten bzw. über das Blut in die Milz geschwemmt.

Eine Antigenbindung führt zu einer Aktivierung von Lymphocyten und zur klonalen Expansion, in deren Folge eine große Zahl identischer Lymphocyten gebildet wird. Diese Lymphocyten differenzieren nun zu Effektorzellen mit verschiedenen Aufgaben, B-Lymphocyten zu Plasmazellen und T-Lymphocyten entweder zu cytotoxischen T-Zellen (CTL) oder zu T-Helferzellen (TH1 oder TH2), die über das Blut direkt zum Infektionsort wandern (Mosmann, Cherwinski et al. 1986). Ein Teil der Lymphocyten wird zu Gedächtniszellen, die bei einem erneuten Kontakt mit dem spezifischen Antigen sofort zur Verfügung stehen (Janeway 2001).

### **B-Lymphocyten:**

B-Lymphocyten besitzen spezifische Antigenrezeptoren (BCR), die im Aufbau dem Immunglobulin des IgM-Isotyps entsprechen. Sie bestehen aus einem variablen Teil zur Antigenerkennung und einem konstanten Teil, der in der Zellmembran verankert ist. Verbunden ist der Rezeptor mit den Proteinen Ig-alpha und Ig-beta (Pleiman, D'Ambrosio et al. 1994). Nach einer Antigenbindung kommt es durch Konformationsänderung des Rezeptors und der assoziierten Proteine zu einer intrazellulären Signalweiterleitung und zur Aktivierung des Lymphocyten. Diese kann allein durch den Antigenkontakt zustande kommen, erfolgt aber i.d.R. durch co-stimulatorische Signale durch T-Lymphocyten (siehe unten).

In der Folge werden Effektorzellen (Plasmazellen) und Gedächtniszellen gebildet. Beim ersten Kontakt von B-Lymphocyten mit einem Antigen werden im Zuge der Primärantwort immer IgM-Antikörper gebildet. Nach wiederholtem Kontakt mit dem Antigen und durch direkten Zellkontakt zwischen T-Helferzellen, dendritischen Zellen und B-Lymphocyten unter dem Einfluss sezernierter Cytokine kommt es während der Sekundärantwort zu einem Immunglobulin-Klassenwechsel und zur Bildung anderer Immunglobulin-Isotypen. Die Sekundärantwort spielt sich in spezialisierten Lymphfollikeln innerhalb der Lymphknoten ab, die als Keimzentren bezeichnet werden. Somatische Hypermutationen innerhalb der Keimzentren führen zur Bildung hochaffiner Antikörper des IgG-, IgA- oder IgE-Isotyps. Die Gedächtniszellen verbleiben still im Organismus und werden durch erneuten Antigenkontakt aktiviert, in deren Folge sie wiederum zu Plasma- und Gedächtniszellen differenzieren, so dass eine schnelle und effektive Immunantwort erfolgen kann (Paul, Brown et al. 1987; Janeway 2001).

### **T-Lymphocyten:**

T-Lymphocyten besitzen spezifische Rezeptoren, T-Zell-Rezeptoren, die aus zwei Proteinen, der TCR-alpha-Kette und der TCR-beta-Kette bestehen. Diese sind mit weiteren Molekülen verbunden, die als CD3-Komplex bezeichnet werden (Marrack and Kappler 1987; Bentley and Mariuzza 1996). T-Lymphocyten erkennen keine gelösten Antigene, sondern nur solche, die auf MHC-Molekülen präsentiert werden.

Man unterscheidet zwei Gruppen von T-Lymphocyten, die sich durch ihre Oberflächenantigene unterscheiden lassen. Dabei tragen cytotoxische T-Lymphocyten das CD8-Molekül, T-Helferzellen das CD4-Molekül auf ihrer Oberfläche (Parnes 1989). CD8+-T-Zellen binden an Zellen, die MHC-I exprimieren, CD4+-T-Zellen binden an MHC-II exprimierende Zellen (McDuffie, Roehm et al. 1987; Janeway 2001).

***Der Haupthistokompatibilitätskomplex – Antigenprozessierung und -präsentation:***

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC) umfasst eine Gruppe von Genen, die für membranständige Moleküle kodieren. Diese sind aus zwei Polypeptidketten zusammengesetzt und weisen in ihrer Oberfläche eine Vertiefung auf. Man unterscheidet den MHC-I und MHC-II.

MHC-I:

Proteine des MHC-I kommen auf allen kernhaltigen Körperzellen vor. Im normalen Zellstoffwechsel werden ständig intrazelluläre Proteine durch einen als Proteasom bezeichneten Enzymkomplex abgebaut. Die dabei entstehenden Peptidfragmente werden in einem ATP-abhängigen Prozess in das Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert, können hier anschließend durch eine Aminopeptidase nachprozessiert werden und binden schließlich in die Vertiefung des MHC-I-Moleküls. Im Anschluss wird das beladene MHC-I-Molekül zur Oberfläche transportiert. Gesunde Körperzellen tragen also Peptidfragmente aus der endogenen Proteinbiosynthese in den MHC-I-Molekülen. Kommt es nun zu einer Virusinfektion, so werden neuartige Peptidfragmente in den MHC-I-Molekülen gebunden. CD8<sup>+</sup>-T-Lymphocyten überwachen den Organismus ständig, ob körpereigene oder körperfremde Peptide von den MHC-I-Komplexen präsentiert werden.

Für eine Aktivierung brauchen CD8<sup>+</sup>-T-Lymphocyten zwei Signale: Das erste Signal erfolgt durch die Bindung des TCR an das mit Antigen beladene MHC-I-Molekül. Das zweite, co-stimulatorische Signal kommt entweder durch die Interaktion des B7-Moleküls (B7-1 = CD80; B7-2 = CD86) auf dendritischen Zellen und CD28 auf den T-Zellen oder durch IL-2, das von CD4<sup>+</sup>-Zellen ausgeschüttet wird, zustande (June, Ledbetter et al. 1990).

In der Folge werden cytotoxische T-Zellen als Effektorzellen sowie Gedächtniszellen gebildet (Jamieson and Ahmed 1989).

Bei der Kreuzpräsentation werden als Besonderheit Antigene aus dem extrazellulären Raum aufgenommen und auf den MHC-I-Komplexen den CTL präsentiert. Der Mechanismus der Kreuzpräsentation wurde vorwiegend für dendritische Zellen beschrieben und spielt eine wichtige Rolle bei der Immunantwort gegen Viren und Neoplasien und ist darüber hinaus wichtig für die Selbsttoleranz (von Engelhardt and Breves 2000; Heath and Carbone 2001; McDonnell, Robinson et al. 2010).

Viele Viren sind in der Lage, die Synthese von MHC-I-Molekülen durch virale Proteine zu unterdrücken. Dieser Mechanismus stellt eine Strategie der Immunevasion dar und kann zur Persistenzentstehung viraler Infektionen beitragen. Natürliche Killerzellen, Zellen des angeborenen Immunsystems, sollen diese Zellen, die keine MHC-I-Moleküle auf ihrer Oberfläche tragen, sowie Zellen, die auf ihrer Oberfläche Proteine exprimieren, die nur durch

Stressreaktionen wie Infektionen oder tumoröse Entartung entstehen, erkennen und zerstören (Ljunggren and Karre 1990).

### MHC-II:

MHC-II-Proteine werden von spezialisierten Zellen des Immunsystems, den Antigen-präsentierenden Zellen (APC) exprimiert. Zu ihnen gehören die B-Lymphocyten, die Makrophagen sowie die dendritischen Zellen, wobei letztere eine entscheidende Rolle einnehmen (Saudrais, Spehner et al. 1998).

Nach der MHC-II-Synthese wird im Endoplasmatischen Retikulum die Peptidbindungsstelle blockiert und die MHC-II-Proteine werden mit leerer Peptidbindungsstelle im Cytoplasma in Vesikeln gespeichert. Werden nun durch Endocytose Peptide aus dem extrazellulären Raum aufgenommen, so verschmelzen die Vesikel mit den Phagolysosomen und die MHC-II-Proteine binden Peptidfragmente, die aus dem Abbau von Antigenen entstanden sind. Nun werden die mit exogenen Peptiden beladenen MHC-II-Proteine zur Zelloberfläche transportiert (Harding and Geuze 1993). Durch die Bindung mit ihrem TCR werden die CD4+-T-Lymphocyten zusammen mit einem co-stimulatorischen Signal aktiviert (Harding 1993; Harding 1996). Dieses Signal ist wiederum die Interaktion des CD28 auf der CD4+-Zelle mit dem B7-Molekül auf der APC. Im Zusammenspiel mit verschiedenen Cytokinen proliferieren sie nun entweder zu T-Helfer-1-Zellen (TH1) oder T-Helfer-2-Zellen (TH2) als Effektorzellen sowie zu Gedächtniszellen.

Makrophagen und dendritische Zellen bilden nach der Stimulation durch Mikroorganismen IL-12. In der Folge wird die Bildung von TH1 Zellen und die zelluläre Immunität gefördert (Bliss, Van Cleave et al. 1996). TH1 Zellen produzieren u.a. IL-2, Tumor-Nekrose-Faktor-beta und Interferon-gamma, wodurch wiederum Makrophagen und CD8+-T-Lymphocyten sowie natürliche Killerzellen (NK) aktiviert werden. Die Zerstörung der Zielzelle erfolgt durch die Ausschüttung von Granula mit cytolytischen Substanzen, wie Perforin und Granzyme (Granzym A und Granzym B). Perforin ist ein Protein, das in die Zellmembran der Zielzelle integriert wird. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass sich durch Polymerisation transmembranäre Poren bilden, die eine kolloidosmotische Lyse der Zelle bewirken (Podack, Hengartner et al. 1991).

Die Endocytose von Antigenen durch B-Lymphocyten stimuliert die Bildung von TH2 Zellen und fördert die humorale Immunität. TH2 Zellen schütten v.a. die Cytokine IL-4 und IL-13 aus, wodurch wiederum die B-Lymphocyten zur Differenzierung in Plasmazellen und zur Produktion von Immunglobulinen angeregt werden (Stevens, Bossie et al. 1988; von Engelhardt and Breves 2000).

## 2.1.5.2 Immunantwort bei einer HCV-Infektion

Der Verlauf einer HCV-Infektion in der akuten Phase hängt wesentlich davon ab, inwieweit es zu einer Induktion der zellulären Immunabwehr kommt. Eine schwache Induktion der Immunabwehr geht in der Regel mit einer Chronifizierung der Infektion einher. Die chronische Hepatitis C-Infektion führt zu einer Entzündung und Fibrose der Leber. Dabei ist das HCV selbst nicht cytotoxisch (Hoofnagle 2002). Die durch das HCV verursachte Leberschädigung ist zum größten Teil eine Folge der zellulären Immunantwort (Mengshol, Golden-Mason et al. 2007). Hinweise auf den Grad der Leberschädigung geben dabei die Serum-Amino-Alanintransferase-Werte (GPT/ALT-Werte) (Fontana and Lok 2002; Sanai, Benmoussa et al. 2008).

### 2.1.5.2.1 *Humorale Immunantwort*

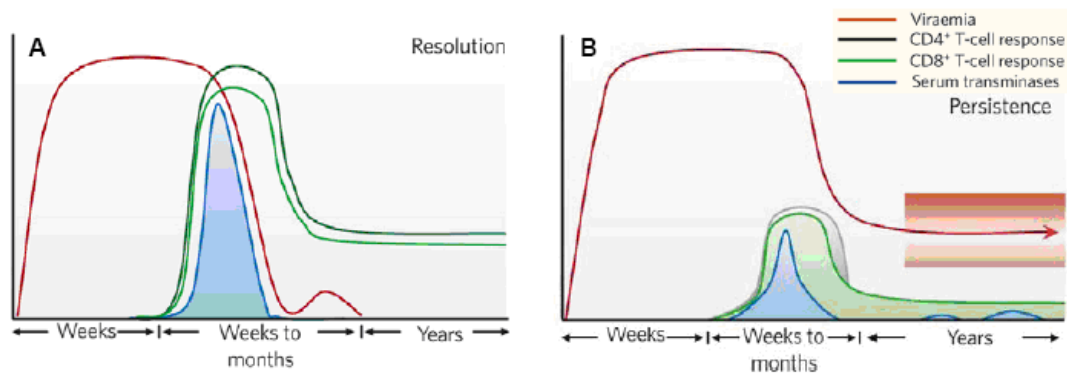
Erste Untersuchungen zu neutralisierenden AK wurden mit HCV-infizierten Schimpansen durchgeführt (Farci, Alter et al. 1994). 7 bis 8 Wochen nach einer Infektion können spezifische HCV-AK im Blut nachgewiesen werden, die sich gegen verschiedene Struktur- und Nichtstrukturproteine des HCV richten, wobei nur bestimmte AK effektiv zu einer Elimination des Virus beitragen (neutralisierende AK). Allerdings schützen diese Antikörper nicht vor einer Reinfektion bei Schimpansen und Menschen (Thimme, Lohmann et al. 2006). Bei den meisten Patienten, die eine HCV-Infektion in der frühen Phase der Infektion überwunden haben, konnten neutralisierende AK nachgewiesen werden, wohingegen bei chronisch infizierten Patienten nur eine schwache Immunantwort durch neutralisierende AK vorhanden war (Pestka, Zeisel et al. 2007). Die Etablierung von *HCV-like-particles* konnte wesentlich dazu beitragen, das Verständnis über neutralisierende Antikörper zu verbessern. *HCV-like-particles* sind rekombinante HCV-Strukturproteine, die sich in Insektenzellen selbst assemblieren können (Baumert, Vergalla et al. 1999). *HCV-pseudo-like-particles* (Bartosch, Dubuisson et al. 2003) sind chimäre Retroviren, die an ihrer Oberfläche die HCV-Hüllproteine E1 und E2 tragen. Mit Hilfe dieser Modelle konnte gezeigt werden, dass verschiedene Epitope innerhalb der Strukturproteine E1 und E2 von neutralisierenden Antikörpern gebunden werden, wobei die hypervariable Region 1 (HVB-1) und benachbarte Epitope von besonderer Bedeutung sind. Diese Epitope spielen eine besondere Rolle bei der HCV-Infektion, insbesondere der CD81 Bindung und Membranfusion. Bei chronischen HCV-Infektionen sind bei einigen Patienten ebenfalls neutralisierende Antikörper vorhanden, wobei hier in erster Linie das Vorhandensein von HCV-Quasispecies dafür verantwortlich gemacht wird, dass durch die humorale Immunantwort die HCV-Infektion nicht effektiv überwunden werden kann (Farci, Shimoda et al. 1996). Des Weiteren geht man davon aus, dass Wechselwirkungen zwischen HCV-Proteinen und high-density-Lipoproteinen (HDL) bzw. der HCV-Rezeptor SR-B1 die Wirkung neutralisierender AK verhindern und den Eintritt

des Virus in die Zelle erleichtern (Bartosch, Verney et al. 2005). Auch scheinen Glycane des E2-Strukturproteins zu einer schlechten Elimination des Virus durch neutralisierende AK beizutragen (Helle, Goffard et al. 2007). Wechselwirkungen mit nicht-neutralisierenden AK beeinträchtigen ebenfalls die Wirkungsweise der neutralisierenden Antikörper (Zhang, Wu et al. 2007; Thimme, Neumann-Haefelin et al. 2008).

#### **2.1.5.2.2 Zelluläre Immunantwort**

Versuche mit Schimpansen und Studien mit HCV-infizierten Patienten haben die enorme Wichtigkeit von polyklonalen CD4+- und CD8+- Zellen für die Pathogenese, insbesondere in Hinblick auf Viruselimination bzw. Chronizität einer HCV-Infektionen gezeigt (Shoukry, Grakoui et al. 2003; Woollard, Grakoui et al. 2003; Bowen and Walker 2005). Dabei hat man beobachtet, dass eine starke und nachhaltige T-Zellantwort, v.a. der CD4+-Zellen, in der frühen Phase der HCV-Infektion in der Regel zu einer Elimination des Virus führt (**Abb. 3 A**) (Diepolder, Zchoval et al. 1995; Takaki, Wiese et al. 2000; Thimme, Oldach et al. 2001; Kaplan, Sugimoto et al. 2007; Zhang, Dou et al. 2009). Die HCV-spezifischen CD4+-Zellen erkennen eine Vielzahl viraler Struktur- und Nichtstrukturproteine. Sie helfen bei der Aufrechterhaltung der cytotoxischen T-Zellantwort und sezernieren Cytokine, u.a. Interferon-gamma, Interleukin 2 und Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , die hemmend auf die Virusreplikation wirken (Gerlach, Diepolder et al. 1999). Viele akute HCV-Infektionen verlaufen inapparent. Kommt es zu einer Virus-spezifischen CD8+-Zellantwort, so tritt diese erst 4-8 Wochen nach einer HCV-Infektion auf und ist, neben einer Elimination des Virus, in der Regel mit einem temporären Leberschaden assoziiert (Thimme, Oldach et al. 2001). Dabei spielt bei den CD8+ T-Zellen einerseits die Fähigkeit zur Cytolyse (Cucchiaroni, Kammer et al. 2000) und andererseits die Interferon-gamma-Sekretion eine Rolle (Gruner, Gerlach et al. 2000; Thimme, Neumann-Haefelin et al. 2008).

Kann eine akute HCV-Infektion nicht überwunden werden, sondern nimmt einen chronischen Verlauf, so fehlt insbesondere in der frühen Infektionsphase eine effektive CD4+-Zellantwort. Außerdem zeigten Patienten, die eine chronische HCV-Infektion entwickelten, eine schwache CD8+-Zellantwort (**Abb. 3 B**), die nur wenige HCV-Epitope erkannte, oder sie fehlte ganz (Bowen and Walker 2005). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass in Patienten 20 Jahre nach dem Überwinden einer HCV-Infektion HCV-spezifische CD4+- und CD8+-Zellen nachweisbar waren (Takaki, Wiese et al. 2000).



**Abb. 3 Immunantwort nach einer HCV-Infektion.**

Die rote Linie zeigt den Verlauf der Virämie, die dunkelblaue bzw. die grüne Linie stellt die CD4+- bzw. CD8+-T-Zellantwort dar und die hellblaue Linie zeigt die Serum-Alanin-Aminotransferase-Werte (GPT/ALT). In **A** ist das Überwinden einer HCV-Infektion auf Grund einer starken T-Zellantwort dargestellt. **B** zeigt eine persistierende Infektion in Folge einer schwachen T-Zellantwort (modifiziert nach Bowen et al., 2005).

Die Persistenz des Virus innerhalb des Wirtes und die damit einhergehenden Chronizität der HCV-Infektion ist in erster Linie auf die Fähigkeit zur Immunevasion des HCV zurückzuführen (Pawlotsky 2009). Diese wiederum basiert auf der großen Diversität des HCV, die sich einerseits innerhalb der Genotypen und andererseits durch die Ausbildung von Quasispezies zeigt (Bostan and Mahmood 2010). Auf der anderen Seite hat das HCV in der akuten Infektionsphase eine sehr schnelle Replikationsrate von  $10^{10}$  bis  $10^{12}$  Virionen pro Tag. Dadurch werden innerhalb der ersten Infektionswochen, vor Einsetzen der zellulären und humoralen Immunantwort, sehr hohe Virustiter erreicht.

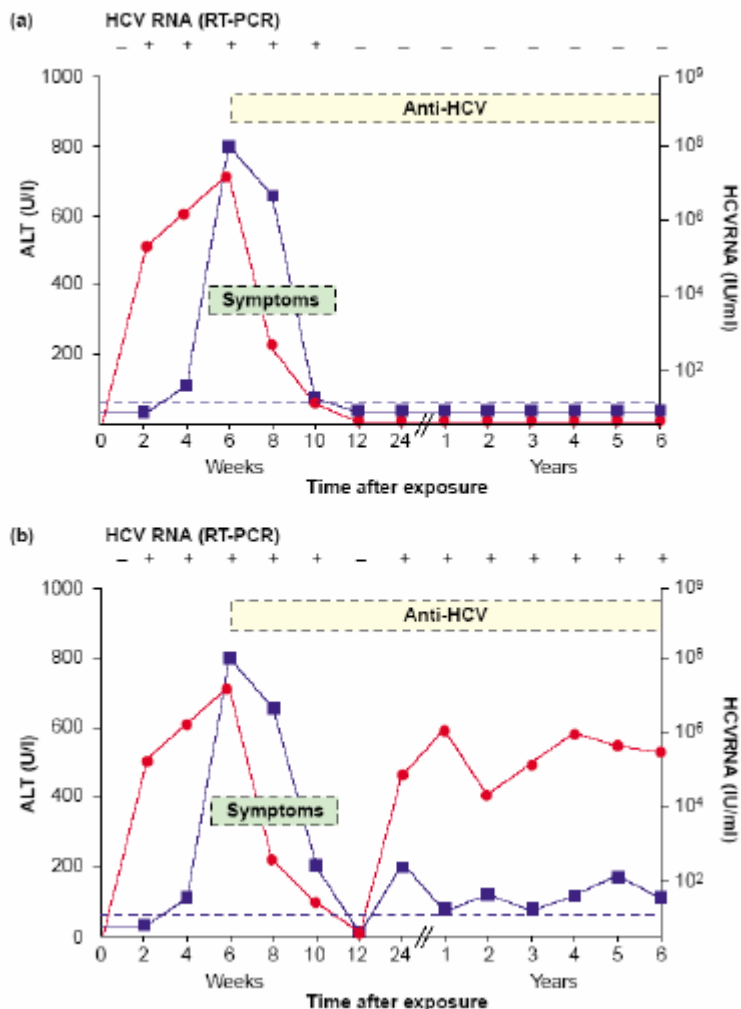
### 2.1.6 Klinik, Verlaufsformen und Diagnose

Eine Infektion mit dem Hepatitis C-Virus kann eine akute oder chronische Leberentzündung verursachen. Bei etwa 25 % der HCV-Infektionen kommt es zum Auftreten einer akuten Leberentzündung nach einer Inkubationszeit von im Durchschnitt 7 Wochen (4 bis 20 Wochen), die allerdings in den meisten Fällen asymptomatisch oder mild verläuft. Symptome, wie Abgeschlagenheit, Schwäche oder Gelbsucht, treten nur bei etwa 30 % der Patienten auf und gehen mit dem Vorhandensein von HCV-spezifischer RNA im Serum sowie mit einem Anstieg der Serum-Alanin-Aminotransferase (GPT/ALT) einher. Die ALT ist ein spezifisches Leberenzym, das sich im Cytoplasma der Leber befindet und bei einer Schädigung der Leberzelle ins Blut gelangt. Spezifische HCV-Antikörper können im Serum nachweisbar sein (Hoofnagle 1997).

Nach einer akuten Leberentzündung kann sich die Leber vollständig regenerieren (**Abb. 4 (a)**). Die Höhe des Alanin-Aminotransferase-Wertes (GPT/ALT) im Serum des Patienten kann dabei Hinweise auf den Grad der Leberschädigung geben (Fontana and Lok 2002; Sanai, Benmoussa et al. 2008). Es wurden aber auch fulminante Verläufe nach HCV-Infektionen beschrieben, die allerdings extrem selten vorkommen (Farci, Alter et al. 1996).



In 50 bis 80 % der Erkrankungsfälle nimmt die Hepatitis einen chronischen Verlauf mit permanent erhöhten oder fluktuierenden Serum-Alanin-Aminotransferase-Werten (**Abb. 4 (b)**) (Seef 2002). Dies ist dann anzunehmen, wenn eine Viruspersistenz von mehr als 6 Monaten gegeben ist. Die meisten Menschen zeigen in den ersten Jahren nach einer Infektion keine Symptome. Im Verlauf einer progressiven Leberschädigung kann sich eine Leberfibrose und schließlich bei ca. 20 % der Patienten mit chronischer Hepatitis C eine Leberzirrhose entwickeln. Die Dauer von der Infektion bis zur vollständigen Leberzirrhose beträgt in der Regel 20 bis 30 Jahre. Werden dabei bei den Patienten die klinischen Symptome der Leberzirrhose apparent, steigt die Mortalität auf 50 % innerhalb von 5 Jahren (Wright 2002). Etwa 20 % der chronisch mit HCV infizierten erkranken an einem Leberzellkarzinom (HCC) (Castello, Scala et al. 2010; Tsai and Chung 2010).



**Abb. 4 Typischer Verlauf einer HCV-Infektion.**

**(a)** Verlauf einer akuten kurierten HCV-Infektion. HCV-RNA (rot) kann bereits 2 Wochen nach der Infektion im Serum detektiert werden. ALT-Werte (blau) steigen 2-8 Wochen nach einer Infektion. Sobald die HCV-RNA -Werte zurückgehen, verschwinden auch die Symptome und spezifische HCV-Antikörper können nachgewiesen werden. **(b)** Verlauf einer akuten HCV-Infektion, die chronisch wird. Im Gegensatz zum Verlauf der akuten kurierten HCV-Infektion fluktuieren die HCV-RNA- und ALT-Werte im Serum nach dem ersten Abklingen der Symptome (modifiziert nach Racanelli et al., 2002).

Eine Infektion mit dem Hepatitis C Virus wird in der frühen Phase nur selten erkannt, da sie, wie oben beschrieben, in den meisten Fällen symptomlos verläuft. Lediglich bei routinemäßigen Blutuntersuchungen deuten erhöhte Serum-Alanin-Aminotransaminase-Werte auf eine Leberentzündung oder auf eine Erkrankung des Gallensystems hin. Beim Verdacht auf eine HCV-Infektion besteht die Diagnose aus dem Nachweis HCV-spezifischer Antikörper im Serum mittels ELISA. Einem positiven ELISA-Befund folgt ein direkter Nachweis von Virus-Genom mittels RT-PCR (Czepiel, Biesiada et al. 2008; Baranov and Maleev 2009; Zidovec Lepej, Dusek et al. 2009). Dabei ist ein Antikörperrnachweis erst 7 bis 8 Wochen nach einer Infektion möglich, wohingegen HCV-RNA bereits 1-2 Wochen nach einer Infektion im Serum nachweisbar ist.

HCV ist in 90 % der Fälle der Grund für die Entstehung eines primären Lebertumors bei Erwachsenen. Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist weltweit die fünfthäufigste Krebserkrankung und die dritthäufigste Todesursache im Zusammenhang mit einer Krebserkrankung. Über 600.000 Fälle von HCC werden jedes Jahr diagnostiziert (davon etwa 19.000 in den USA und 32.000 in der EU). 2002 starben weltweit etwa 600.000 Menschen infolge eines Hepatozellulären Karzinoms (Blonski and Reddy 2008). Die Gefahr für die Entstehung einer Leberzirrhose bzw. eines hepatozellulären Karzinoms steigt bei einer Coinfektion mit Hepatitis B, HIV, Alkoholmissbrauch sowie bei Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes und Obesitas (MacDonald, Nelson et al. 2008; Zule, Costenbader et al. 2009).

### **2.1.7 Therapie**

Eine akute Infektion mit HCV zeigt bei einer Behandlung mit pegyliertem Interferon-alpha-2b eine Ansprechrate von 95 % (Jaeckel, Cornberg et al. 2001). Da allerdings etwa 50 % der Patienten 12 Wochen nach Symptombeginn eine Clearance des Virus auch ohne Behandlung erreichen, gibt es Empfehlungen nur diejenigen Patienten für eine Dauer von 12 Wochen zu behandeln, bei denen 12 Wochen nach Krankheitsbeginn HCV-RNA nachgewiesen werden kann. Die so behandelten Patienten zeigen in 80 % der Fälle eine vollständige Elimination des Virus. Bei asymptomatischer akuter HCV-Infektion sollte jedoch umgehend mit der Therapie begonnen werden (Gerlach, Diepolder et al. 2003).

Die Standardtherapie zur Behandlung einer chronischen Hepatitis C besteht heute aus dem pegyliertem Interferon-alpha, kombiniert mit dem Virostatikum Ribavirin. Dabei sind 2 verschiedene Derivate des Interferon-alpha zur Therapie der chronischen Hepatitis zugelassen – das pegylierte Interferon-alpha-2a und das pegylierte Interferon-alpha-2b. Die Applikation der pegylierten Interferone-alpha erfolgt einmal wöchentlich subkutan, im Falle des pegylierten Interferon-alpha-2a in einer Dosis von 180 Mikrogramm/Patient/Woche und im Falle des pegylierten Interferon-alpha-2b in einer Dosis 1,5 Mikrogramm/Kg/Woche. Das

Ribavirin wird täglich oral verabreicht (0,8-1,2 g/Patient/Tag) (Di Bisceglie and Hoofnagle 2002; Ferenci 2006; Lagging, Wejstal et al. 2009; Rong and Perelson 2010). Die Therapiedauer und der Therapieerfolg hängen von verschiedenen Faktoren, wie z.B. HCV-Genotyp und Konstitution des Patienten, ab (Hoofnagle, Wahed et al. 2009). So beträgt die Therapiedauer beim HCV-1-Genotyp 48 Wochen und der Therapieerfolg im Sinne einer vollständigen Viruselimination liegt bei 55 %. Die Therapiedauer im Falle der HCV-2- und 3-Genotypen sollte 24 Wochen betragen. Ein Therapieerfolg stellt sich bei 78 % der Patienten ein (Czepiel, Biesiada et al. 2008).

Als letzte Therapieoption bei einer Leberzirrhose kommt eine Lebertransplantation in Frage. Unter der antiviralen Therapie mit Interferon-alpha und Ribavirin können zahlreiche Nebenwirkungen auftreten, die aber in der Regel reversibel sind. Dem Interferon-alpha werden Nebenwirkungen wie grippeähnliche Symptome, Müdigkeit, Alopezie, Fehlfunktionen der Schilddrüse sowie psychische Störungen zugeordnet (Negro 2010; Silverman, Kim et al. 2010). Ribavirin kann in einigen Fällen eine Hämolyse hervorrufen (Vcev 2009). Aufgrund der Nebenwirkungen und der für den Patienten umständlichen subkutanen Interferon-alpha-Applikationen ist die Compliance der Patienten oft schlecht und die Therapie wird häufig abgebrochen (Kristensen, Sundoy et al. 2009; Thitinan and McConville 2009).

Ziel einer antiviralen Therapie HCV-infizierter Patienten ist die nachhaltige Elimination des Hepatitis C-Virus. Um in der Zukunft eine chronische HCV-Infektion effektiver therapieren zu können, müssen neuartige Medikamente entwickelt werden. Hier gibt es vier verschiedene Ansätze:

1.) Weiterentwicklung von Interferonen: Die neueren pegylierten alpha-Interferone haben bereits eine längere Halbwertszeit als die früher verwendeten alpha-Interferone und müssen deshalb nur noch einmal pro Woche verabreicht werden (frühere alpha-Interferone 3 mal pro Woche). Die neuartige Verbindung des Interferons mit Albumin führt zu einer weiteren Verlängerung der Halbwertszeit (Rustgi 2009; Flisiak and Flisiak 2010). Des Weiteren könnten Wirkstoffe, die zur Freisetzung körpereigener Interferone führen, in Zukunft eine Rolle spielen. Auch die Entwicklung von oral zu verabreichendem Interferon würden einen Fortschritt in der Therapie der Hepatitis C bedeuten.

Ein Nachteil der Interferontherapie bleiben die erheblichen Nebenwirkungen.

2.) Entwicklung spezifischer HCV-Inhibitoren (spezifische antivirale Substanzen, Stat-C): Spezifische HCV-Inhibitoren richten sich gegen bestimmte HCV-Proteasen und -Polymerasen. An dieser Stelle sind in erster Linie die Wirkstoffe Telaprevir und Boceprevir zu nennen, die sich gegen die Nichtstrukturproteine 3 und 4a richten (Liu-Young and Kozal 2008; Lopez-Labrador 2008; Kronenberger and Zeuzem 2009; Paula, Pablo et al. 2009). Die beiden Wirkstoffe sind bereits in den USA zugelassen, für Telaprevir erfolgte im September

2011 auch die Zulassung für Europa und es wird bereits in Kombination mit Interferon-alpha und Ribavirin als Tripletherapie gegen HCV Genotyp 1-Infektionen eingesetzt.

Auch stellt das Nichtstrukturprotein 4B einen Angriffspunkt für inhibitorische Wirkstoffe dar, welches ein integriertes Membranprotein von HCV mit mindestens 4 Transmembran-Motiven (TM) ist und wichtige Funktionen im Lebenszyklus des HCV hat (Dvory-Sobol, Pang et al. 2010). Das zelluläre Signalmolekül c-Raf wurde als Bindungspartner von NS5A identifiziert und ist essentiell für die HCV-Replikation. Es konnte gezeigt werden, dass der Wirkstoff Sorafenib (Bay 43-9006, Nexavar, Bayer Health Care, Leverkusen) sehr spezifisch c-Raf inhibieren kann und so durch die effektive Hemmung der HCV-Replikation ein großes Potenzial für die antivirale Therapie besitzt (Himmelsbach, Sauter et al. 2009).

3.) Entwicklung von Modulatoren des Immunsystems: Durch die Gabe von HCV-Proteinen an Hepatitis C-infizierte Patienten soll eine spezifische Aktivierung des Immunsystems erreicht werden und das Virus letztendlich eliminiert werden (Lugo-Baruqui, Bautista Lopez et al. 2009).

4.) Entwicklung von Alternativen zu Ribavirin: Ribavirin, als Polymerase Inhibitor, in Kombination mit pegyliertem alpha-Interferon ist heute essentiell in der Therapie von HCV (Jain and Zoellner 2010). Allerdings können durch Ribavirin erhebliche Nebenwirkungen, wie z.B. hämolytische Anämie, auftreten, weswegen die Dosis in vielen Fällen herabgesetzt oder die Therapie abgebrochen werden muss (Shiffman 2009).

Ein prophylaktischer Schutz im Sinne einer HCV-Vakzine ist noch nicht vorhanden.

## **2.2 HCV-Vakzine**

### **2.2.1 Stand der Forschung**

Der Verlauf einer HCV-Infektion in der akuten Phase wird auch ganz wesentlich davon bestimmt, inwieweit es zu einer effizienten Induktion der zellulären Immunabwehr kommt. Eine schwache Induktion der zellulären Immunabwehr geht in der Regel mit einer Chronifizierung der Infektion einher. Eine ideale Vakzine sollte daher einerseits eine starke humorale Antwort auslösen und zum anderen HCV-spezifische T-Helfer-Zellen sowie CTLs induzieren.

Ein wesentliches Problem bei der Entwicklung eines HCV-Impfstoffes ist die große genetische Heterogenität und Variabilität des Virus, die in erster Linie auf die fehlende proof-reading-Funktion der RNA-Polymerase zurückzuführen ist. Zum anderen erschweren das Fehlen eines geeigneten Tier-Modells und die Tatsache, dass es vor kurzem nicht möglich war, signifikante Mengen an infektiösen HCV-Partikeln rekombinant zu erzeugen eine Vakzine-Entwicklung. Ausgehend von einem HCV Genotyp 2a-Isolat eines Patienten mit einem fulminanten Verlauf konnten 3 Arbeitsgruppen ein replikationsfähiges HCV Genom

(JFH-1) etablieren, das in Zellkultur repliziert, was die Forschung einen großen Schritt weiterbrachte (Lindenbach, Evans et al. 2005; Wakita, Pietschmann et al. 2005; Zhong, Gastaminza et al. 2005). Verschiedene methodische Ansätze sind bislang in der HCV-Impfstoffentwicklung untersucht worden, ohne dass jedoch ein klarer Durchbruch erzielt werden konnte. Ein Ansatz ist hierbei die Entwicklung von subunit-Vakzinen. Dazu wurden die gereinigten HCV-Hüllproteine E1 und E2 in den Organismus eingebracht, mit dem Ziel, eine Immunantwort auszulösen. Die Immunisierung mit Subunit-Proteinen führte jedoch im Schimpansen-Modell nur zu einer Teilprotektion (Choo, Kuo et al. 1994). Mittels einer phage display library auf der Basis eines chronisch HCV-infizierten Spenders konnte gezeigt werden, dass prinzipiell die Generierung von Antikörpern, die gegen eine heterologe HCV-Infektion protektiv wirken, möglich ist. Entscheidend für diesen Effekt ist die antigene Region (AR)3 von E2 (Law, Maruyama et al. 2008). Ein weiteres Forschungsgebiet beschäftigt sich mit der DNA-Vakzinierung, bei der genetisches Material in den Organismus gebracht, von der Zelle aufgenommen und zur Expression gebracht wird (Sallberg, Frelin et al. 2009; Gill, Soderholm et al. 2010). Eine Vakzinierung mit DNA, die für bestimmte HCV-Struktur- und Nicht-Strukturproteine kodiert, konnte in Mäusen eine starke CD4- und CD8-Antwort auslösen (Encke, zu Putlitz et al. 1999). Ausgehend von der Beobachtung, dass beim natürlichen Verlauf einer ausheilenden HCV-Infektion eine polyklonale CD4+ und CD8+-T-Zellantwort eine entscheidende Rolle spielt (Lechner, Wong et al. 2000; Lauer and Walker 2001; Jo, Aichele et al. 2009) und von der Beobachtung auftretender Reinfektionen im Schimpansenmodell bei Depletion von CD4+ oder CD8+ T-Zellen (Grakoui, Shoukry et al. 2003; Shoukry, Grakoui et al. 2003), gibt es verstärkt Ansätze, HCV-spezifische T-Zell Vakzine zu entwickeln (Houghton and Abrignani 2005; Fattori, Zampaglione et al. 2006; Folgori, Capone et al. 2006; Kuzushita, Gregory et al. 2006; Memarnejadian and Roohvand 2010). So konnte unter Verwendung einer Kombination adenoviraler und nichtviraler Gentransfervektoren, welche für die HCV-Nichtstrukturproteine NS3-NS5B kodierten, in Schimpansen eine Immunität auch gegen heterologe HCV erzielt werden (Folgori, Capone et al. 2006). Andere HCV-Impfstoff-Strategien beschäftigen sich mit dendritischen Zellen, die eine wesentliche Rolle bei der Induktion einer Immunantwort, insbesondere der T-Zellaktivierung, einnehmen. Hierbei wurden dendritische Zellen mit HCV-Proteinen core bzw. NS5 inkubiert und anschließend Mäusen appliziert. Die so behandelten Mäuse zeigten anschließend eine signifikant erhöhte CD8+-Zellantwort im Vergleich zu unbehandelten Tieren (Encke, Findelee et al. 2005; Kuzushita, Gregory et al. 2006). Ein etabliertes Werkzeug zur effizienten Induktion von B- und T-Zellantworten stellen VLPs dar, die Antigene auf ihrer Oberfläche exponieren (Pumpens and Grens 2001; Ruedl, Schwarz et al. 2005). In verschiedenen Mausmodellen induzieren HCV-LPs eine starke, virusspezifische humorale und zelluläre Immunantwort, die auch HCV-spezifische

cytotoxische T-Zellen umfasst (Lechmann, Murata et al. 2001). In einem anderen Fall wurde an das C-terminale Ende des HBV core-Proteins (HBc) die HCV-Proteine core bzw. NS3 angehängt und Mäusen verabreicht. Die so behandelte Mäuse zeigten im Fall des core-Proteins nur eine geringe humorale- und zelluläre Immunantwort, jedoch im Falle des NS3 eine ausgeprägte humorale Immunantwort (Mihailova, Boos et al. 2006).

### **2.2.2 Virus like Particles (VLPs) – HBV core als Epitopträger**

Als VLPs bezeichnet man Viruspartikel, die biotechnologisch hergestellt wurden. Sie ähneln in ihren morphologischen und immunologischen Eigenschaften ihren nativen Ursprungsviren, enthalten aber keine viralen Nukleinsäuren und sind deshalb nicht in der Lage, Zellen zu infizieren. Durch eine gentechnische Modifikation der Monomere, aus denen die VLP assembliert sind, ist es möglich, Partikel mit veränderten Eigenschaften zu konstruieren. So können durch das Integrieren von Fremdsequenzen Antigene auf der Partikeloberfläche in sehr großer Dichte und sehr geordneter Struktur präsentiert werden, wodurch eine effiziente Immunantwort erzielt werden soll (Pumpens and Grens 2001).

Nach endocytotischer Aufnahme der Partikel durch APCs kann es sowohl zu einer MHC-II abhängigen Präsentation von Antigen-spezifischen Peptiden als auch durch Kreuzpräsentation zu einer MHC-I abhängigen Präsentation kommen. Es konnte in verschiedenen Untersuchungen der Rota-, Papilloma-, und Norwalkvirusinfektion in Tiermodellen gezeigt werden, dass eine Immunisierung mit VLPs zu einer Immunantwort führt, die den Wirt effektiv vor einer Infektion schützt (Herbst-Kralovetz, Mason et al. 2010). Klinische Studien von Papillomavirus- und Norwalk-VLPs am Menschen zeigten eine hohe Immunogenität der VLP-Vakzine bei fehlenden Nebenwirkungen (Ball, Graham et al. 1999; Estes, Ball et al. 2000; Harro, Pang et al. 2001). So sind in Deutschland die Impfstoffe Cervarix<sup>R</sup> von Glaxo Smith Kline und Gardasil<sup>R</sup> von Sanofi Pasteur MSD/Merck seit 2006 bzw. 2007 zur Prophylaxe einer Papillomavirus-Infektion zugelassen. Beide Impfstoffe bestehen aus dem gentechnisch hergestellten L1-Protein, das das Viruskapsid aufbaut und sich selbständig zu einem kompletten Kapsid zusammenlagert. Die ebenfalls bereits zugelassenen HBV-Impfstoffe von Glaxo Smith Kline und Aventis Pasteur MSD bestehen aus rekombinant hergestellten HBsAg-Oberflächenproteinen, die sich spontan zu 22 nm-Partikeln zusammenlagern (Ludwig and Wagner 2007).

Auch gibt es heute durch die Cytos Biotechnology AG und durch die Agency for Science, Technology and Research (A\*STAR), verstärkt Bemühungen, einen Grippeimpfstoff auf der Basis von VLPs, auf deren Oberfläche das Influenzavirusprotein Hämagglutinin präsentiert wird, auf den Markt zu bringen.

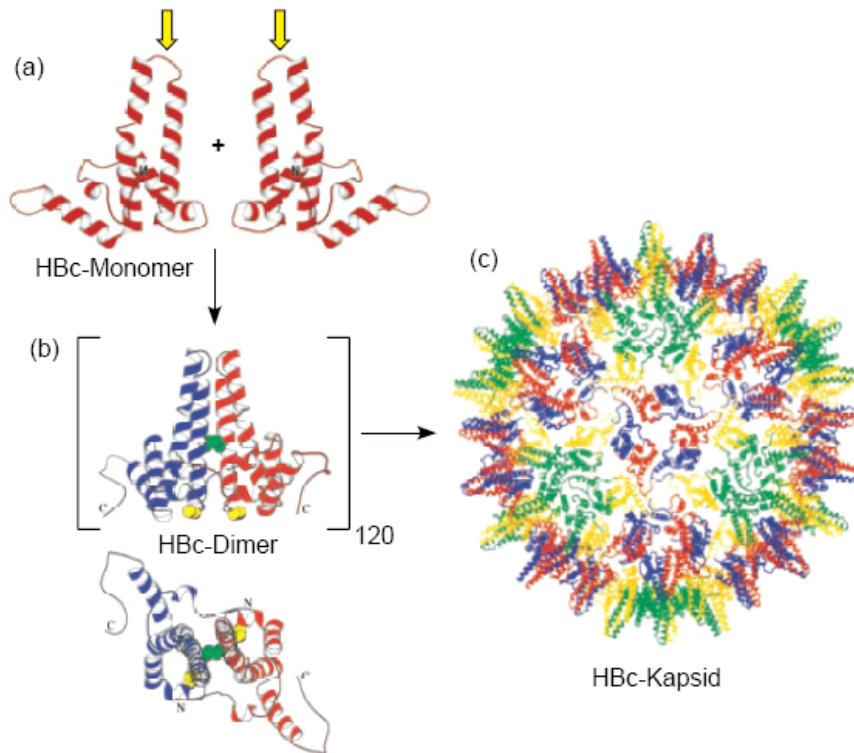
### 2.2.2.1 Struktur des HBV

Das Hepatitis B-Virus ist ein ca. 42 nm großes, partiell doppelsträngiges, ikosaedrisches und behülltes DNA-Virus und gehört zu der Familie der Hepadnaviridae. Das 3,2 kb große Genom beinhaltet vier offene Leserahmen (open reading frame, ORF), die sich teilweise überlappen, und kodiert für folgende Strukturproteine: HBcAg, SHBs, MHBs, LHBs, Polymerase und terminales Protein. Die core-Antigen-Monomere (HBcAg) assemblieren zum Kapsid, welches die virale DNA umschließt. Umgeben ist dieses von der Lipidhülle, in die die Oberflächenproteine (HBsAg hepatitis B surface antigen) SHBs, MHBs und LHBs mit unterschiedlichen Größen eingeschlossen sind (Sidorkiewicz and Plucienniczak 1994). Das kleine HBsAg SHBs entsteht aus der S-Domäne, das mittlere MHBs wird aus der Pre-S2- und der S-Domäne gebildet, während sich das große LHBs aus der Pre-S1-, Pre-S2- und der S-Domäne zusammen setzt. Die Polymerase ist ein multifunktionelles Protein. Sie besitzt eine Reverse-Transkriptase-Funktion und ist für das Umschreiben der prägenomischen RNA in das zirkuläre, teilweise doppelsträngige Genom zuständig. Das terminale Protein stellt eine weitere Domäne der Polymerase dar und dient als Primer für die Replikationsinitiation. Des Weiteren werden die Nichtstrukturproteine HBx und HBeAg exprimiert. Die genaue Funktion des HBx-Proteins ist noch nicht geklärt, es scheint aber eine entscheidende Rolle bei der Replikation des Virus zu spielen (Lizzano, Yang et al. 2010). Das HBeAg (hepatitis B virus early antigen) ist eine N-terminal verlängerte und C-terminal verkürzte Version des HBcAg. Es wird während der HBV-Replikation in der Leber in die Blutbahn abgegeben (Mitamura 1995) und dient als serologischer Marker für eine aktive HBV-Replikation (Heijntink, Snobl et al. 1995; Murakami 2004).

### 2.2.2.2 Das HBV core-Protein (HBcAg) und seine Modifikationen

Das HBV core-Protein besteht aus 183 bis 185 AS (je nach Subtyp) und hat eine Größe von 21 kDa. Bakteriell hergestellte HBcAg bilden unter physiologischen Bedingungen Dimere, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Diese HBcAg-Dimere assemblieren nun zum größten Teil zu Partikeln mit der Triangulationszahl 4 (T=4), die sich aus 120 HBcAg-Dimeren zusammensetzen und eine Größe von 34 nm aufweisen. Ein kleinerer Teil assembliert aus 90 HBcAg-Dimeren zu den 30 nm großen T=3 Partikeln (Zlotnick, Palmer et al. 1999). Durch Deletion am C-Terminus wird das Gleichgewicht zugunsten der T=3-Partikel verschoben (Zlotnick, Cheng et al. 1996).

Kryomikroskopische Untersuchungen der rekombinant hergestellten Partikel haben gezeigt, dass die HBcAg-Dimere eine zum größten Teil alpha-helikale Faltung aufweisen und auf der Partikeloberfläche *Spike-tips* mit der hauptimmunogenen Region der core-Proteine ausbilden (**Abb. 5**). Dieser Bereich liegt zwischen den AS 78-82 (Bottcher, Wynne et al. 1997; Conway, Cheng et al. 1997).



#### Abb. 5 Struktur des HBV-Kapsids.

(a) zeigt das HBC-Monomer mit dem *Spike-tip* (gelber Pfeil). In (b) ist das HBC-Dimer dargestellt, das durch Disulfidbrückenbildung über Cys-61 (grüne Kugel) zwischen den beiden HBC-Monomeren entsteht. Cys-48 (gelbe Kugel) bildet keine Disulfidbrücken aus. (c) zeigt schließlich das aus 120 Dimeren bestehende HBC-Kapsid (modifiziert nach Wynne et al., 1999).

In diese *Spike-tips* können größere Proteine inseriert werden, ohne die Fähigkeit der Partikelbildung zu beeinträchtigen. So konnte im Falle des GFP ein 238 AS umfassendes Protein korrekt gefaltet und unter Beibehaltung der fluoreszierenden Eigenschaften eingefügt werden (Kratz, Bottcher et al. 1999). Auch N- und C-terminal wurden Positionen gefunden, an denen man Fremdpeptide einfügen kann (Lachmann, Meisel et al. 1999). Am C-terminalen Bereich besitzt das core-Protein einen 39 Argininreste umfassenden Bereich. Eine Verkürzung des core-Proteins auf 140 As am C-terminalen Bereich hat keine Bedeutung für die korrekte Assemblierung der HBCAg-Monomere zu Partikeln und für die Lokalisation der inserierten Antigene auf der Partikeloberfläche (Borisova, Berzins et al. 1989; Zlotnick, Cheng et al. 1996). Allerdings binden diese Partikel weniger effizient Nukleinsäuren. Außerdem sind sie in der Regel instabiler, wobei die Ausbeute korrekter assemblierter Partikel im prokaryotischen Expressionssystem besser ist, als bei aus gesamtem Protein aufgebauten Partikeln (Birnbaum and Nassal 1990). N-terminal angehängte Sequenzen können in den einzelnen Untereinheiten der Partikel unterschiedliche Orientierungen aufweisen. Durch das Einfügen eines *Linkers* stellt man die Exposition des Antigens auf der Partikeloberfläche sicher (Schodel, Peterson et al. 1993). Durch die geordnete Struktur der Antigene auf der Partikeloberfläche erfolgt eine effiziente Induktion der B-Zellantwort (Milich and McLachlan 1986) und durch Kreuzpräsentation auch



eine Induktion der T-Zellantwort (Ruedl, Storni et al. 2002; Kim, Gambhir et al. 2010; Win, Ward et al. 2010).

Die Effizienz der MHC-Klasse I-abhängigen Präsentation wäre deutlich zu steigern, wenn die VLPs direkt in das Cytoplasma eingebracht würden und somit einer proteasomalen Prozessierung zugänglich sind. Dieses kann durch das zusätzliche Integrieren eines Membranpermeabilitätsmotivs erreicht werden.

## **2.3 Zellpermeable Peptide**

Zellpermeable Peptide stellen ein wichtiges Werkzeug dar, um im Rahmen zellbiologischer Untersuchungen ein besseres Verständnis der biochemischen Prozesse innerhalb der Zelle zu erlangen und dienen in vielen Fällen als Voraussetzung für die Entwicklung von Pharmaka. Sie ermöglichen einerseits die Betrachtung und Modulation intrazellulärer Prozesse. Auf der anderen Seite eröffnen sie die Möglichkeit, gezielt pharmazeutische Wirkstoffe in das Zielgewebe und in die Zelle zu transportieren. Dadurch können die therapeutische Effizienz erhöht und systemische Nebenwirkungen reduziert werden. Dies ist sowohl in der antiviralen- als auch in der Tumorthherapie von großer Bedeutung (Chen, Da et al. 2010; Essafi, Baudot et al. 2010; Nishikawa, Otsuki et al. 2010).

### **2.3.1 Membranen**

Für die Entstehung und Aufrechterhaltung biologischer und physiologischer Prozesse ist eine Kompartimentierung unabdingbar. So wird sowohl das Zellinnere von der Außenwelt getrennt als auch die Zelle als solche in zahlreiche Kompartimente gegliedert, die jeweils spezifische Funktionen haben. Die Zellmembran bildet eine ca. 5 bis 6 nm dicke Grenzschicht zwischen Cytoplasma und dem Extrazellularraum. Neben der Barrierefunktion besitzt sie weitere Aufgaben wie die Kontrolle der Stoffaufnahme und -ausscheidung, die Zell-Zell-Erkennung, die Signalaufnahme, -verarbeitung und -weitergabe sowie die Ausbildung von Zell-Zell-Verbindungen. Sie besteht aus einer Lipiddoppelschicht, die teils aus Phospholipiden, teils aus Glykolipiden und teils aus Cholesterol besteht. Dabei haben die Phospho- und Glykolipide amphipatische Eigenschaften. Neben Lipiden enthält die Zellmembran auch zahlreiche Proteine, die in extrinsische- (partiell in einer der Membranschichten eingebaut) und intrinsische Proteine (durchspannen die ganze Membran) eingeteilt werden. Sie spielen u.a. eine wichtige Rolle bei der Signalverarbeitung sowie im Stofftransport. Auf der extrazellulären Seite der Zellmembran sind zahlreiche Oligosaccharidketten mit den polaren Lipidregionen und mit den nicht-membranalenen Proteinanteilen, die in den Extrazellularraum hineinragen, assoziiert.

Durch ihre Hydrophobizität ist die Zellmembran für kleine, nicht-ionisierte Moleküle wie Wasser, Harnstoff, Sauerstoff, Kohlendioxid, Glycerin und viele lipidlösliche Moleküle gut

permeabel. Hier erfolgt der Transport passiv und energieunabhängig durch Diffusion entlang des Konzentrationsgradienten. Für geladene Moleküle, vor allem für anorganische Ionen wie Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> oder Cl<sup>-</sup> sowie für Makromoleküle wie nicht lipidlösliche Kohlenhydrate und Proteine, ist sie praktisch impermeabel (Lundberg and Langel 2003). Hier erfolgt ein Stofftransport über membranständige Transportproteine und ist entweder energieunabhängig (geöffnete Kanäle) oder energie- und/ oder rezeptorabhängig. Ionen gelangen in den meisten Fällen über Kanäle oder Pumpen, größere Moleküle über Poren oder Rezeptoren in die Zelle (von Engelhardt and Breves 2000).

### **2.3.2 Eigenschaften und Synopsis bedeutender zellpermeabler Peptide**

In jüngerer Zeit wurden Proteine beschrieben, die die Eigenschaft der Zellpermeabilität aufweisen (Foerg and Merkle 2008; Laufer and Restle 2008; Stewart, Horton et al. 2008; Dietz 2010). Einige sind viralen oder eukaryotischen Ursprungs, andere wurden synthetisch generiert.

So konnten mit Hilfe zellpermeabler Peptide diverse Moleküle unterschiedlicher Größe wie z.B. Peptide (Prochiantz 1996; Hawiger 1999), Proteine (Schwarze, Ho et al. 1999) und Nukleinsäuren (Astria-Fisher, Sergueev et al. 2000; Lochmann, Jauk et al. 2004; Brandenburg, Stockl et al. 2005; Min, Kim et al. 2010) in die Zelle eingeschleust werden. Dabei scheinen Nettoladung und Hydrophobizität einen wesentlichen Einfluss auf den Translokationsmechanismus zu haben (Hallbrink, Floren et al. 2001). Anhand dieser Parameter lassen sich zellpermeable Peptide folgendermaßen klassifizieren:

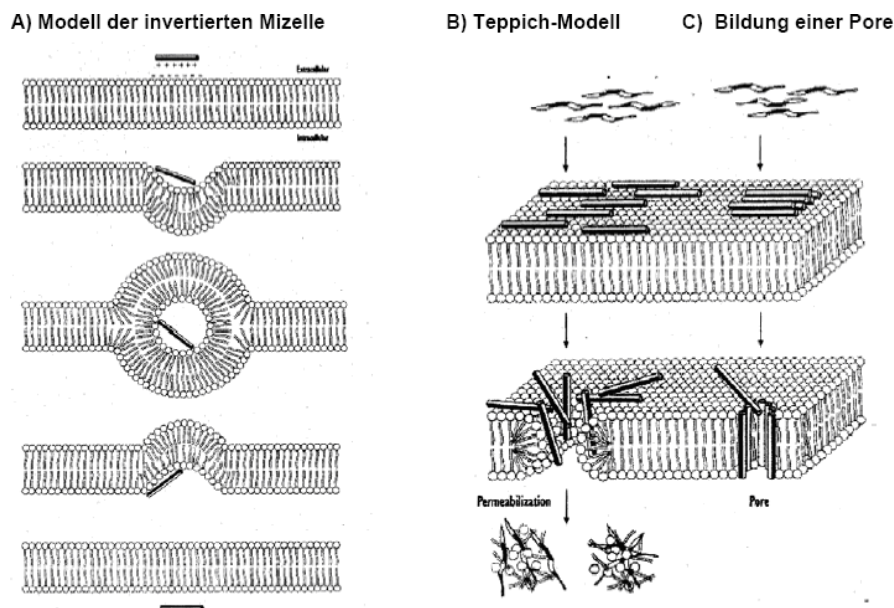
<b>Molekül</b>	<b>Ladung</b>	<b>Hydrophobizität</b>
TLM aus HBsAg	Neutral	neutral
Penetratin	Kationisch	Hydrophil
Transportan	Kationisch	Hydrophob
Kaposi-FGF	neutral	Hydrophob

**Abb. 6** Bedeutende zellpermeable Peptide und ihre Eigenschaften.

Der genaue Mechanismus der Membrantranslokation ist allerdings bis heute weitgehend unklar. Untersuchungen deuten darauf hin, dass der Transportmechanismus in einigen Fällen zell- bzw. cargospezifisch ist (Fittipaldi, Ferrari et al. 2003; Maiolo, Ferrer et al. 2005). Zwei verschiedene Wege der Translokation spielen dabei eine Rolle. Der erste Weg ist die energieabhängige Endocytose, der zweite Weg ist die energie- und rezeptorunabhängige Translokation über die Zellmembran in das cytosolische Kompartiment der Zelle, ohne

Beeinträchtigung der Membran- und Zellintegrität. (Thoren, Persson et al. 2000; Hallbrink, Floren et al. 2001; Vives 2005; Ye, Fox et al. 2010).

Endocytose wird in Phagozytose und Pinocytose unterteilt und stellt einen Einstülpungsvorgang der Zellmembran dar, an deren Ende ein Vesikel mit der aufgenommenen Substanz in das Zellinnere abgeschnürt wird (Conner and Schmid 2003). Phagozytose ist ein komplexer Prozess, um größere Partikel in die Zelle aufzunehmen, und ist spezialisierten Zellen, wie Makrophagen und neutophilen Granulocyten vorbehalten (Champion and Mitragotri 2006). Als Pinocytose bezeichnet man die Aufnahme von kleinen Flüssigkeitsmengen und der darin gelösten Stoffe in den Intrazellularraum. Pinocytose wird von allen Zelltypen durchgeführt. Was mit dem aufgenommenen gelösten Molekül im weiteren Verlauf passiert hängt dabei von seiner biochemischen Struktur und seiner Fähigkeit ab, das Vesikel verlassen zu können (Stewart, Horton et al. 2008). Für die Translokation zellpermeabler Peptide existieren verschiedene Modellvorstellungen, die im Folgenden beschrieben werden:



**Abb. 7** Verschiedene Modellvorstellungen für die Translokation zellpermeabler Peptide. **A)** Modell der invertierten Mizelle. **B)** Teppichmodell. **C)** Bildung einer Pore (modifiziert nach Ludberg et al., 2003).

In der ersten Modellvorstellung wird eine invertierte Mizelle gebildet (**Abb. 7 A**) (Derossi, Calvet et al. 1996; Derossi, Chassaing et al. 1998; Stewart, Horton et al. 2008). Hierbei lagert sich das positiv geladene, hydrophobe Peptid an die polare Oberfläche der Phospholipidmembran an. Dadurch entstehen Wechselwirkungen, die erst zur Einbuchtung und im weiteren Verlauf bei Beibehaltung der Lipiddoppelschicht zur Ausbildung einer invertierten Mizelle führen. Schließlich wird das Peptid ins Innere der Zelle entlassen.

Das Teppichmodell in **Abb. 7 B**) war das erste beschriebene Modell, das im Zusammenhang mit der Wirkungsweise antimikrobieller Peptide beschrieben wurde (Pouny, Rapaport et al. 1992; Matsuzaki 1998). Bei diesem Modell stellt man sich vor, dass sich positiv geladene Bereiche der Peptide an die negativ geladenen Phospholipidköpfe anlagern und zu einer Änderung in der Sekundärstruktur führt. Im weiteren Verlauf findet eine Interaktion der hydrophoben Bereiche der Lipiddoppelschicht mit hydrophoben Peptidbereichen statt, was zu einer Bildung undefinierter Poren und zum Durchtritt des Peptids führt.

Das dritte Prinzip stellt die Bildung einer Pore dar, welches ebenfalls für antimikrobielle Peptide beschrieben wurde (**Abb. 7 C**) (Gazit, Lee et al. 1994). Dabei nimmt man an, dass sich hydrophile und hydrophobe Aminosäuren auf jeweils einer Seite des amphipathischen, alpha-helikalen Peptids entlang der Längsachse ausrichten. Die Porenbildung resultiert aus der Membraneinlagerung und Oligomerisierung der Peptide. Die hydrophoben Peptidanteile interagieren mit den hydrophoben Anteilen der Phospholipide und die hydrophilen Anteile kleiden die Poren von innen aus.

Im Folgenden werden einige bedeutende Beispiele für zellpermeable Peptide vorgestellt:

### 2.3.2.1 Antennapedia-Homöodomäne

Eine Homöobox ist eine charakteristische Sequenz homöotischer Gene, die für die Homöodomäne kodiert. Als homöotische Gene bezeichnet man Gene, die für die Identität von Segmenten zuständig sind, wobei Mutationen innerhalb der Homöobox zur teilweisen oder vollständigen Umbildung von Körperteilen führen können. Erstmals wurden die Homöobox-Proteine bei *Drosophila melanogaster* beschrieben. Innerhalb dieser Domäne wurde eine 16 Aminosäuren umfassende  $\alpha$ -helikale und amphipathische Struktur identifiziert, die Zellpermeabilität vermittelt (pAntp 43-58) (Derossi, Joliot et al. 1994). Durch Inversion der Primärstruktur von pAntp und Verwendung von D-Aminosäuren konnten vom pAntp abgeleitete Peptide hergestellt werden, die die Eigenschaft der Membranpermeabilität behielten. Zudem zeigte sich durch die Inversion sowie durch den Aufbau aus D-Aminosäuren eine erhöhte Resistenz gegen einen intrazellulären proteolytischen Abbau (Derossi, Chassaing et al. 1998). Auf der Basis des Antennapedia-abgeleiteten Peptids wurden Arbeiten durchgeführt, um zellpermeable SIINFEKL-Modellpeptide in Zellen einzubringen mit dem Ziel, durch cytosolische proteasomale Prozessierung eine MHC-I-Beladung zu erlangen (Pietersz, Li et al. 2001; Brooks, Pouniotis et al. 2010).

### 2.3.2.2 HIV-Tat-Protein

Das HIV-Tat-Protein ist ein 86 Aminosäuren großes Protein des humanen Immundefizienz-Virus, das bei der Transkriptionsaktivierung beteiligt ist. Es konnte gezeigt werden, dass exogenes Tat-Protein die Zellmembran überwinden kann und in den Zellkern gelangt, um dort die virale Replikation zu aktivieren. Dabei konnte eine 12 Aminosäuren umfassende

Region (AS 48-60) des Tat-Proteins der Translokationsfähigkeit zugeordnet werden, die aus einer basischen Region und einer Kernlokalisationssequenz (AS 48-52, GRKKR) besteht. Tat-Fusionsproteine werden erfolgreich für Peptide, Proteine und Nukleinsäuren (Schwarze and Dowdy 2000; Becker-Hapak, McAllister et al. 2001; Arthanari, Pluen et al. 2010; Essafi, Baudot et al. 2010; Said Hassane, Saleh et al. 2010) in Zellen eingesetzt. Zudem konnte durch die Generierung rekombinanter Fusionsproteine mit dem HIV-Tat-Protein ein Überwinden der Blut-Hirn-Schranke nach systemischer Applikation erreicht werden (Schwarze, Ho et al. 1999). Durch die Fusion des Tat-Proteins mit einem spezifischen Antigen konnte eine MHC-Komplex I-Beladung und eine Stimulation der CD8+-Antwort erreicht werden (Chen, Diassiti et al. 2006; Tinega, Pelle et al. 2009). Neuere Arbeiten deuten darauf hin, dass die Aufnahme des Tat-Proteins in die Zelle nicht durch Translokation über die Membran, sondern durch endocytotische Prozesse erfolgt (Richard, Melikov et al. 2005).

### 2.3.2.3 Kaposi-Fibroblasten-Wachstumsfaktor

Innerhalb der Signalsequenz des Kaposi-Fibroblasten-Wachstumsfaktors (K-FGF oder FGF-4) befindet sich eine Zellpermeabilität vermittelnde Sequenz, die als h-Region bezeichnet wird (Rojas, Yao et al. 1996). Es handelt sich dabei um eine neutral geladene, stark hydrophobe Region. Unter physiologischen Bedingungen wird durch die h-Region die Sekretion von Proteinen bewirkt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass nach externer Zugabe auch eine Translokation von außen nach innen möglich ist (Rojas, Donahue et al. 1998).

### 2.3.2.4 Transportan

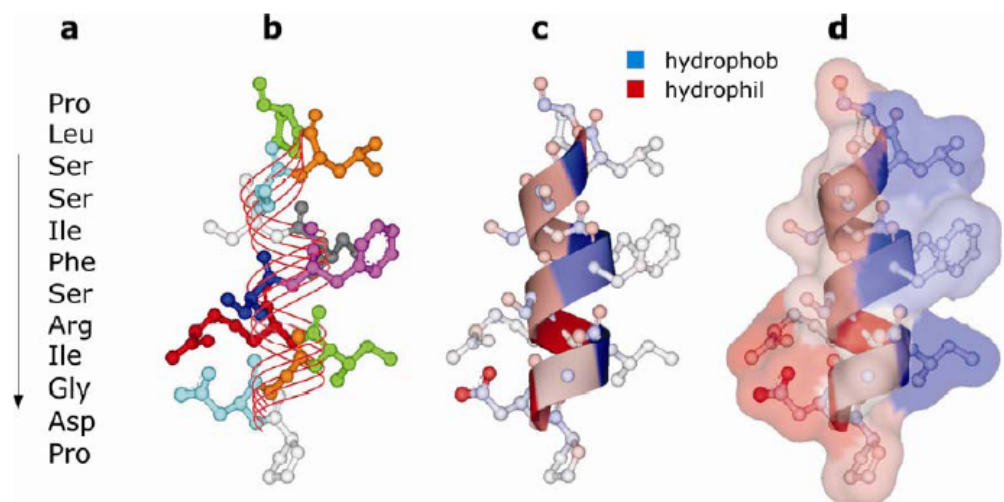
Transportan ist ein aus 27 Aminosäuren bestehendes Fusionspeptid, das N-terminal aus einem 12 Aminosäuren langen Anteil des Neuropeptids Galanin und C-terminal aus dem Polypeptid Mastoparan besteht. Verknüpft sind beide Bestandteile über die Aminosäure Lysin (Pooga, Hallbrink et al. 1998).

### 2.3.2.5 VP22

VP22 ist ein 38 kDa großes Protein aus dem Tegument des Herpes Simplex Virus (HSV) Typ-1, welches am Replikationszyklus von HSV beteiligt zu sein scheint und eine Zellpermeabilität vermittelnde Sequenz besitzt, die bisher noch nicht identifiziert werden konnte. Vor allem Versuche mit einem GFP-VP22-Fusionsprotein zeigen die Eignung von VP22 als Zellpermeabilität vermittelndes Fusionsprotein für Makromoleküle (Elliott and O'Hare 1999).

### 2.3.3 Das Translokationsmotiv (TLM)

In der PreS2-Domäne des Hepatitis B-Virus wurde ein Zellpermeabilität vermittelndes Motiv identifiziert. Dabei ist die Zellpermeabilität nicht zellspezifisch und energieunabhängig. Analysen haben ergeben, dass die Zellpermeabilität auf eine amphipathische alpha-Helix zwischen den Aminosäuren 41 und 52 (PLSSIFSRIGDP) der PreS2-Domäne zurückzuführen ist, die als Translokationsmotiv (TLM) bezeichnet wurde (**Abb. 8**). Diese amphipathische alpha-Helix ist innerhalb der Hepatitis B-Virus-Geno- und Subtypen hoch konserviert und konnte auch bei anderen Vertretern der Hepadnaviren nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sie eine Rolle bei der Oligomerisierung der PreS2-Domäne spielt. Der Austausch von L42, I45 und F46 gegen drei Serinreste (PSSSSSRIGDP, PreS2-3S-Mutante) bewirkt die Umlagerung in eine beta-Faltblatt-Struktur, vermindert die Oligomerisationstendenz von PreS2 und hat den Verlust der Zellpermeabilität zur Folge. (Oess and Hildt 2000).



**Abb. 8 Struktur und Eigenschaften des TLM-Peptids.**

In (a) sind die 12 AS dargestellt, aus denen das TLM-Peptid besteht. (b) zeigt die  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur. Die verschiedenen AS sind unterschiedlich gefärbt. (c) gibt die Ladungen wieder, wobei die blauen Kugeln negativ geladene Atome sind, die roten positive und die weißen solche mit neutraler Ladung. Die sich daraus ergebenden hydrophoben Regionen sind blau, die hydrophilen Bereiche rot markiert (d) (modifiziert nach Brandenburg et al., 2005).

Der Mechanismus der Translokation des PreS2-TLM ist bis heute noch weitgehend unklar. Das TLM-Peptid scheint im Lebenszyklus des HBV eine entscheidende Rolle zu spielen. Nach der rezeptorvermittelten Endocytose des Virus kommt es zu einer proteolytischen Spaltung der Oberflächenproteine und zu einer Freilegung des PreS2-TLM an die Virusoberfläche. In deren Folge ist das Virus in der Lage, in einem energieunabhängigen Prozess aus dem endosomalen Kompartiment in das Cytoplasma zu entweichen (Stoeckl, Funk et al. 2006).

Neuere Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, dass eine Infektion mit HBV auch ohne das PreS2-TLM möglich ist (Lepere, Regeard et al. 2007).

Das PreS2-TLM ist aufgrund seiner geringen Größe von nur 12 Aminosäuren, seiner großen Translokationseffizienz und seiner geringen Immunität ein geeignetes Werkzeug für den Transfer von Molekülen in Zellen, ohne die Zellintegrität zu zerstören. Dies ermöglicht die sehr effiziente Modulation bzw. Charakterisierung intrazellulärer Signalwege. So konnten z.B. für eine zellpermeable Variante des HBx-Proteins (TLM-HBx) onkogene Eigenschaften nachgewiesen werden (Hafner, Brandenburg et al. 2003). Auch waren Versuche, eine zellpermeable Cytokindeaminase zur Therapie von Tumorzellen zu entwickeln, *in vitro* erfolgreich (Hillemann, Brandenburg et al. 2005). Durch die gentechnische Generierung von HBV core-Partikeln, die an zwei invers-revers, mit einem drei Aminosäuren umfassenden *Linker* (SGS), verbundenen TLM-Peptiden gekoppelt wurden, konnte DNA in einem energieunabhängigen Prozess in Zellen transferiert und zur Expression gebracht werden. Somit konnte gezeigt werden, dass die Herstellung von zellpermeablen VLPs auf der Basis des HBV-Kapsids möglich ist (Brandenburg, Stockl et al. 2005). Des Weiteren wurden auf der Basis des TLM-Peptids zellpermeable TLM-Ovalbumin Fusionsproteine rekombinant hergestellt. Die Aufnahme dieser Proteine in Zellen, ihre cytosolische Prozessierung, die nachfolgende Beladung von MHC-Klasse I Molekülen mit den im Zuge der Prozessierung generierten SIINFEKL-Peptiden und die effiziente Induktion einer T-Zellantwort konnte *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden (Bleifuss, Kammertoens et al. 2006).

Zur Entwicklung neuartiger Gentherapie-Strategien zur Behandlung HIV-infizierter Patienten wurde die Tre-Rekombinase generiert. Die Tre-Rekombinase erkennt den Long Terminal Repeats (LTR) des HI-Virus und ist anschließend in der Lage, die provirale HIV-DNA aus der DNA humaner Zellen auszuschneiden. Prokaryotisch hergestellte Tre-Rekombinase konnte, gekoppelt an das HIV-Tat-Protein bzw. an das Translokationsmotiv TLM, durch Translokation in menschliche Zellen eingebracht werden. Das an TLM gekoppelte Enzym war dabei in der Lage die gesamte virale Pro-DNA aus infizierten Zellen zu entfernen (Mariyanna, Priyadarshini et al. 2012).

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Virus-DNA

##### 3.1.1.1 Hepatitis C-Virus

JFH1 Hepatitis C-Virus, Genotyp 2a (Vektor pJFH1-wt); isoliert von einem Patienten mit einer fulminanten Hepatitis (Wakita, Pietschmann et al. 2005)

##### 3.1.1.2 Baculovirus

BaculoGold, linearisierte Baculovirus DNA (BD Biosciences, USA)

#### 3.1.2 Zelllinien und Bakterienstämme

##### 3.1.2.1 Eukaryotische Zellen

###### Huh7.5 Zellen:

Humane Hepatom-Zelllinie (Blight, McKeating et al. 2002), abgeleitet von der Huh7-Zelllinie (Nakabayashi, Taketa et al. 1982)

###### HepAD38 Zellen:

Stabil HBV-transfizierte humane Hepatoblastom-Zelllinie (Ladner, Otto et al. 1997), abgeleitet von der HepG2-Zelllinie (Aden, Fogel et al. 1979)

###### Sf9 Zellen:

Insekten-Zelllinie aus Ovar-Zellen von *Spodoptera frugiperda* (Vaughn, Goodwin et al. 1977)

##### 3.1.2.2 Prokaryotische Zellen

###### *E. coli* K12 DH5 $\alpha$

Gibco, USA

Genotyp: F- $\phi$ 80/acZ $\Delta$ M15  $\Delta$ fu169 recA1 end A1 hsdR17 phoA supE44 thi-1 gyrA96 re/A1  $\lambda$ -

###### *E. coli* BL21 (DE)

Gibco, USA

Genotyp: F-ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-)  $\lambda$ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])

###### *E. coli* Rosetta (DE3)

Merck, UK

F-ompT hsdSB(RB- mB-) gal dcm  $\lambda$ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])

pLysSRARE (Cam<sup>R</sup>)



### 3.1.3 Mäuse

Als Mäuse wurden Inzucht FVB/N-Mäuse (FVB/N CrIBR) verwendet (Charles River Laboratories International, USA).

### 3.1.4 Plasmide

#### Kommerziell erhältliche Plasmide:

pBacPAK9	Clontech, USA
pet24d(+)	Novagen, Darmstadt
pVL1392-XyIE Baculovirus Kontroll-Vektor	BD Biosciences, USA

#### Andere Plasmide:

TA 2xTLM,Strep-Tag,leader,HBV core 1-78 K4	K. Himmelsbach
pBacPAK9,HBV core 79-184,6xHIS	K. Himmelsbach
pBacPAK9-Strep-Tag,leader,HBV core 1-184,6xHIS K1	K. Himmelsbach
pet24d(+)-2xTLM,Strep-Tag,leader,HBV core1-151,6xHIS	K. Himmelsbach
pBacPAK9,HBV core 1-78,E2_1,79-184,6xHIS	K. Himmelsbach
pBacPAK9,HBV core 1-78,E2_3,79-184,6xHIS	K. Himmelsbach

#### Generierte Plasmide:

pBacPAK9-2xTLM,Strep-Tag,leader,HBV core 1-184,6xHIS
pBacPAK9-2xTLM,Strep-Tag,leader,HBV core 1-78,E2_1,79-184,6xHIS
pBacPAK9-2xTLM,Strep-Tag,leader,HBV core 1-78,E2_3,79-184,6xHIS
pBacPAK9-2xTLM,Strep-Tag,leader,HBV core 1-78,E2a,79-184,6xHIS
pBacPAK9-Strep-Tag,leader,HBV core 1-78,E2a,79-184,6xHIS
pet24d(+)-2xTLM,Strep-Tag,leader,HBV core1-78,E2a,79-151,6xHIS

### 3.1.5 Oligonukleotide

Die Schnittstellen für die entsprechenden Restriktionsenzyme sind unterstrichen.

#### Klonierungs-Primer:

#188	HBV_core78_EcoRI_rev	5'-gcg <u>aat tca</u> tct tcc aaa tta cca ccc-3'
#191	HBV_core184_NotI_rev	5'-aag <u>cgq ccg cct</u> aac att gag att ccc gag-3'
#192	HBV_core184_His_NotI_rev	5'-aag <u>cgq ccg cct</u> agt ggt ggt ggt ggt gac att gag att ccc gag-3'
#235	E2_282_EcoRI_fwd	5'-cgq <u>aat tcg</u> cgq gcc cca cca ccg ttg-3'
#236	E2_661_EcoRI_rev	5'-cgq <u>aat tcc</u> ctg tcc tcc aag tcg cag-3'
#237	E2_370_EcoRI_fwd	5'-cgq <u>aat tca</u> agg tca ttg tca tcc ttc tgc-3'

#239	E2_412_EcoRI_fwd	5'-cgg <u>aat tcc</u> agc tca tta aca cca acg g-3'
#240	E2_560_EcoRI_rev	5'-cgg <u>aat tca</u> gtg gag ttc atc cac gtg-3'
#285	BAC1_fwd	5'-aac cat ctc gca cct ccc tc-3'
#286	BAC_rev	5'-acg cac aga atc tag cgc tt-3'
#288	E2a_EcoRI_Fwd	5'-gcg <u>aat tcc</u> gca cca cca ccg ttg ga-3'
#289	E2a_EcoRI_rev	5'-gcg <u>aat tcc</u> ggc ctc ata tcc tct gg-3'

**Sequenzier-Primer:**

#114	T7_promoter_seq	5'-taa tac gac tca cta tag gg-3'
#190	HBV_core151_NotI_rev	5'-aag <u>cgq ccg ctc</u> atc gtc taa caa cag tag tct cc -3'
#243	HBVcore_control_Strep_no2xTLM	5'-cgg gat cca tgt gga gcc acc cgc agt tc-3'
#285	BAC1_fwd	5'-aac cat ctc gca aat aaa ta-3'
#286	BAC_rev	5'-acg cac aga atc tag cgc tt-3'

**3.1.6 Enzyme zum Klonieren**

Antarctic phosphatase	NEB, Frankfurt am Main
BamHI	Fermentas, St. Leon-Rot
EcoRI	NEB, Frankfurt am Main
NcoI	Fermentas, St. Leon-Rot
Pfu DNA-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
Taq DNA-Polymerase	Genaxxon, St. Leon-Rot
T4 DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot

**3.1.7 Antikörper**

Antikörper	Species	Klonalität	Verdünnung (WB/ IF)	Hersteller/ Quelle
Anti-HBcAg	Kaninchen	polyklonal	WB 1:1000	Pierce, USA
Serum Anti- 2xTLM, HBV core	Kaninchen	polyklonal	WB 1:400	Brandenburg, Stockl et al. 2005
Anti-HBcAg (MAB 3120)	Maus	monoklonal	IF 1:100	Institute of Immunology, Japan
Anti-Kaninchen- IgG, HRP- gekoppelt	Esel	polyklonal	1:2000	GE Healthcare, Freiburg

Anti-Maus-IgG, Cy3-gekoppelt	Esel	Polyklonal	1:400	Jackson ImmunoResearch Europe, Suffolk, UK
---------------------------------	------	------------	-------	---

### **3.1.8 DNA- und Proteinmarker**

GeneRuler 1 kb-DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler 100 bp-DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
PageRuler plus Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot

### **3.1.9 Inhibitoren**

#### **Protease-Inhibitoren:**

PMSF	Sigma, Seelze
Leupeptin	Sigma, Seelze
Aprotinin	Sigma, Seelze
Pepstatin	Sigma, Seelze

#### **RNase-Inhibitoren:**

RNaseOUT	Invitrogen, Karlsruhe
----------	-----------------------

### **3.1.10 Komponenten für die Zellkultur**

TC-100 Insect Medium	Genaxxon, Ulm
Fötale Käberserum (FKS)	PAA, Österreich
Penicillin / Streptomycin	PAA, Österreich
Gentamycin	Roth, Karlsruhe
PBS	PAA, Österreich
DMEM (Dulbecco`s modified eagle Medium) High Glucose	PAA, Österreich
L-Glutamin	PAA, Österreich
Insulin	Sigma, Sleeze
Hydrocortison	Sigma, Sleeze
Trypsin/ EDTA	PAA, Österreich

### **3.1.11 Komponenten für die Bakterienkultur**

Ampicilin	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Sigma, Seelze
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe

### **3.1.12 Kitsysteme**

QIAGEN Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAGEN Plasmid Mini Kit	QIAGEN, Hilden
DNeasy Blood & Tissue Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
peqGOLD Gel Extracoin Kit	Peqlab, Erlangen
pegGOLD Pure Cycle Kit	Peqlab, Erlangen

### **3.1.13 Chemiekalien**

Aceton	Sigma, Seelze
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Aldolase	GE Healthcare, Freiburg
Agarose	Genaaxon, Biberach
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Seelze
Bromphenolblau	Sigma, Seelze
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma, Seelze
BSA (Bovines Serum Albumin) Fraktion V	PAA, Österreich
Chloroform	Merck, Darmstadt
Chloroform/Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma, Seelze
Desochocholol	Sigma, Seelze
Dextranblau	GE Healthcare, Freiburg
Dithiothreitol (DDT)	Sigma, Seelze
EDTA (Ethyldiaminotetraessigsäure)	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Seelze
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Glutaraldehyd	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Sigma, Seelze
Hydroxyphenylazobenzoessäure (HABA)	Merck, Darmstadt
Immobilon Western AP Substrate	Millipore, Billerica, USA
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Fermentas, St. Leon-Rot
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Fluka, Deisenhofen
Mercaptoethanol	Sigma, Seelze

Methanol	Roth, Karlsruhe
MgCl <sub>2</sub> (Magnesiumchlorid)	Fermentas, St. Leon-Rot
MgSO <sub>4</sub> (Magnesiumsulfat)	Fermentas, St. Leon-Rot
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Sigma, Seelze
Natriumthiosulfat	Roth, Karlsruhe
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (24:24:1)	Roth, Karlsruhe
Polyethylenimine (PEI)	Sigma, Seelze
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Fluka, Deisenhofen
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe
Sucrose	Roth, Karlsruhe
SuperSignal West Pico Chemiluminescence Substrat	Thermo, Bonn
TEMED (N,N,N,N-tetramethylaminomethan)	Sigma, Seelze
Tris	Sigma, Seelze
Triton-X 100	Fluka, Deisenhofen
Tween20 (Polyoxyethylensorbitolmonolaurat)	Sigma, Seelze

### **3.1.14 Verbrauchsmaterial**

12-/ 24-Well-Platten	Greiner, Frickenhausen
200 Mikroliter PCR-Reaktionsgefäße	Sarsted, Nümbrecht
Amicon Ultra-15, PLTK Ultracel-PL Membrane, 30 kDa	Millipore, USA
Deckgläschen	Roth, Karlsruhe
Dialyseschlauch Spectrapor (MWCO 10000, MWCO 30000)	Spectrum Lab, USA
Eppendorfreaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Greiner, Frickenhausen
Filterpipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner, Frickenhausen
Filterpipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Hybond-P, PVDF-Membranen	Millipore, USA
Objekträger	Thermo Frost, UK
Plastikküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (10 ml, 15 ml, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Sterilfilter Rotilabo 0,22 Mikrometer	Roth, Karlsruhe
Sterilfilter Rotilabo 0,45 Mikrometer	Roth, Karlsruhe
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckmann, USA
Whatman-Papier	Whatman, UK

Zellkulturflaschen

Greiner, Frickenhausen

Zellschaber

Greiner, Frickenhausen

### **3.1.15 Geräte**

#### **Elektrophorese- und Blotsysteme:**

Horizontales Gelelektrophoresesystem

BioRad, München

Vertikales Gelelektrophoresesystem

GE Healthcare, Freiburg

Semi-dry-Blotkammer

GE Healthcare, Freiburg

#### **Chromatografiegeräte und –säulen:**

ÄKTA Purifier

Amersham, Freiburg

Gelfiltrationssäule (superose 6)

Amersham, Freiburg

Affinitätschromatographiesäule Nickel NTA

Quiagen, Hilden

Ionenaustascher MonoS

Amersham, Freiburg

Strep-Tag Affinitätschromatographiesäule

IBA, Göttingen

StrepTactin Sepharose

IBA, Göttingen

#### **Mikroskope:**

Leica, Leitz DM RBE

Leica, Wetzlar

Konfokale Laser Mikroskope LSM 510

Zeiss, Jena

#### **Zentrifugen:**

Zentrifuge 5 804 R

Eppendorf, Hamburg

Fresco 21

Heraeus, Osterode

Multifuge 4KR

Heraeus, Osterode

Mikrozentrifuge

Roth, Karlsruhe

Optima TLX

Beckman-Coulter, USA

#### **Photometer:**

Ultrospec 3000

GE Healthcare, Freiburg

BioPhotometer

Eppendorf, Hamburg

#### **Brutschränke:**

Zell Inkubator

Heraeus, Osterode

Bacteria Inkubator Typ B6760

Heraeus, Osterode

Infors MT Multitron

Heraeus, Osterode

**Sonstige Geräte:**

Abzug	Köttermann, Uetze
Architect i1000SR	Abbott Laboratories, USA
Heizblock HeizThermoMixer MHR 13	Ditabis, Pforzheim
Magnetrührer	Techmatic, USA
Neubauer Zählkammer	Roth, Karlsruhe
pH-Meter Symphony	VWR, Frankreich
PCR Thermocycler	PerkinElmer, USA
Pipettierhilfe Pipetboy	VWR, Frankreich
Pipetten (2,5 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Rollermixer SRT 9	Lennox, Irland
Schüttler	Heidolpg, Schwabach
Sonifikator	Sartorius, Göttingen
Sterilbank	Heraeus, Osterode
Stromaggregat	Amersham, USA
Thermoheizblock QBD1	Grant, UK
Vakuumsauger Vacuum Hand Control	Gilson, USA
Vortexer Lab dancer	VWR, Frankreich
Waage Adventura Pro	Ohaus, Schweiz
Wasserbad TW12	Julabo, Seelbach

**3.1.16 Bilderstellung**

Agarose Gel Dokumentation	Intas, Göttingen
Hyperfilm ECL-Chemiluminescence	GE Healthcare, Freiburg
Hypercassette	GE Healthcare, Freiburg
AGFA CP-1000 Filmentwicklungsgerät	AGFA, Köln

**3.1.17 Software**

Vektor NTI	Invitrogen, Karlsruhe
Image J	NIH, USA
LSM Image Browser	Zeiss, Jena

**3.1.18 Puffer und Lösungen**

Alle selbst hergestellten Puffer wurden mit doppelt deionisiertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) aus einem Milli-Q-System (Millipore, USA) hergestellt.

**Antibiotika-Stammlösungen:**

Kanamycin (1000 X):	1,25 g Kanamycinsulfat ad 50 ml H <sub>2</sub> O sterilfiltrieren, Lagerung bei -20 °C
Ampicillin (1000 X):	5 g Ampicillin ad 100 ml H <sub>2</sub> O sterilfiltrieren, Lagerung bei -20 °C
Chloramphenico (1000 X):	2,5 g Chloramphenicol ad 100 ml Ethanol

**Puffer für Agarosegele:**

TAE-Puffer (50x):	2 M Tris 1 M Essigsäure 0,05 M EDTA
Ladepuffer (6 X) für Agarosegele:	250 mg Bromphenolblau 30 ml Glycerol ad 100 ml TAE-Puffer

**Dialysepuffer:**

Puffer W denaturierend:	100 mM Tris pH8 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 M Urea
Puffer W :	100 mM Tris pH8 150 mM NaCl 1 mM EDTA
Tris/ Sucrose-Puffer:	20 mMol Tris pH 7,4 10 % Sucrose

**Lösungen für Plasmid-DNA Miniprep:**

Lösung 1:	20 mM Glucose 25 mM Tris-Cl pH 8,0 10 mM EDTA pH 8 pH8
Lösung 2:	0,2 N NaOH 1 % SDS



Lösung 3: 3 M Kaliumacetatlösung  
11,5 % Essigsäure

**Puffer für SDS-PAGE:**

SDS-Ladepuffer (4x): 125 mM Tris-HCl pH 6,8  
4 % SDS (w/v)  
10 % Glycerol (v/v)  
10 % Mercaptoethanol (v/v)  
0,02 % Bromphenolblau

SDS-Laufpuffer (10x): 0.25 M Tris  
2 M Glycin  
1 % SDS (w/v)  
pH 8,3

Sammelgelpuffer (4x)  
für Polyacrylamidgele:

0,5 M Tris  
0,4 % SDS (w/v)  
pH 6,7

Trenngelpuffer (4x)  
für Polyacrylamidgele:

1,5 M  
0,4 % SDS (w/v)  
pH 8,8

**Lösungen für Silberfärbung (für je 100 ml):**

Fixierer: 25 % Ethanol  
10 % Essigsäure

Conditioner: 20 % Natriumacetat 2M pH 6  
30 % Etanol  
100 mg Ma-thiosulfat \*5H<sub>2</sub>O  
2 % Glutaraldehyd

Silbernitrat-Lösung: 0,1 % Silbernitrat  
25 µl Formaldehyd 37 %

Entwickler: 2,5 % Natriumcarbonat  
80 µl Formaldehyde 37 %

**Puffer für Strep-Tag Reinigung:**

Puffer W:	100 mM Tris pH8
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA
Puffer E:	100 mM Tris pH 8
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA
	50 mM Desthiobiotin
Puffer R:	100 mM Tris pH8
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA
	1 mM HABA

**Puffer für Westernblotanalyse:**

Anodenpuffer I:	300 mM Tris
	20 % Ethanol (v/v)
Anodenpuffer II:	25 mM Tris
	20 % Ethanol (v/v)
Kathodenpuffer:	20 % Ethanol (v/v)
	40 mM 6-Aminohexansäure

**Weitere Puffer und Lösungen:**

TBST (10x):	250 mM Tris
	150 mM Natriumchlorid
	2 mM KCl
	2 % Tween
	pH 7.8
TBS (1x):	25 mM Tris
	150 mM NaCl
	2 mM KCl
	pH 7,8
PBST (10x):	14,4 g Di-Natriumhydrogencarbonat
	2,4 g Kaliumhydrogenphosphat
	80 g Natriumchlorid
	2 g Kaliumchlorid
	2 % Tween

	ad 1000 ml
	pH 7,4
PBS (10x):	14,4 g Di-Natriumhydrogencarbonat
	2,4 g Kaliumhydrogenphosphat
	80 g Natriumchlorid
	2 g Kaliumchlorid
	ad 1000 ml
	pH 7,4
Mowiol:	100 mM Tris-Hcl pH 8,5
	25 % Glycerol (w/v)
	10 % Mowiol (w/v)
	2,5 % DABCO
LB-Medium:	1 % Trypton (w/v)
	0,5 % Hefeextrakt (w/v)
	1 % Natriumchlorid (w/v)
	pH 7
TFB1-Puffer:	100 mM Rubidiumchlorid
	50 mM Manganchlorid
	30 mM Kaliumacetat
	10 mM Calciumchlorid
	15 % Glycerol (w/v)
	pH 5,8
TFB2-Puffer:	75 mM Calciumchlorid
	10 mM Rubidiumchlorid
	10 mM MOPS
	15 % Glycerol (w/v)
	pH 5,8
Gua-Puffer:	6 M Guainidin
	10 mM Tris
	100 mM Natriumphosphat
	pH 8

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Molekularbiologie

#### 3.2.1.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Bakterien

1 l LB-Medium wurde mit 10 ml *E. coli*-Übernachtskultur angeimpft und anschließend bei 37 °C und 125 rpm bis zu einer Dichte von OD 600 = 0,5 im Schüttelinkubator inkubiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurde 10 min bei 4 °C und 4000 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 200 ml TFB1-Puffer resuspendiert. Nach einer erneuten Inkubation für 15 Minuten auf Eis wurde erneut abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 20 ml TFB2-Puffer resuspendiert. Nun wurde die Suspension nach weiterer 15-minütiger Inkubation auf Eis zu je 100 µl aliquotiert und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Bakterien wurden bei -80 °C gelagert.

#### 3.2.1.2 Transformation kompetenter Bakterien

##### **DH5α und BL21:**

100 µl kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Dann wurde die eisgekühlte DNA-Lösung hinzugegeben (10-100 ng Plasmid oder gesamter Ligationsansatz) und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte für 90 Sekunden ein Hitzeschock bei 42 °C. Nach erneuter 5-minütiger Inkubation auf Eis wurden 500 µl LB-Medium hinzugefügt und 90 Minuten bei 37 °C und 500 rpm inkubiert.

##### **Rosetta:**

20 µl kompetenter Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Dann erfolgte die Zugabe der eisgekühlten Plasmid-DNA (1-10 ng) und eine anschließende 5-minütige Inkubation auf Eis. Im Anschluss erfolgte ein Hitzeschock für exakt 30 Sekunden bei 42 °C und danach wieder eine Inkubation auf Eis für 2 Minuten, bevor 500 µl LB-Medium hinzugefügt und 60 Minuten bei 37 °C und 250 rpm inkubiert wurde.

Anschließend wurden die Bakterien jeweils auf einer LB-Agar-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### 3.2.1.3 Plasmid-DNA-Isolierung

Für die Gewinnung geringer Mengen Plasmid-DNA wurden 2-4 ml Bakteriensuspension aus einer Übernachtskultur entnommen und die Plasmid-DNA mit Hilfe des QIAGEN Plasmid Mini Kits (QIAGEN, Hilden) isoliert. Größere Mengen Plasmid-DNA wurden mit dem QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN, Hilden) aus 200 bis 400 ml Bakteriensuspension gewonnen. Die Extraktion wurde jeweils gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

Neben den oben aufgeführten Plasmid-kits wurde auch folgendes Protokoll zur Plasmid-DNA-Isolierung durchgeführt (modifiziert nach Sambrook et al., 3rd edition, 1.32): 1,5 ml Bakteriensuspension aus einer Übernachtskultur wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C für 1 min bei 12.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl eiskalter Lösung 1 (+ 1 µl RNase) resuspendiert. Danach wurden 200 µl der Lösung 2 hinzugefügt und fünfmal invertiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 150 µl eiskalter Lösung 3 und ein mehrfaches Invertieren, bevor 3-5 min auf Eis inkubiert wurde. Nun wurde 5 min bei 4 °C und 12.000 g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zugabe von gleichem Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (24:24:1) wurde gemischt, für 2 min bei 4 °C und 12.000 g zentrifugiert und anschließend die obere, wässrige Phase in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Dann wurden 2 Volumenteile 100 %iges Ethanol zugegeben, gemischt und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 15-minütigem Zentrifugieren bei 12.000 g und 4 °C wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 200 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und für 5 min bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet, bevor es in 30 µl dd H<sub>2</sub>O aufgenommen wurde.

### 3.2.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in wässriger Lösung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Hierbei entspricht eine Extinktion von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA bzw. 35 µg/ml ssDNA. Um die Reinheit einer DNA-Lösung zu prüfen, wurde zusätzlich die Extinktionen bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Das Verhältnis OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> sollte zwischen 1,8 und 2 liegen. Geringere Werte deuten auf eine Verunreinigung mit Proteinen oder Phenol hin.

### 3.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Agarose (Genaxxon, Biberach) wurde in der gewünschten Konzentration (0,5-2 %) in 1x TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst und anschließend, nach dem Abkühlen, mit Ethidiumbromid (50 ng/ml) versetzt, bevor es in eine mit einem Ladekamm präparierte horizontale Gelkammer gegossen wurde. Nach der Polymerisation des Gels wurde 1x TAE-Laufpuffer hinzugefügt und die mit 6x Ladepuffer versetzten DNA-Proben wurden in die Taschen geladen. Eine Auftrennung erfolgte bei 80-100 Volt. Die DNA-Banden wurden mit Hilfe von UV-Licht sichtbar gemacht und mit Intas Agarose-Gel-Dokumentation dokumentiert.

### 3.2.1.6 Restriktionsverdau

Doppelsträngige DNA wurde mit Hilfe prokaryotischer Restriktionsenzyme entsprechend den Herstellerangaben sequenzspezifisch geschnitten. Restriktionsenzyme wurden zu

qualitativen Analysen und für das Klonieren eingesetzt. Die Analyse bzw. Separation der DNA-Fragmente erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

### 3.2.1.7 Präparative DNA-Fragmentisolierung

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel, wurde unter UV-Licht die gewünschte Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des peqGOLD Gel Extraction Kit (PeqLab, Erlangen) gemäß den Herstellerangaben extrahiert und schließlich mit 30 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert.

### 3.2.1.8 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Vor einer Ligation wurden mit Hilfe der Antarctic phosphatase die 5'-terminalen Phosphatgruppen der geschnittenen Vektor-DNA entfernt, um eine Religation zu verhindern. Dazu wurden je 8 µl Vektor mit 1 µl Antarctic phosphatase und 1 µl Antarctic phosphatase-Puffer für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch eine 5-minütige Inkubation bei 67 °C inaktiviert.

### 3.2.1.9 Ligation von DNA

Die T4-Ligase katalysiert in einer ATP-abhängigen Reaktion die kovalente Bindung der 5'-Phosphatgruppe mit der einer 3'-Hydroxylgruppe. Dabei erfolgte die Reaktion in einem Gesamtvolumen von 10 µl und einem 3 bis 7-fachen Überschuss an Insert-DNA. Nach einer 3-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 2 h.

### 3.2.1.10 DNA-Reinigung

Die Reinigung von DNA nach PCR-, Restriktions- und Dephosphorylierungsreaktionen erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit gemäß den Herstellerangaben. Die Elution der DNA erfolgte mit 30 µl ddH<sub>2</sub>O.

### 3.2.1.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine molekularbiologische Methode, bei der ein spezifischer DNA-Abschnitt zwischen zwei bekannten DNA-Abschnitten durch einen von der DNA-Polymerase katalysierten Prozess selektiv amplifiziert wird.

Ein PCR-Ansatz wurde folgendermaßen gewählt:

10-200 ng	DNA-Template
0,4 µmol	dNTPs
2,5 µmol	Vorwärts-Oligonukleotide
2,5 µmol	Rückwärts-Oligonukleotide

2,5 µl Puffer 10x  
 1 U Polymerase  
 ad 25 (Taq) bzw. 50 (Pfu) µl H<sub>2</sub>O

Die PCR ist ein zyklischer Prozess, der in einem Thermocycler durchgeführt wurde und folgende Bedingungen aufzeigte:

Initiale Denaturierung	5 min 96 °C	} 24-30 Zyklen
Denaturierung	30 sec 95 °C	
Annealing	30 sec T <sub>m</sub>	
Elongation	X min 72 °C	
Finale Elongation	5 min 72 °C	
Standby	∞ 4 °C	

Während der Denaturierungsphase wurde die doppelsträngige DNA auf 96 °C erhitzt, damit die DNA-Stränge voneinander getrennt werden. Dabei wurde die DNA bei der Initialisierung relativ lange erhitzt, um sicherzustellen, dass eine vollständige Trennung der DNA-Doppelstränge gewährleistet wird. In der Annealing-Phase wurde die Temperatur auf einem Wert gehalten, der eine spezifische Anlagerung der Primer an die DNA erlaubt, wobei die genaue Temperatur (T<sub>m</sub>) von der Länge und der Sequenz der Primer abhängig ist und folgendermaßen berechnet wurde:  $T_m = 2 \cdot (A+T) + 4 \cdot (G+C)$ .

Darauf folgte die Elongation, bei der schließlich die DNA-Polymerase, beginnend am 3'-Ende des angelagerten Primers, die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden auffüllt. Die gewählte Elongationszeit hing von der verwendeten DNA-Polymerase und von der Länge der DNA-Matrize ab und erschloss sich folgendermaßen: Taq ~ 2min/kb, Pfu ~ 1min/kb. Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe der horizontalen Gelelektrophorese analysiert.

### 3.2.1.11.1 Analytische PCR

Für die analytische PCR wurde die Taq DNA-Polymerase von *Thermus aquaticus* verwendet. Die zu untersuchende DNA wurde nach einer Ligations- und Transformationsreaktion entweder mit Hilfe des QIAGEN Plasmid Mini Kits (QIAGEN, Hilden) bzw. des nach Sambrook modifizierten Protokolls zur Plasmid-DNA-Isolierung (Sambrook J. 1989) gereinigt eingesetzt oder es wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Bei letzterer wurde Zellmaterial einer Plattenkolonie mit einer Pipettenspitze aufgenommen und in den vorbereiteten PCR-Reaktionsansatz suspendiert. Anschließend wurden 3 ml LB-Medium mit der Pipettenspitze inkubiert, um bei positivem PCR-Ergebnis, die entsprechende Plasmid-DNA zu isolieren und durch einen Restriktionsverdau einen positiven Klon zu bestätigen.

### **3.2.1.11.2 Präparative PCR**

Die Pfu DNA-Polymerase von *Pyrococcus furiosus* wurde zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten für Klonierungen verwendet. Sie besitzt eine Korrekturlesefunktion und liefert dadurch sequenzexakte DNA-Amplifikate. Die DNA-Amplifikate wurden aus dem Agarosegel präpariert und mit dem peqGOLD Gel Extracion Kit (Peqlab, Erlangen) isoliert. Anschließend wurde die DNA mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und mit dem QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden) gereinigt, bevor sie für Ligationsreaktionen eingesetzt wurde.

### **3.2.1.12 DNA-Sequenzierung**

Sequenzierungen wurden von der Fa. SeqLab-Sequence Laboratories in Göttingen durchgeführt. Analysiert wurde die DNA-Sequenz mit Hilfe der Software Vektor NTI (Invitrogen, Karlsruhe).

## **3.2.2 Zellkultur**

### **3.2.2.1 Zellzählung**

Die Zählung eukaryotischer Zellen wurde in der Neubauer Zählkammer durchgeführt.

### **3.2.2.2 Sf9-Zellen**

Das Baculovirus-Expressionssystem ermöglicht die Produktion von Proteinen mit posttranslationalen Modifikationen, wie die Ausbildung von Disulfidbrücken, Phosphorylierung und Glykosylierung sowie die Oligomerisierung, in Sf9-Insektzellen (Ovarzellen von *Spodoptera frugiperda*).

Das Fremdgen wird in den Vektors pBacPak9 integriert. pBacPAK9 ist ein Transfervektor mit AcMNPV Poyhydrin-Promotor. Die flankierenden AcMNPV-Sequenzen sind homolog zu Sequenzen des modifizierten *Autographa californica nuclear polyhydrosis virus* (AcNPV). Durch co-Transfektion der Baculovirus-DNA in Sf9-Zellen kommt es durch homologe Rekombination zur Integration der gewünschten DNA in das Virus-Genom.

#### **3.2.2.2.1 Kultivierung von Sf9-Zellen**

Sf9-Zellen wurden in 15 ml Medium in T-75 Zellkulturflaschen (Greiner, Frickenhausen) adhären in einem Inkubator bei 27 °C ohne CO<sub>2</sub>-Begasung kultiviert. 500 ml TC-100 Insect Medium (Genaxxon, Ulm) wurden mit 10 % FCS, 5 ml ml Penicillin (100 U/ml)/ Streptomycin (0,1 mg/ml Medium) und 1 ml Gentamycin versetzt (50µg/ml Medium). Die Zellen wurden alle 2 Tage bei Erreichen einer 90 bis 100 %igen Dichte im Verhältnis 1:1 geteilt. Dazu wurde unter sterilen Bedingungen das alte Medium abgenommen, mit 10 ml PBS gewaschen und



dieses wieder abgenommen. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig abgeklopft und in neues Medium aufgenommen, bevor die Zellsuspension auf 2 T-75 Zellkulturflaschen aufgeteilt wurde. Um nicht vitale Zellen auszusondern, wurde die Zellsuspension einmal pro Woche bei 1000 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in frischem Medium resuspendiert und die Zellen anschließend wie gewohnt ausgesät.

### **3.2.2.2 Co-Transfektion von Sf9-Zellen**

Sf9-Zellen wurden in einer 80 %igen Dichte in T-25 Zellkulturflaschen (Greiner, Frickenhausen) in 5 ml gentamycinfreiem Medium ausgesät. Nach 12 h wurde das Medium abgenommen und 3 ml neues Medium auf die Zellen gegeben. 200 µl PBS, 2 Mikrogramm Plasmid-DNA, 100 ng BaculoGold-DNA (BD Biosciences, USA) und 20 µl PEI wurden in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß gegeben, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich auf die Zellen gegeben. Am dritten Tag wurde der virushaltige Überstand abgenommen.

### **3.2.2.3 Virusamplifizierung und Infektion von Sf9-Zellen**

Die Infektion der 12 Stunden zuvor in einer Dichte von ca. 80 % ausgesäten Sf9-Zellen wurde in T-75 Zellkulturflaschen durchgeführt. Um eine Erhöhung des Virustiters und eine bessere Infektionseffizienz bzw. Proteinsynthese zu erreichen, wurde der jeweils nach 3 Tagen gewonnene virushaltige Überstand mit frischem gentamycinfreiem Medium verdünnt und zur Infektion neuer Zellen eingesetzt. Auf diese Weise wurde durch Passagierung das Virus Schritt für Schritt amplifiziert.

Ab der 4. Passage verloren infizierte Sf9-Zellen ihre Adhärenz, so dass die Zellen durch Zentrifugation bei 1500 rpm und 4 °C für 10 min gewonnen wurden. Der mit frischem Medium verdünnte Überstand wurde zur Infektion neuer Zellen verwendet. Das Zellpellet wurde, wie im Kapitel Aufreinigung rekombinanter Proteine beschrieben, in Puffer W aufgenommen, lysiert und gereinigt. Analysiert wurde das Zelllysate mittels SDS-PAGE und Westernblot bzw. mit HBeAg ELISA.

Um den Erfolg der co-Transfektion bzw. der Infektion zu prüfen, wurde jeweils mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Hilden) entsprechend der Herstellerangaben DNA aus dem Überstand isoliert und eine PCR mit den jeweils spezifischen Vorwärts- und Rückwärts-Oligonukleotiden durchgeführt.

### 3.2.2.3 Huh7.5-Zellen

#### **3.2.2.3.1 Kultivierung von Huh7.5-Zellen**

Huh7.5-Zellen wurden in 20 ml Medium bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Als Medium wurde DMEM mit 10 % FCS, 5 ml Penicillin (100 U/ml)/ Streptomycin (0,1 mg/ml) und 2 mM L-Glutamin verwendet. Bei einer Konfluenz von 90 bis 100 % wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für 5 min mit 2 ml Trypsin pro T-125 Zellkulturflasche inkubiert. Dann wurden die Zellen in Medium aufgenommen und in der gewünschten Dichte neu ausgesät.

#### **3.2.2.3.2 Membranpermeabilitätstest in Huh7.5-Zellen**

Das Versuchsprotokoll wurde im Kapitel Funktionalität der rekombinanten Proteine bereits beschrieben.

### 3.2.3 Proteinbiochemie

#### 3.2.3.1 Synthese rekombinanter Proteine

##### **3.2.3.1.1 Proteinproduktion durch Sf9-Zellen**

Die Kultivierung und die Transfektion bzw. Infektion von Sf9-Zellen wird im Kapitel Zellbiologische Methoden beschrieben.

##### **3.2.3.1.2 Proteinproduktion in E-coli-Induktionskulturen**

Für die Synthese der verschiedenen rekombinanten HBV core-Proteine wurden die *E. coli* Stämme BL21 (DE3) und Rosetta (DE3) verwendet. Bei dem verwendeten Expressionsvektor pet24 a(+) erfolgt die Genexpression unter Kontrolle des lac I-Repressors, für den auf dem Plasmid kodiert wird und der nach der Transformation exprimiert wird. Der lac I-Repressor bindet einerseits an die lac-Operatorregion des *E. coli*-Genoms und verhindert damit die Synthese von T7-Polymerase. Auf der anderen Seite bindet er an die die lac-Operatorregion des Plasmids, die sich neben dem T7-Promotor befindet. Durch die Zugabe von IPTG löst sich der lac I-Repressor und es erfolgt die Expression des gewünschten Gens.

1 l LB-Medium wurde mit 30 ml Übernachtskultur, die als Selektionsantibiotikum Kanamycin enthielt, angeimpft und im Schüttler bei 37 °C inkubiert. Bei einer OD 600 von 0,5 wurde mit IPTG (Endkonzentration 1 mM) die Genexpression induziert. Nach einer weiteren 3 stündigen Inkubationszeit im Schüttler bei 37 °C wurde bei 5000 prm für 10 Minuten und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit eiskaltem PBS gewaschen. Das Pellet wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C eingefroren.

### 3.2.3.2 Reinigung von rekombinanten Proteinen

#### 3.2.3.2.1 **Lyse**

*E. coli* bzw. Sf9-Zellen wurden in Puffer W resuspendiert und auf Eis mittels Ultraschallbehandlung (5 x 5-10 Sekunden) lysiert. Die Zelltrümmer wurden bei 10000 rpm und 4 °C für 20 Minuten abzentrifugiert.

#### 3.2.3.2.2 **Strep-Tag Affinitätschromatografie**

Das HBV core-Protein weist aufgrund des N-terminalen Strep-Tags eine hohe Affinität zu Streptactin auf.

Die Zellysate wurden sterilfiltriert (Rotilabo 0,45 Mikrometer, Roth, Karlsruhe) und auf die Strep-Tag Affinitätschromatografiesäule (IBA, Göttingen) gegeben. Entsprechend der Herstellerangaben wurde 5 mal mit je 1 Säulenvolumen Puffer W gewaschen, bevor in 6 Fraktionen zu je 0,5fachem Säulenvolumen eluiert wurde. Im Anschluss wurden verschiedenen Fraktionen zur Kontrolle der Reinigung mittels Silbergel und Westernblot analysiert.

#### 3.2.3.2.3 **Gelfiltration**

Bei der Gelfiltration handelt es sich um eine Flüssigkeitschromatografie, die eine Trennung eines Proteingemisches in Lösung aufgrund der Größe ermöglicht. Sie wurde mit Hilfe des ÄKTA Purifiers (Amersham, Freiburg) durchgeführt, wobei die Absorptionen bei 215 nm, 260 nm und 280 nm sowie Druck, Leitfähigkeit und Flussrate kontinuierlich gemessen und aufgezeichnet wurden.

Eine Superose 6-Gelfiltrationssäule (Amersham, Freiburg) wurde hierbei zunächst mit Proteinen bekannter Größe kalibriert. Dazu wurden BSA (45 kDa), Aldolase (147 kDa) und Dextranblau (2000 kDa) verwendet, wobei durch das Dextranblau das Ausschlussvolumen der Säule ermittelt wurde. Als Laufpuffer diente PBS.

Die zuvor gepoolten und mit einem Konzentrator mit einem MWCO von 30 kDa (Millipore, USA) konzentrierten Eluatfraktionen 2-6 wurden anschließend auf die Säule geladen, um korrekt assemblierte rekombinante Kapside (MW ca. 5000 kDa) von HBcAg-Oligo- und Monomeren zu trennen.

#### 3.2.3.2.4 **Dichtegradientenzentrifugation**

Bei der Dichtegradientenzentrifugation werden Proteine in einer Ultrazentrifuge anhand ihrer Bewegungsgeschwindigkeit unter dem Einfluss starker Zentrifugalkräfte gereinigt.

Zur Reinigung von HBcAg-Partikeln wurde ein Sucrose-Stufengradient verwendet. Dazu wurden in ein Ultrazentrifugenröhrchen (Beckmann, USA) je 200 µl Sucroslösung gegeben, die jeweils mit 10 % geringer konzentrierter Lösung überschichtet wurde (60 %-10 %). Im

Anschluss wurde vorsichtig die Proteinprobe oben aufgetragen. Zentrifugiert wurde mit einem Ausschwingrotor in einer Ultrazentrifuge bei 52000 g und 4 °C für 50 Minuten. Nach der Zentrifugation wurden von oben nach unten Fraktionen zu je 300 µl abgenommen und mittels HBeAg ELISA analysiert.

### **3.2.3.2.5 Konzentrierung von Proteinlösungen**

Mit Hilfe von Konzentratoren mit einem MWCO (molecular weight cut off) von 30 kDa (Millipore, USA) wurde das Volumen einer Proteinlösung bei 4000 g und 4 °C eingeengt. Die Konzentrate wurden für die Gelfiltration, für elektronenmikroskopische Aufnahmen sowie für Versuche zur Zellpermeabilität der rekombinanten Proteine verwendet.

### **3.2.3.2.6 Dialyse**

Im Rahmen unterschiedlicher Reinigungsstrategien wurden Lösungen, die in ihrer Ionenstärke oder Pufferzusammensetzung für weitere Reinigungsschritte ungeeignet waren, zunächst dialysiert. Dabei wurden sämtliche Dialyseschritte bei 4 °C in Dialyseschläuchen mit einem MWCO von 10000 Da oder 30000 Da (Spectrum Lab, USA) durchgeführt. Die Dialyse erfolgte je nach Zweck ohne Pufferwechsel über einen Zeitraum von 8 h oder über 8 h und 2 mal 4 Stunden mit jeweiligem Pufferwechsel.

### **3.2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Eine Bestimmung der Proteinkonzentration wurde durch die photometrische Messung einer Probe durch Absorptionsmessung bei 280 nm in einer Quarzküvette durchgeführt.

Verbindungen, die aromatische Ringsysteme enthalten, haben ein Absorptionsmaximum bei OD 280. Bei Proteinen sind die Aminosäuren Tryptophan, sowie schwächer auch Tyrosin und Phenylalanin für dieses Absorptionsmaximum bei OD 280 verantwortlich. Um eventuelle Verunreinigungen durch Nukleinsäuren zu berücksichtigen, wird zusätzlich die Absorption bei OD 260 gemessen und die näherungsweise Proteinkonzentration mit folgender Formel berechnet:

$$C \text{ Protein (mg/ ml)} = 1,55 \times E_{280} - 0,76 \times E_{260}$$

### **3.2.3.4 TCA-Fällung**

Die Proteinlösung wurde mit Desochocholol (Endkonzentration 2 %) und TCA (Endkonzentration 10%) versetzt, gemischt und bei 13000 rpm und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die ausgefallenen Proteine in 4x SDS-Probenpuffer gelöst. Um den durch die Trichloressigsäure niedrigen pH-Wert zu neutralisieren, wurde anschließend Ammoniak hinzugefügt bis ein Farbumschlag nach blau eintrat und die Proben durch SDS-PAGE und Westernblot analysiert.

### 3.2.3.5 Nachweis von Proteinen

#### 3.2.3.5.1 **SDS-PAGE**

Die SDS-Polyakrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren, um ein Proteingemisch entsprechend dem Molekulargewicht im elektrischen Feld aufzutrennen (Laemmli 1970). Zur Denaturierung wurden die Proteine mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und anschließend für 10 Minuten bei 95 °C erhitzt. Sodiumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergens, das sich mit seiner hydrophoben Kohlenstoffkette an die Seitenketten der Aminosäuren anlagert und diese negativ lädt, so dass eine Auftrennung ausschließlich nach dem Molekulargewicht ermöglicht wird.

Es wurden 10 bis 14 %ige Mini-Trenngele (9 x 6 cm) mit einem pH-Wert von 8,3 verwendet, die mit einem 5 %igen Sammelgel (pH 6,8) überschichtet wurden:

Trenngel	10 % Gel	12 % Gel	14 % Gel
Acrylamid 40 % (v/v)	20 ml	24 ml	28
4 X Trenngelpuffer	20 ml	20 ml	20
H <sub>2</sub> O	40 ml	36 ml	32
TEMED	80 µl	80 µl	80 µl
Ammoniumperoxidsulfat (w/v)	0,025 %	0,025 %	0,025 %

Sammelgel	5 % Gel
Acrylamid 40 % (v/v)	5 ml
4 X Sammelgelpuffer	10 ml
H <sub>2</sub> O	25 ml
TEMED	60 µl
Ammoniumperoxidsulfat (w/v)	0,025 %

Die Gelelektrophorese erfolgte in 1x SDS-Laufpuffer für ca. 1,5 h bei 100-130 Volt.

#### 3.2.3.5.2 **Silberfärbung von Polyakrylamidgelen**

Die Silberfärbung ist ein Verfahren zur Visualisierung von Proteinbanden nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung im Polyacrylamidgel. Mit der Silberfärbung können

Proteinmengen im Nanogramm-Bereich nachgewiesen werden. Damit gehört sie zu sensitivsten Färbemethoden für Polyacrylamid-Gele.

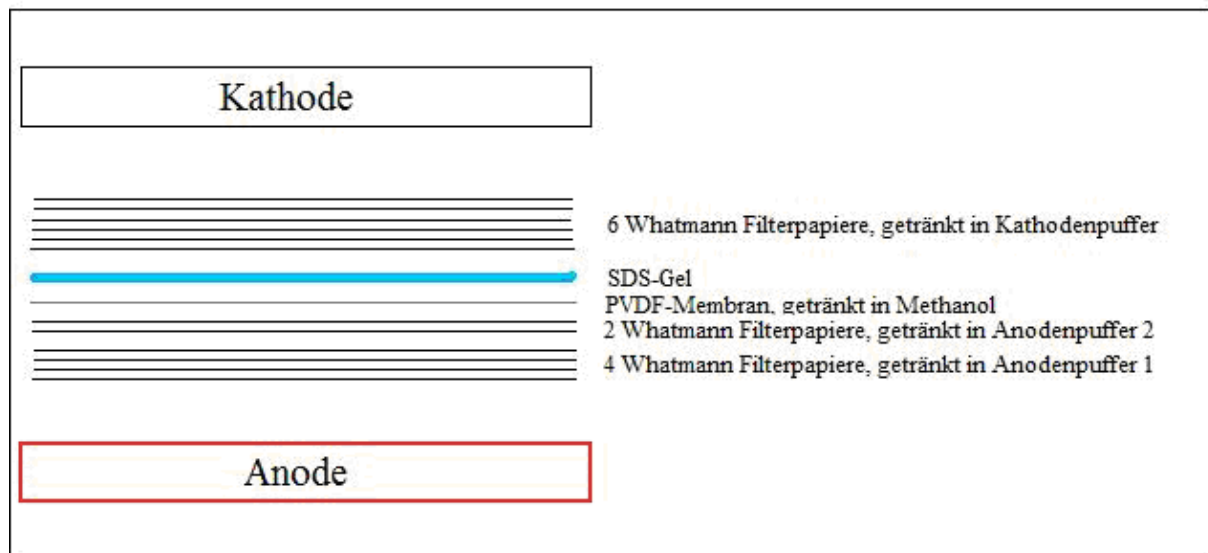
Bei der Färbung bildet das Ag<sup>+</sup>-Ion Komplexe mit den Peptidbindungen der Proteine. Durch alkalisches Formaldehyd wird dann das Ag<sup>+</sup> zu Ag reduziert.

Die Silberfärbung wurde durchgeführt, um die die Reinheit eines Proteins zu überprüfen. Dazu wurde das Polyacrylamidgel nach beendeter SDS-PAGE zunächst für 30 Minuten in die Fixiererlösung gegeben. Danach wurde es in den Conditioner überführt und anschließend 3 mal für je 5 Minuten mit dd H<sub>2</sub>O gewaschen, bevor es für 20 Minuten in der Silbernitratlösung inkubiert wurde. Durch das Überführen des Gels in die Entwicklerlösung erfolgte die Färbung der Proteine, wobei die Reaktion nach Erreichen der gewünschten Farbtintensität durch die Zugabe von Essigsäure abgestoppt wurde.

### 3.2.3.5.3 **Westernblot**

Der Westernblot wurde nach dem semi-dry-Verfahren durchgeführt. Dabei werden die Proteine, nach gelelektrophoretischer Auftrennung eines Proteingemisches im Polyacrylamidgel, durch elektrische Spannung auf eine PVDF-Membran (Millipore, USA) transferiert und anschließend immunologisch detektiert.

Der Blot wurde folgendermaßen aufgebaut:



Der Transfer erfolgte in einem diskontinuierlichen Puffersystem bei einer konstanten Feldstärke von 1,3 mA/cm<sup>2</sup> für 1 Std.

Im Anschluss wurde die Membran 45-60 Minuten mit 10 %igem Magermilchpulver in TBST inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membranoberfläche zu blocken. Danach erfolgte die Inkubation des 1. Antikörpers in der entsprechenden Verdünnung in 10 %igem Magermilchpulver in TBST für 1 h bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht.

Nichtgebundener Antikörper wurde dann durch 5maliges Waschen für je 5-10 Minuten in TBST entfernt. Nun folgte die Inkubation des 2. Antikörpers in entsprechender Verdünnung in 10 %igem Magermilchpulver in TBST für 1 h und ein erneutes 5maliges Waschen der Membran für je 5-10 Minuten. Die Proteindetektion wurde mit dem ECL-System entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Dabei setzt die *Horseradish*-Peroxidase, die an den Sekundärantikörper gekoppelt ist, das Substrat um. Bei einer Wellenlänge von 425 nm kommt es dabei zu einer Emission von Lichtquanten, die mit Hilfe eines Röntgenfilms (Hyperfilm ECL-Chemiluminescence, GE Healthcare, Freiburg) detektiert wurden.

#### **3.2.3.5.4 Immunfluoreszenzmikroskopie**

Mit der Immunfluoreszenzmikroskopie wurde zum einen die Syntheseeffizienz des jeweiligen Proteins in Sf9 Zellen und zum anderen die rekombinant hergestellten HBcAg-Kapside auf ihre Membranpermeabilität in Huh7.5-Zellen untersucht.

Die Sf9-Zellen wurden dazu 72 h *p.i.* geerntet und zweimal mit PBS gewaschen. Zur Fixierung wurden die Zellen 10 min bei Raumtemperatur in 3,7 % Formaldehyd/ PBS inkubiert. Danach wurden sie abzentrifugiert (1500 rpm, 4 °C, 10 min). Im Anschluss wurden die Zellen für 10 min in TBS inkubiert und erneut abzentrifugiert, bevor das Pellet noch einmal mit PBS gewaschen und wieder abzentrifugiert wurde. Nun wurde das Pellet in dem 7-fachen Volumen PBS resuspendiert und 2 Tropfen dieser Suspension wurden auf Objektträger gegeben und luftgetrocknet. Vor der weiteren Färbung wurden die Zellen zur Rehydratation für 30 min in TBST gegeben.

Die auf Deckgläschen in 24-well-Platten gewachsenen Huh 7.5-Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen und im Anschluss mit eiskaltem Ethanol:Aceton (1:1) für 15 min fixiert.

Um ein Austrocknen der Präparate zu vermeiden wurden die weiteren Schritte in einer feuchten Kammer durchgeführt. Es wurde zunächst für 45 min mit 10 % BSA/ TBST geblockt und danach der 1. AK in 10 % BSA/TBST für 90 min inkubiert. Anschließend wurde drei mal 10 min in TBST gewaschen. Ab jetzt wurde unter Lichtschutz gearbeitet, um ein Ausbleichen der Präparate zu verhindern. Der 2. Antikörper (Cy3-gekoppelt) wurde für 90 min inkubiert und die Präparate wurden erneut drei mal 10 min mit TBST gewaschen. Zur Visualisierung der Zellkerne folgte eine Färbung mit DAPI (1 µg/ml in TBST) für 15 min und erneut ein dreimaliges Waschen der Präparate für je 10 min.

Eingedeckelt wurden die Präparate mit Mowiol, bevor sie mit dem konfokalen Laser-Rastermikroskop ausgewertet wurden.

### **3.2.3.5.5 HBeAg ELISA**

Die Messung der HBeAg-Titer zum Nachweis der rekombinanten modifizierten HBV core-Proteine erfolgte am Architect i1000SR (Abbott Laboratories, USA) unter Verwendung des ARCHITECT HBeAg assays (Abbott Laboratories, USA). Letzterer ist ein Immunassay, der in 2 Schritten abläuft. Im ersten Schritt bindet in der Probe enthaltenes HBe-Antigen an mit Anti-HBe beschichtete paramagnetische Mikropartikel. Nach einem Waschschrift und der Zugabe von Acridinium-gekoppeltem Anti-HBe bindet dieser an HBe-Antigen. Nach Zugabe von Trigger-Lösungen erfolgt nun die Messung der Chemilumineszenzreaktion, wobei diese in relative light units (RLU) angegeben wird. Die Menge in der Probe enthaltenen HBe-Antigens ist hierbei proportional zu den gemessenen RLU-Werten.

Die Bestimmung des HBeAg-Titers erfolgt durch den Vergleich der in der Probe gemessenen RLU zu einer cutoff-RLU und wird in S/CO (Sample RLU/Cutoff RLU) angegeben. Dabei sind Proben mit einem Titer von  $< 1.000$  S/CO nicht reaktiv und solche mit einem S/CO  $> 1.000$  reaktiv.

### **3.2.3.5.6 Elektronenmikroskopie**

Der Nachweis von korrekt assemblierten HBV core-Partikeln erfolgte durch Elektronenmikroskopie. Diese wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Klaus Boller am Paul Ehrlich Institut in Langen durchgeführt.

### **3.2.3.6 Funktionalität der rekombinanten Proteine**

Die in *E. coli* Rosetta-Induktionskulturen synthetisierten Proteine HBV core 1-151 und HBV-core 1-151, E2a wurden auf ihre Funktionalität getestet.

#### **3.2.3.6.1 Membranpermeabilitätsversuch in Huh7.5-Zellen**

Zum Test der Membranpermeabilität wurden Strep-Tag aufgereinigte Proteine aus je 2 l Induktionskultur verwendet. Die Fraktionen E2-E6 wurden gepoolt und ein Aliquot wurde mit 100  $\mu$ l komplettiertem DMEM-Medium versetzt. Der Rest wurde mit einem Konzentrator mit einem MWCO von 30 kDa (Milipore, USA) auf 100  $\mu$ l ankonzentriert und ebenfalls mit 100  $\mu$ l Medium versetzt. Dann wurden die verschiedenen Proben auf bereits in einer 24-Well-Platte ausgesäten Huh7.5-Zellen ( $1 \times 10^5$  Zellen/Well) gegeben, nachdem das alte Medium angenommen worden war. Nach 2stündiger Inkubationszeit bei 37 °C wurde das Medium abgesaugt, einmal mit kaltem PBS gewaschen und dieses sofort wieder abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit Ethanol:Aceton (1:1) für 15 Minuten fixiert, bevor sie wie im Kapitel Immunfluoreszenzmikroskopie beschrieben gefärbt wurden.



### **3.2.3.6.2 Membranpermeabilitätstest in Mäusen**

Die Fraktionen E2-E6 Strep-Tag aufgereinigter Proteine aus je 6 l Induktionskultur wurden über Nacht in einem Dialyseschlauch mit einem MWCO von 30 kDa (Spectrum Lab, USA) gegen 20 mM Tris, 10 % Sucrose mit pH 8 dialysiert. Dann wurde mit einem Amicon Ultra-15, PLTK Ultracel-PL Membrane (Millipore, USA) mit einem MWCO von 30 kDa auf 2 ml ankonzentriert. Anschließend wurden je 4 Mäuse mit jeweils 0,5 ml Proteinlösung gefüttert. 2-6 h später wurden die Mäuse getötet und durch intrakardiale Punktion wurde Blut gewonnen, das mit 0,5 M EDTA (Endkonzentration 10 %) versetzt wurde. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 2000 g und 4 °C wurde das Blut durch HBeAg ELISA auf HBV core-Antigen untersucht.

### **3.2.3.6.3 Immunisierung von Mäusen**

Wie zum Test der Membranpermeabilität in Mäusen wurden die jeweiligen Proteine hergestellt, gereinigt und ankonzentriert. Jeweils 4 Mäuse wurden mit je 0,5 ml Proteinkonzentrat aus je 1,5 l Induktionskultur gefüttert, bevor sie 14 Tage später getötet wurden und das Blut wie oben beschrieben gewonnen wurde. Anschließend wurde es mit EDTA versetzt (Endkonzentration 10 %) und zentrifugiert. Zum Nachweis von HCV-spezifischen Antikörpern wurden anschließend zum einen ein ELISA und zum anderen eine Westernblotuntersuchung durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

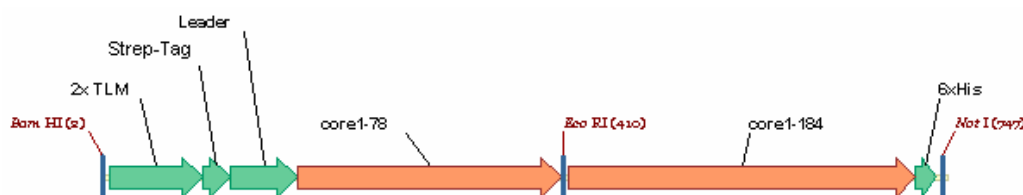
### 4.1 Generierung der HBc-VLP-Konstrukte im Baculovirus-Sf9-Expressionssystem

#### 4.1.1 Herstellung der pBacPAK9-Konstrukte

Die Herstellung der verschiedenen HBc-VLP-Konstrukte erfolgte im Baculovirus-Sf9-Expressionssystem auf der Basis des Transfervektors pBacPAK9 (Clontech, USA). Sämtliche generierten HBc-VLP-Konstrukte enthalten N-terminal 2 TLM-Peptide, die invers-revers mit einem *Linker* aus den Aminosäuren SGS gekoppelt sind und die die Membranpermeabilität vermitteln sollen. Für die spätere Reinigung des Fusionsproteins mittel Affinitätschromatografie mit Streptactin Sepharose-Säulen wurde ein Strep-Tag eingefügt. Der Leader soll die korrekte Exposition der N-terminalen Bestandteile des Fusionsproteins auf der Partikeloberfläche sicher stellen (Schodel, Peterson et al. 1993). Die sich anschließende Sequenz kodiert für das 184 AS-lange ungekürzte HBcAg. Um eventuell auf eine alternative Reinigungsstrategie zurückgreifen zu können, wurde C-terminal ein 6xHIS-Tag eingefügt, der eine affinitätschromatografische Reinigung über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Chromatographie ermöglicht.

##### 4.1.1.1 2xTLM,Strep-Tag,leader,core 1-184,6xHIS (HBV core 1-184-Konstrukt)

Zur Generierung des HBV core 1-184-Konstrukts wurde zunächst ein TOPO-Vektor (Invitrogen), der 2xTLM,Strep-Tag,leader,HBV core 1-78 enthielt (Himmelsbach et al.) mit den Restriktionsenzymen BamHI und EcoRI entsprechend der Herstellerangaben geschnitten. Im Anschluss wurde die Sequenz 2xTLM, Strep-Tag,leader,HBV core 1-78 durch Ligation mit T4-Ligase in den ebenfalls mit BamHI und EcoRI verdauten und dephosphorylierten Vektor pBacPAK9,HBV core 79-184 (K. Himmelsbach) inseriert.



**Abb. 9** Schematische Darstellung der kodierenden Sequenz des Expressionskonstrukts pBacPAK9 2xTLM,Strep-Tag,leader,core 1-184,6xHIS (HBV core 1-184-Konstrukt).

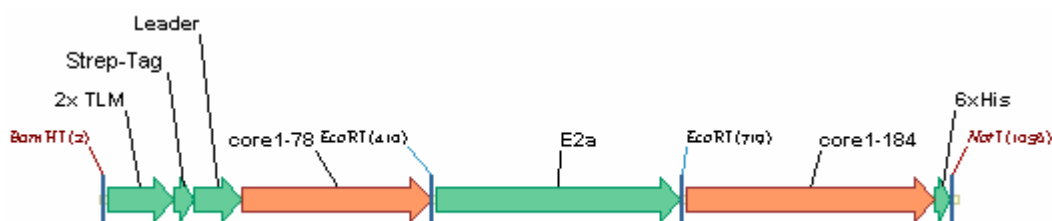
Die Sequenz ist 752 Basenpaare lang und kodiert für ein theoretisch 27,5 kDa großes Protein.

#### 4.1.1.2 2xTLM,Strep-Tag,leader,core 1-78,E2a,core 79-184,6xHIS (HBV core 1-184, E2a-Konstrukt)

Das E2-Fragment E2a wurde zunächst durch PCR mit der Pfu-DNA-Polymerase aus der Template-DNA pJFH1-wt (Genotyp 2a) amplifiziert. Hierzu wurden die Primer #288 und #289 verwendet. Das PCR-Programm wurde folgendermaßen gewählt:

5 min	96 °C	}	30 x
30 sec	95 °C		
30 sec	55 °C		
2 min	72 °C		
5 min	72 °C		
∞	4 °C		

Das so amplifizierte E2a-Fragment wurde dann durch horizontale Gelelektrophorese aufgetrennt, aus dem Gel extrahiert, mit EcoRI geschnitten und in den mit EcoRI linearisierten und dephosphorylierten Vektor 2xTLM,Strep-Tag,leader,core 1-184,6xHIS (HBV core 1-184-Konstrukt) eingefügt.

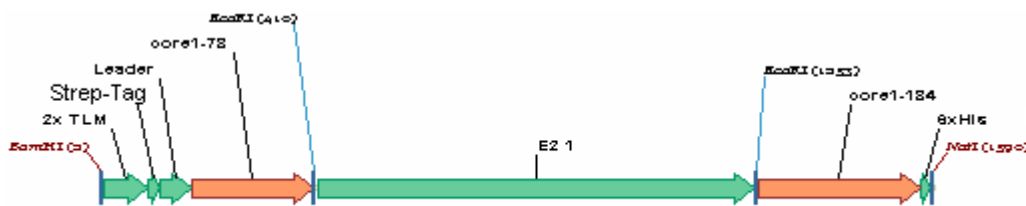


**Abb. 10 Schematische Darstellung der kodierenden Sequenz des Expressionskonstrukts pBacPAK9 2xTLM,Strep-Tag,leader,core 1-78,E2a,core 79-184,6xHIS (HBV core 1-184, E2a-Konstrukt).**

Das HBV core 1-184, E2a-Konstrukt enthält nun dieselben Elemente wie das HBV core 1-184-Konstrukt und zusätzlich einen Teil des HCV-Oberflächenproteins E2, welches durch die Insertion zwischen den AS 78 und 79 des HBV core-Protein im *Spike-tip* auf der Partikeloberfläche exponiert (Bottcher, Wynne et al. 1997; Conway, Cheng et al. 1997). Die gesamte Sequenz ist 1061 Basenpaare lang, was einer Größe des synthetisierten Proteins von theoretisch 38,9 kDa entspricht.

#### 4.1.1.3 2xTLM,Strep-Tag,leader,core 1-78,E2\_1,79-184,6xHIS (HBV core 1-184, E2\_1-Konstrukt)

Die Generierung des HBV core 1-184, E2\_1-Konstruktes erfolgte ebenfalls auf der Grundlage des HBV core 1-184-Konstruktes. Letzteres wurde, wie beschrieben, mit EcoRI verdaut und dephosphoryliert. Im Anschluss wurde das mit EcoRI aus dem Vektor pBacPAK9,HBV core 1-78,E2\_1,79-184,6xHIS (K. Himmelsbach) geschnittene E2\_1-Fragment in das HBV core 1-184-Konstrukt integriert.

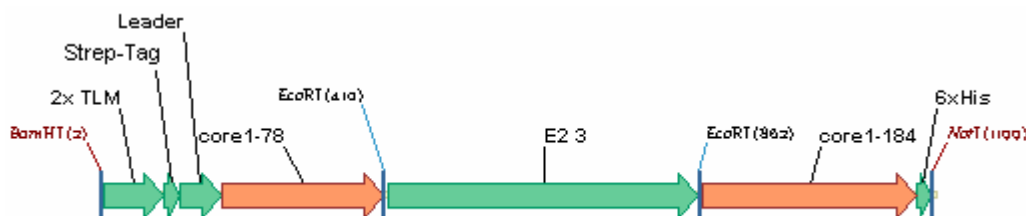


**Abb. 11** Schematische Darstellung der kodierenden Sequenz des Expressionskonstrukts pBacPAK9 2xTLM,Strep-Tag,leader,core 1-78,E2\_1,79-184,6xHIS (HBV core 1-184, E2\_1-Konstrukt).

Die Länge der Sequenz beträgt 1595 Basenpaare. Somit besitzt das Fusionsprotein eine ungefähre Größe von 58,5 kDa.

#### 4.1.1.4 2xTLM,Strep-Tag,leader,core 1-78,E2\_1,79-184,6xHIS (HBV core 1-184, E2\_3-Konstrukt)

Das E2\_3 wurde mit EcoRI aus dem Vektor pBacPAK9,HBV core 1-78,E2\_3,79-184,6xHIS (K. Himmelsbach) geschnitten und auf dieselbe Art wie zuvor in das HBV core 1-184-Konstrukt inseriert.



**Abb. 12** Schematische Darstellung der kodierenden Sequenz des Expressionskonstrukts pBacPAK9 2xTLM,Strep-Tag,leader,core 1-78,E2\_1,79-184,6xHIS (HBV core 1-184, E2\_3-Konstrukt).

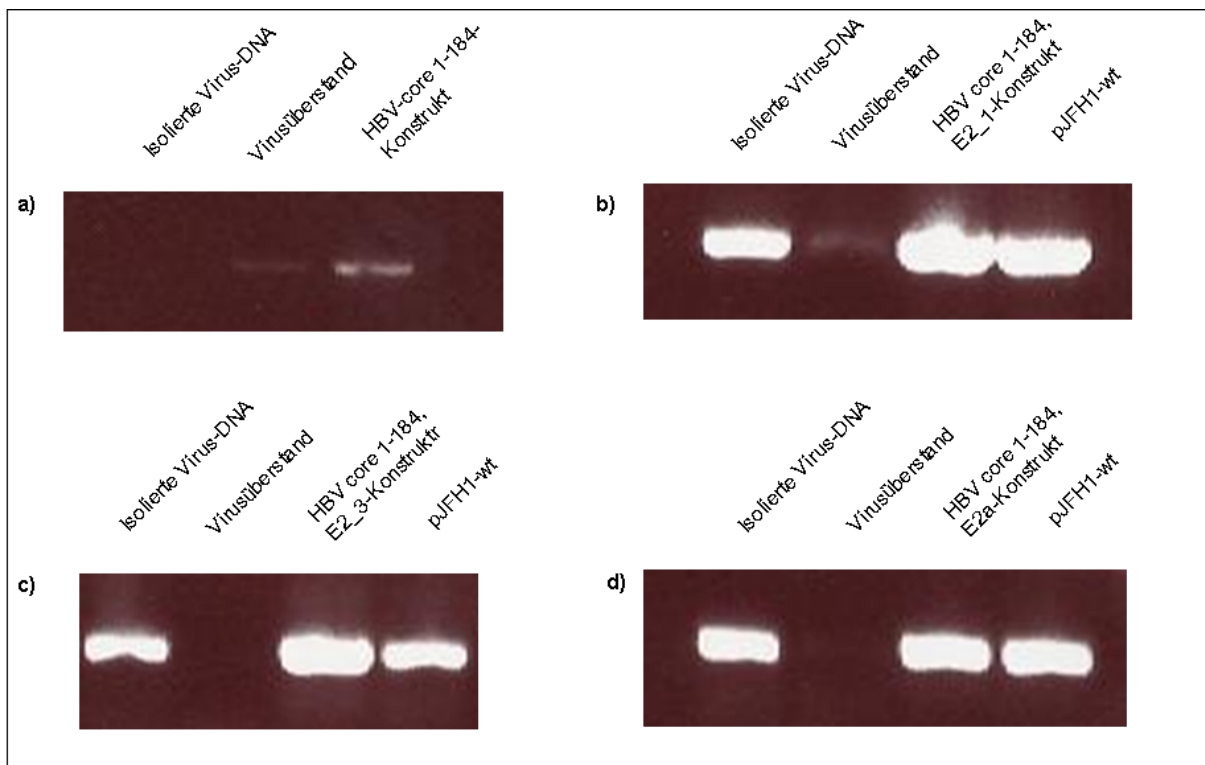
Das Konstrukt ist 1204 Basenpaare lang und das erwartete Protein theoretisch 44,1 kDa groß.

### 4.1.2 Nachweis der Infektion

Mit dem Ziel, die erfolgreiche co-Transfektion bzw. Infektion der Sf9-Zellen nachzuweisen, wurde nach der 4. Passage für jedes Konstrukt 3 Tage nach Infektion der Sf9-Zellen Überstand gewonnen und die darin enthaltene DNA mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Hilden) isoliert. Anschließend wurde mit den für das jeweilige Konstrukt spezifischen Primern eine PCR mit folgendem Programm durchgeführt:

5 min	96 °C	}	30 x
30 sec	95 °C		
30 sec	56 °C		
2 min	72 °C		
5 min	72 °C		
∞	4 °C		

Das jeweilige PCR-Produkt wurde durch horizontale Gelelektrophorese analysiert.



**Abb. 13 Nachweis der generierten rekombinanten Baculoviren.**

Die Abbildung zeigt die PCR-Produkte nach Elektrophorese im 1 %igen Agarosegel. Die ersten drei Spuren sind jeweils die aus dem Virusüberstand isolierte DNA, der nativ eingesetzte Virusüberstand und der jeweilige Vektor als Positivkontrolle. Im Falle der Konstrukte mit HCV-Epitop (E2\_1, E2\_3 und E2a) wurde als zusätzliche Kontrolle der pJFH1-wt-Vektor eingesetzt. Für das HBV core 1-184-Konstrukt wurden die Primer #285 und #191 verwendet (a). Für das HBV core 1-184, E2\_1-Konstrukt (840 Bp) wurden die E2\_1 spezifischen Primer #235 und #236 (b), für das HBV core 1-184, E2\_3-Konstrukt die E2\_3 (450 Bp) spezifischen Primer #239 und #240 (c) und für das HBV core 1-184, E2a-Konstrukt (350 BP) die E2a spezifischen Primer #288 und #289 (d) eingesetzt.

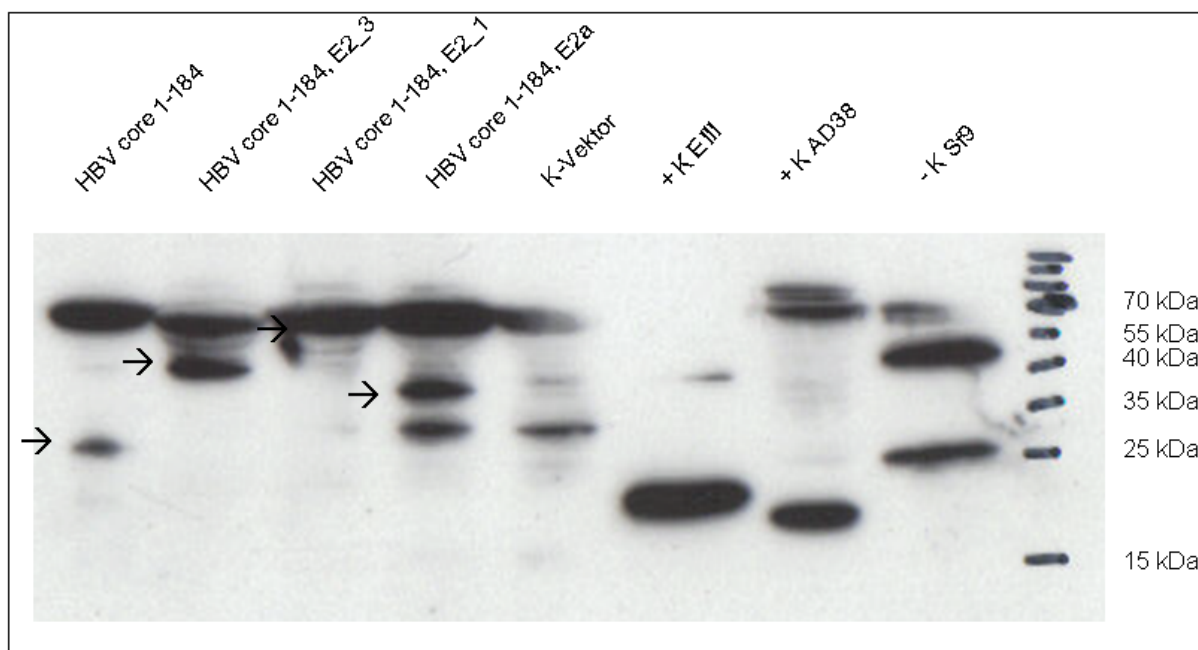
Im Falle der Konstrukte HBV core 1-184, E2\_1 **(b)**, HBV core 1-184 E2\_3 **(c)** und HBV core 1-184 E2a **(d)** sind in **Abb. 13** deutliche Signale bei der zu erwarteten Größe jeweils für die isolierte Virus-DNA und für die jeweiligen Positivkontrollen (jeweiliger Vektor und pJFH1-wt) vorhanden. Dies zeigt, dass die co-Transfektion erfolgreich war, die Baculoviren replizieren und der Überstand nach 4 Passagen infektiös ist.

Im Falle des HBV core 1-184-Konstrukts hat, da auch die Positivkontrolle nicht sonderlich gut funktioniert hat, die PCR nicht optimal funktioniert (**Abb. 13 (a)**).

### 4.1.3 Nachweis der Proteinsynthese

Um nachzuweisen, dass die jeweiligen HBc-Fusionsproteine in den Sf9-Zellen synthetisiert werden, wurden jeweils Lysate hergestellt und mittels SDS-PAGE und anschließendem Westernblot bzw. mittels HBeAg ELISA analysiert.

#### 4.1.3.1 Nachweis der Proteinsynthese im Westernblot



**Abb. 14 Nachweis der Proteinsynthese durch Westernblotanalyse (14 %-Gel).**

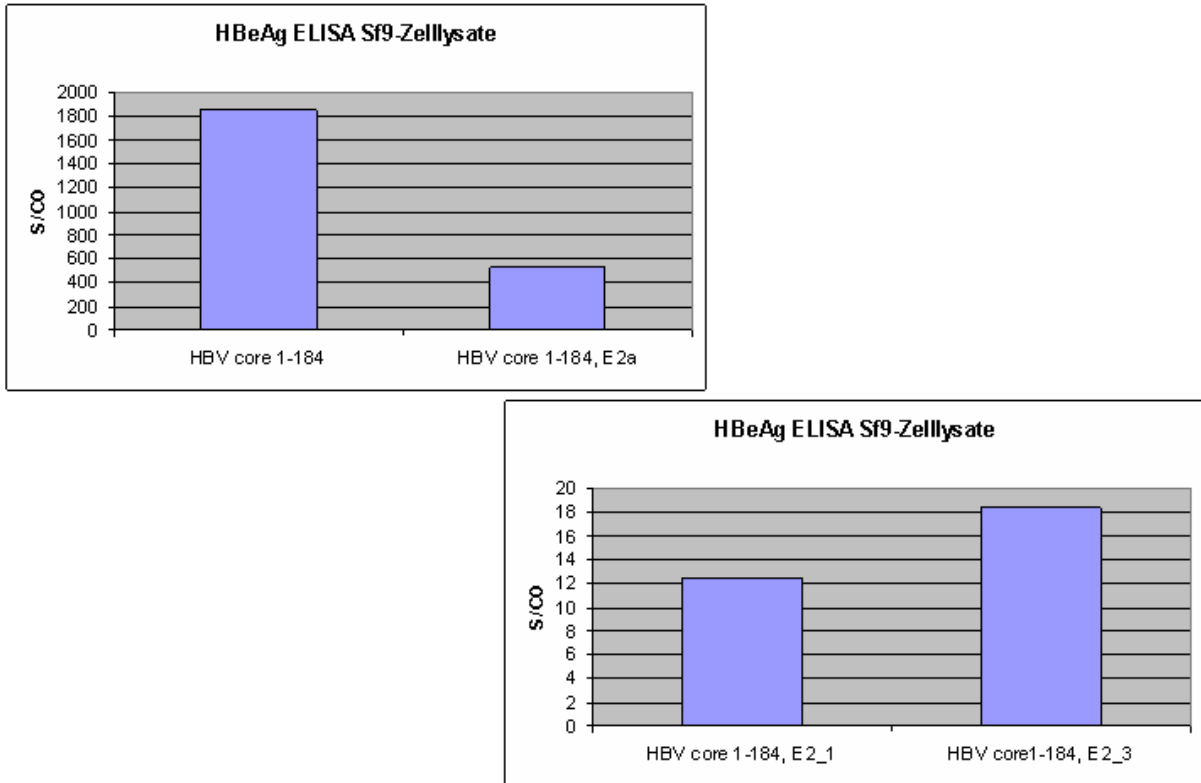
Als 1. AK wurde Anti-HBcAg (Pierce, USA) verwendet, 2. AK war HRP-gekoppelter Anti-Kaninchen-IgG (GE Healthcare, GB).

Der Westernblot zeigt in den ersten 4 Spuren die verschiedenen HBc-Konstrukte. In der 5. Spur wurde Lysat von Sf9-Zellen geladen, die mit der BaculoGold-DNA (BD Biosciences, USA) und dem Kontrollvektor pVL1392-XylE (BD Biosciences, USA) co-transfiziert wurden. Es folgt als Positivkontrolle die dritte Eluatfraktion der Strep-Tag Aufreinigung eines bakteriell hergestellten und C-terminal gekürzten HBV core-Konstruktes (pet24a(+)) 2xTLM, Strep-Tag, leader, core 1-151, 6xHIS, 24 kDa, K. Himmelsbach) und HBV-positives AD38-Lysat. Als Negativkontrolle wurde Lysat nicht-infizierter Sf9-Zellen aufgetragen.

Für das HBV core 1-184-Konstrukt (27,5 kDa), das HBV core 1-184, E2\_3-Konstrukt (44 kDa) sowie für das HBV core 1-184, E2a-Konstrukt (39 kDa) sind in der Westernblotanalyse (**Abb. 14**) jeweils spezifische Signale im Westernblot vorhanden (schwarze Pfeile). Dies

zeigt, dass durch erfolgreiche Infektion der Sf9-Zellen und durch Replikation des Virus die gewünschten Proteine produziert werden. Ein Nachweis des HBV core 1-184, E2<sub>1</sub>-Fusionsproteins konnte im Westernblot nicht erbracht werden.

#### 4.1.3.2 Nachweis der Proteinsynthese durch HBeAg ELISA



**Abb. 15 Nachweis der Proteinsynthese durch HBeAg ELISA-Analyse.**

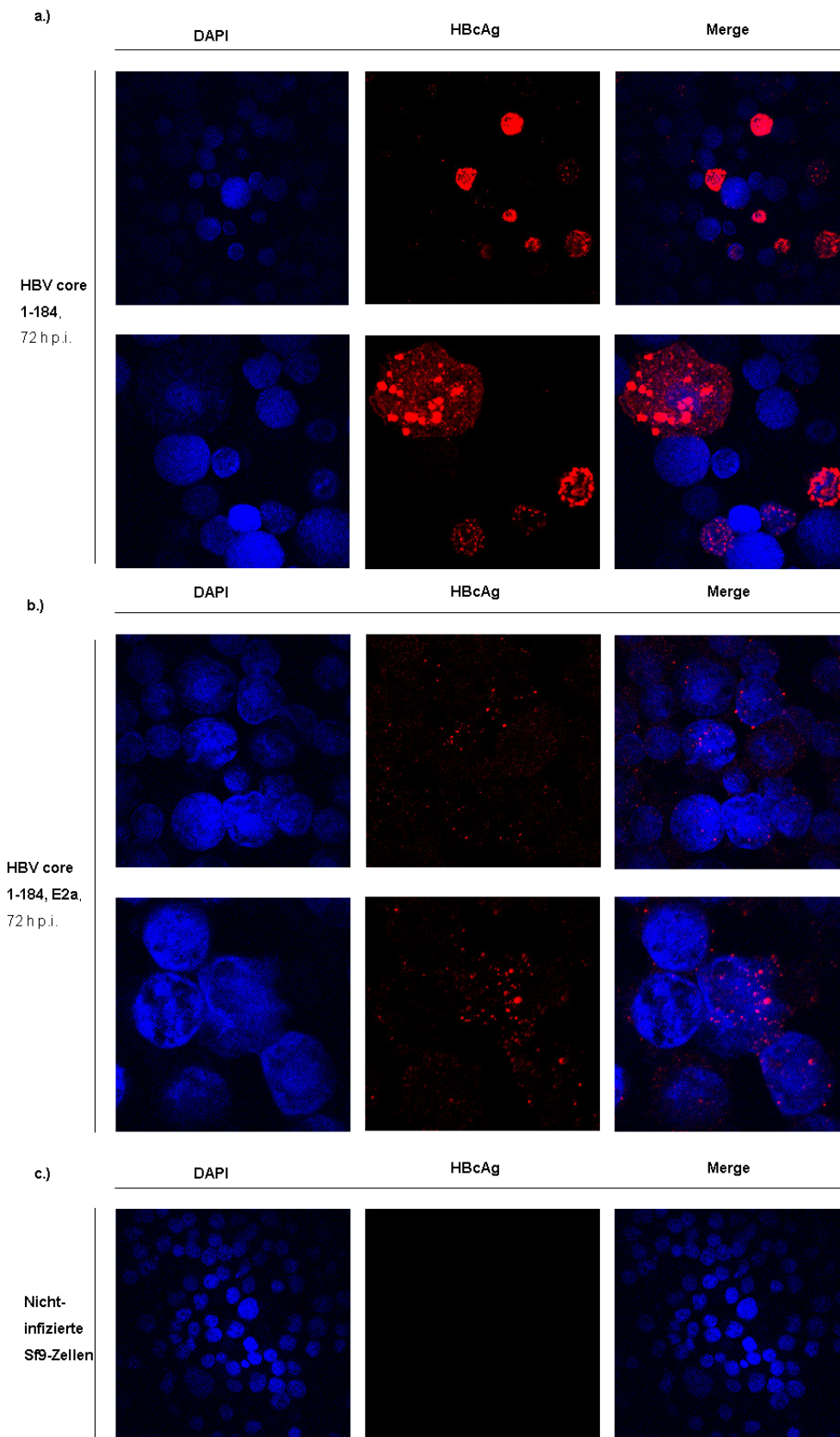
Die Balkendiagramme zeigen die HBeAg-ELISA-Werte der analysierten Lysate für das HBV core 1-184-Konstrukt, das HBV core 1-184, E2a-Konstrukt, das HBV core 1-184, E2<sub>1</sub>-Konstrukt sowie das HBV core 1-184, E2<sub>3</sub>-Konstrukt. Die jeweiligen Werte werden in S/CO angegeben.

In der HBeAg ELISA-Analyse (**Abb. 15**) konnten für das HBV core 1-184-Konstrukt und für das HBV core 1-184, E2a-Konstrukt in einem repräsentativen Experiment mit 1847 S/CO bzw. 531 S/CO relativ hohe HBeAg-Werte erreicht werden. Die Werte für das HBV core 1-184, E2<sub>1</sub>-Konstrukt mit 12 S/CO bzw. für das HBV core 1-184, E2<sub>3</sub>-Konstrukt mit 18 S/CO waren hingegen relativ niedrig. Allerdings war der auf HBeAg-spezifisch reagierende ELISA-Test in allen vier Fällen positiv und oberhalb der cutoff-Grenze, wodurch in allen vier Fällen die Expression des jeweiligen HBc-Konstrukts nachgewiesen werden konnte.

#### 4.1.3.3 Nachweis der Proteinsynthese durch Immunfluoreszenzmikroskopie

Um die Expression von Partikeln nachzuweisen bzw. um die Infektionseffizienz von Sf9-Zellen zu kontrollieren, wurden im Falle des HBV core 1-184- und des HBV core 1-184, E2a-Konstruktes die jeweiligen Sf9-Zellen 72 h *post infectionem* fixiert. Als Primärantikörper wurde der Anti-HBcAg MAB 3120 (Institut of Immunology, Japan) verwendet, der ausschließlich assemblierte Partikel bindet (Conway JF 2003). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt.





**Abb. 16 Nachweis infizierter Sf9-Zellen 72 h p.i. durch Konfokal-Immunfluoreszenzmikroskopie.** Als 1. AK wurde ein anti-HBV core-spezifischer Antikörper (MAB 3120, Institut of Immunology, Japan) verwendet, der mit einem Cy3-gekoppeltem Zweitantikörper detektiert wurde. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. **a.)** HBV core 1-184-Partikel, **b.)** HBV core 1-184, E2a-Partikel **c.)** Nicht-infizierte Sf9-Zellen.

In der Konfokal-Immunfluoreszenzmikroskopie (**Abb. 16**) sind im Falle des HBV core 1-184-Konstrukts bei einigen Zellen starke fluoreszierende Signale im Bereich des Cytoplasmas vorhanden (**a.**)), was zeigt dass die Zellen HBV core-Partikel produzieren. Auffällig ist, dass bei den positiven Zellen in den meisten Fällen die Zellkerne mehr oder weniger stark degeneriert sind, was darauf hindeutet, dass aufgrund der Infektion mit dem rekombinanten Baculovirus die Zellen, die 72 h vorher infiziert worden waren, absterben. Weiterhin ist zu beachten, dass nur etwa 30 % der Zellen rekombinante Proteine synthetisieren, was darauf hindeutet, dass die Infektionseffizienz relativ gering ist.

Bei den Sf9-Zellen, die mit dem E2a-rekombinanten Baculovirus infiziert worden waren, sind 72 h *p.i.* die Partikel-spezifischen Signale im Vergleich zum HBV core 1-184-Konstrukt wesentlich geringer (**b.**)). Einerseits sind ebenso wie beim HBV core 1-184-Konstrukt nur etwa 30 % der Zellen infiziert, andererseits scheinen diejenigen Zellen, die infiziert sind weniger Fusionsproteine bzw. assemblierte Partikel zu produzieren. Allerdings kann die geringe Signalstärke auch darauf hindeuten, dass der MAB 3120-Antikörper diejenigen Partikel, die das E2a-Fragment in den *Spike-tips* enthalten im Vergleich zum den HBV core 1-184-Partikeln schlechter erkennt.

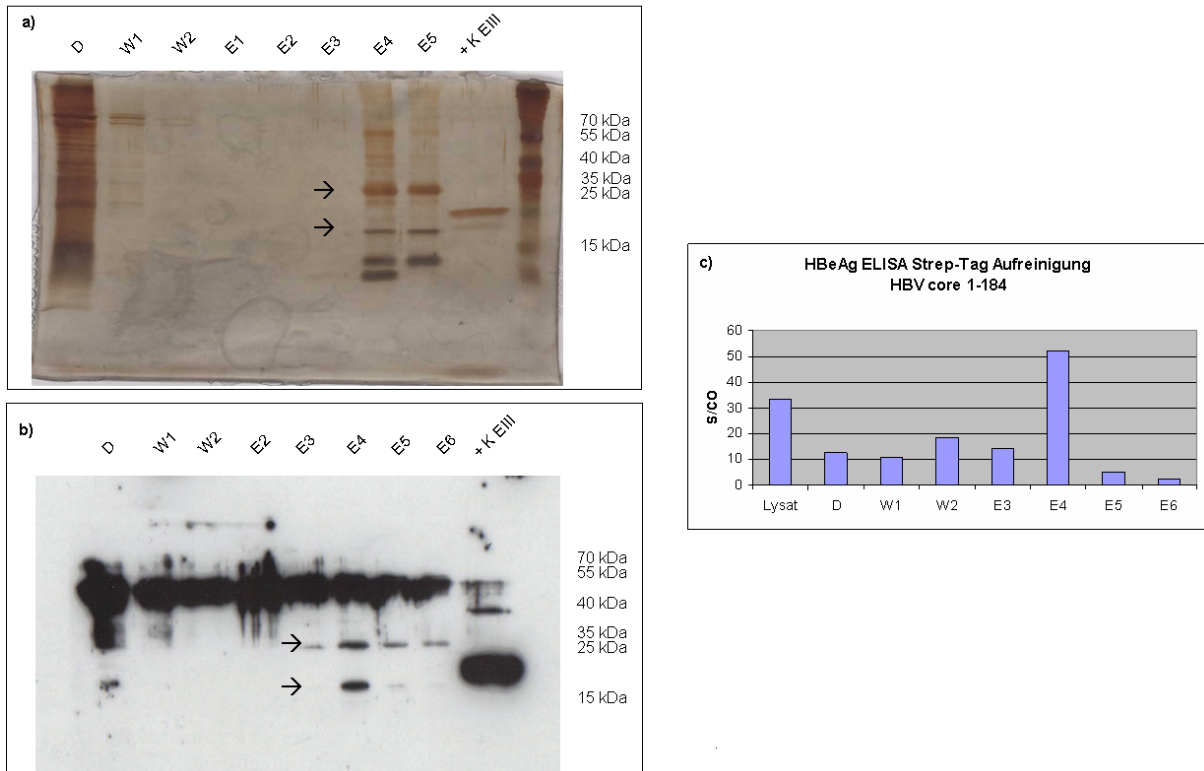
### **4.1.4 Proteinreinigung und -charakterisierung**

#### 4.1.4.1 Anreicherung des Fusionsproteins durch Strep-Tag

##### Affinitätschromatografie

Die verschiedenen Fusionsproteine wurden nach Herstellung der Lysate durch Affinitätschromatografie mit Hilfe von Streptactinsäulen (IBA, Göttingen) gemäß den Herstellerangaben gereinigt. Die Effektivität der Reinigung wurde durch SDS-PAGE und anschließendem Silbergel und Westerblot zur Identitätskontrolle bzw. durch HBeAg ELISA überprüft und dokumentiert.

Im Folgenden soll ein solcher Reinigungsprozess exemplarisch am HBV core 1-184-Fusionsprotein veranschaulicht werden:



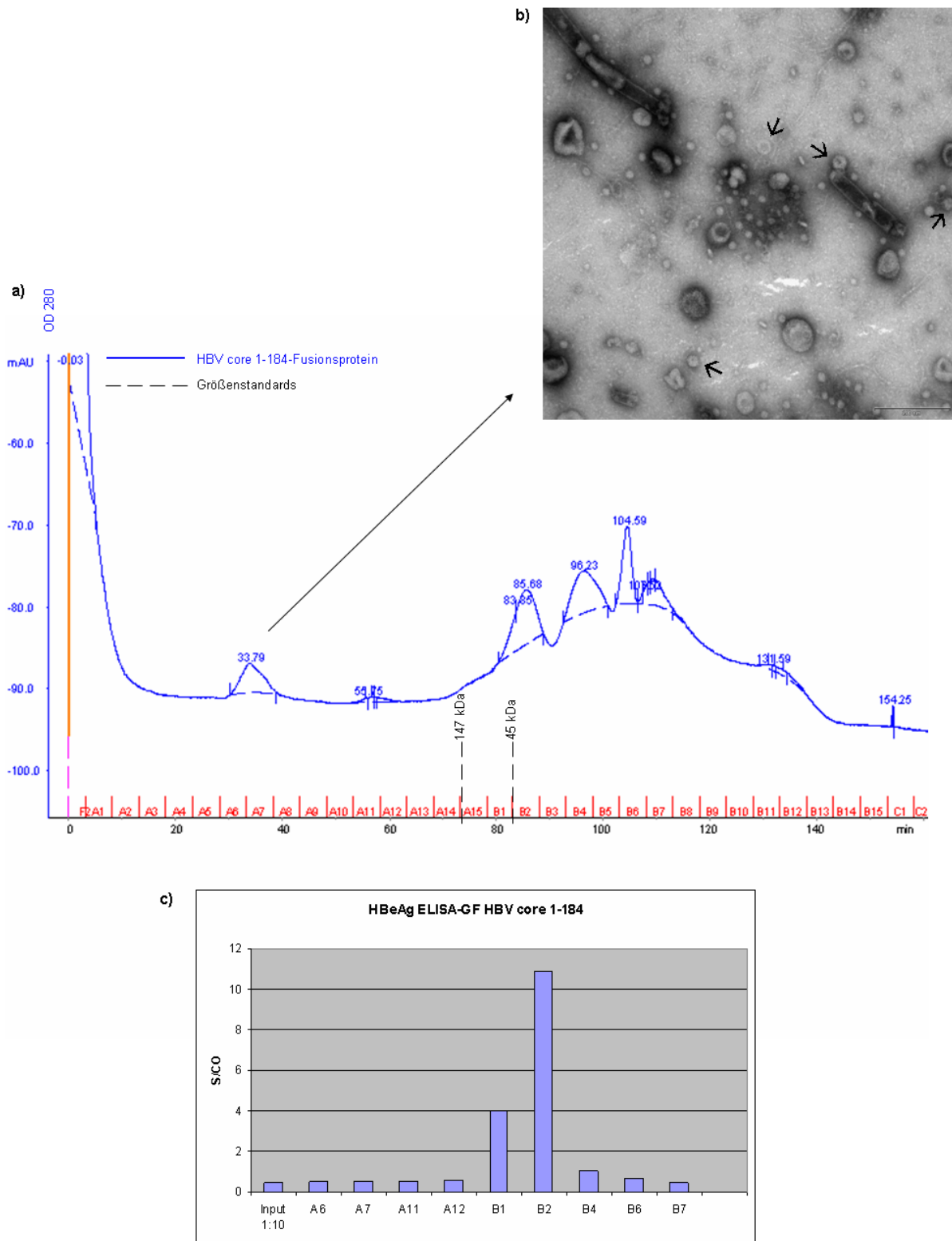
**Abb. 17 Strep-Tag Aufreinigung des HBV core 1-184-Fusionsproteins (ca. 27,5 kDa).**

**a.) Silbergelanalyse:** SDS-PAGE (14 %-Gel) mit anschließender Silberfärbung zur Kontrolle der Strep-Tag Reinigungseffizienz: Geladen wurde der Durchlauf (D), die Waschfraktionen (W) 1, 2 und 5 sowie die Eluatfraktionen (E) 1- 4. Als Positivkontrolle (+ K) wurde die Strep-Tag Eluatfraktion 3 eines bakteriell hergestellten und C-terminal gekürzten HBV core-Konstruktes (pet24a(+)<sup>2</sup>xTLM, Strep-Tag, leader, core 1-151, 6xHIS, ca. 24 kDa, K.Himmelsbach) geladen. **b.) Westernblotanalyse:** SDS-PAGE (14 %-Gel) und anschließender Westernblot zur Identitätskontrolle des angereicherten Proteins. Geladen wurde das Lysat, der Durchlauf (D), die Waschfraktionen (W) 1 und 2, die Eluatfraktionen (E) 2- 5 und die E III Positivkontrolle. Erstantikörper war Anti-HBcAg (Pierce, USA), 2. AK HRP-gekoppelter Anti-Kaninchen-IgG (GE Healthcare, GB). **c.) HBeAg ELISA-Analyse:** Das Balkendiagramm zeigt die Titer (in S/CO) für das Lysat, den Durchlauf (D), die Waschfraktion (W) 1 und 2, und die Eluatfraktion (E) 3 bis 6.

Das in **Abb. 17 a.)** dargestellte Silbergel zeigt, dass nach Reinigung des HBV core 1-184-Lysats mit Hilfe einer 1 ml Strep-Tag Affinitätschromatographiesäule (IBA, Göttingen) in den Fraktionen E4 und E5 mehrere Proteine in verschiedenen Größen angereichert werden konnten. Sowohl in E4 als auch in E5 sind deutliche Banden zu erkennen, die einer Proteingröße von knapp 20 und knapp 30 kDa entsprechen (schwarze Pfeile). Durch Westernblotanalyse (**Abb. 17 b.)**) konnte gezeigt werden, dass die verschieden großen angereicherte Proteine in den Fraktionen E4 und E5 einen HBc-Antigen spezifischen Antikörper binden (schwarze Pfeile), was den Schluss zulässt, dass es sich bei diesen Proteinen um das gewünschte HBV core 1-184-Fusionsprotein in verschiedener Oligomerisierung handelt. Der HBe-Antigen spezifische ELISA (**Abb. 17 c.)**) zeigt ebenfalls eine Anreicherung des HBV core-Fusionsproteins vor allem in der Fraktion E4, was ebenfalls auf eine erfolgreiche Aufreinigung des HBV core 1-184-Fusionsproteins hindeutet.

#### 4.1.4.2 Isolierung von assemblierten Kapsiden durch Gelfiltrationschromatografie

Um korrekt assemblierte rekombinante Kapside, von HBcAg-Mono- und Oligomeren zu trennen, wurde im Anschluss an die Strep-Tag Affinitätschromatografie die Eluatfraktionen 2 bis 6 mit einem Amicon-Konzentrator (Millipore, USA) mit einem MWCO von 30 kDa konzentriert. Anschließend wurde eine Gelfiltration mit einer Superose 6-Säule (Amersham, Freiburg) durchgeführt. Die Fraktionen A6 bis A8 wurden gepoolt und elektronenmikroskopisch untersucht. Zusätzlich wurde für verschiedene Fraktionen, für die ein *Peak* im Gelfiltrationsprofil vorhanden war, der HBeAg-Titer im ELISA gemessen.



**Abb. 18 Nachweis von korrekt assemblierten HBV core 1-184-Partikeln.**

**a.)** Gelfiltrationsprofil der konzentrierten HBV core 1-184-Strep-Tag Eluate 2 bis 6. Die x-Achse zeigt das Durchflussvolumen in ml, die y-Achse die mAU bei einer Absorption von 280 nm.

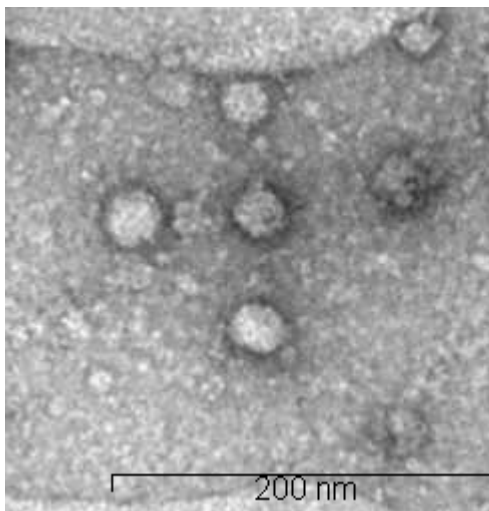
**b.)** Elektronenmikroskopischen Aufnahme der gepoolten Fraktionen A6 bis A8. Der Gröößenstandard beträgt 200 nm. Die Pfeile deuten auf korrekt assemblierten HBV core 1-184-Partikel.

**c.)** Balkendiagramm der HBe-Ag-Titer in S/CO für den 1:10 verdünnten Input, die Fraktionen A6, A7, A11 und A12 sowie die Fraktionen B1, B2, B4, B6 und B8 aus der Gelfiltration.

Mit Hilfe verschiedener Größenstandards (BSA 45 kDa, Aldolase 147 kDa und Dextranblau 2000 kDa) wurde zunächst ermittelt, dass das Ausschlussvolumen der Superose 6-Säule bei 6,2 ml liegt. Das Gelfiltrationsprofil in **Abb. 18 a.)** ließ somit vermuten, dass assemblierte HBV core 1-184-Partikel mit einem Gewicht von ca. 6700 kDa in den Fraktionen A6, A7 und A8 vorliegen, wobei die Proteinmenge, die einer Absorption von 5 mAU bei OD 280 entspricht, sehr gering war. In der in **Abb. 18 b.)** gezeigten elektronenmikroskopischen Aufnahme der gepoolten und mit einem Amicon-Konzentrator (Millipore, USA) mit einem MWCO von 30 kDa konzentrierten Fraktionen A6 bis A8 waren sphärische Partikel mit einer Größe von 30 bis 40 nm vorhanden (schwarze Pfeile), wodurch zwar bestätigt werden konnte, dass korrekt assemblierte Partikel vorhanden waren, die Ausbeute aber unbefriedigend war. Auch die HBe-Antigen ELISA-Titer in der Fraktionen A6 und A7 in **Abb. 18 c.)** waren sehr gering bzw. lagen im nichtreaktiven Bereich, was ebenfalls auf eine sehr geringe Partikelausbeute hindeutet, wobei beachtet werden muss, dass nicht sicher ist, inwieweit der HBe-Antigen-spezifische ELISA modifizierte assemblierte HBV core-Partikel erkennt.

Das Gelfiltrationsprofil (**Abb. 18 a.)**) zeigte nach einem Durchflussvolumen von etwa 15 ml weitere *Peaks*, die auch im HBeAg-ELISA (**Abb. 18 c.)**) eine Reaktivität zeigten und somit auf verschiedene Oligomerisationsformen des HBV core 1-184-Proteins hindeuten. Weiter wird deutlich, dass im Verhältnis wenige Partikel im Vergleich zu kleineren Oligo- bzw. Monomeren im Lysat vorhanden waren.

Neben den HBV core 1-184-Partikeln gelang im Sf9-Baculovirus-Expressionssystem ebenfalls die Generierung und strukturelle Charakterisierung korrekt assemblierter HBV core 1-184, E2a-Partikel.



**Abb. 19 Elektronenmikroskopische Aufnahme korrekt assemblierter HBV core 1-184, E2a-Kapside.**

Die HBV core 1-184, E2a-Kapside sind 30 bis 40 nm groß. Sie wurden rekombinant im Sf9-Baculovirus-Expressionssystem hergestellt und durch Strep-Tag Affinitätschromatografie und anschließende Gelfiltration isoliert. Der Größenstandard beträgt 200 nm.

Aufgrund der ineffizienten Partikelausbeute für sämtliche generierte Konstrukte im Sf9-Baculovirus-Expressionssystem wurde auf das *E. coli*-Expressionssystem umgestellt.

## 4.2 Generierung der HBc-VLP-Konstrukte im *E. coli*-Expressionssystem

### 4.2.1 Herstellung der *pet24d(+)*-Konstrukte

Zur Herstellung der HBc-VLP-Konstrukte im bakteriellen Expressionssystem wurde der Vektor *pet24a(+)* (Novagen, Darmstadt) verwendet.

Wie im *pBacPAK9*-Vektor kodiert die Sequenz N-terminal für das 2xTLM, den Strep-Tag sowie den Leader. Die sich anschließende Sequenz für das HBV core-Protein wurde C-terminal gekürzt, sodass ein HBV core-Protein mit 151 AS hergestellt wird. Durch die Verkürzung der argininreichen Region wird eine höhere Produktionsrate der Fusionsproteine im bakteriellen System erreicht (Birnbaum and Nassal 1990). C-terminal schließt sich wieder der 6xHIS-Tag an.

#### 4.2.1.1 2xTLM, Strep-Tag, leader, core 1-151, 6xHIS (HBV-core 1-151-Konstrukt)



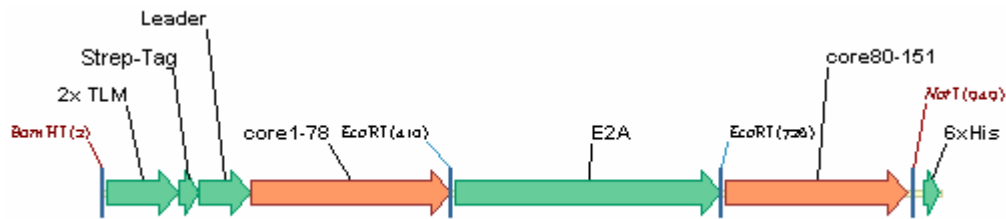
**Abb. 20** Schematische Darstellung der kodierenden Sequenz des Expressionskonstrukts *pet24d(+)* 2xTLM, Strep-Tag, leader, core 1-151, 6xHIS (HBV core 1-151-Konstrukt).

Die Sequenz des HBV core 1-151-Konstrukts hat eine Länge von 666 Basenpaare, was einer theoretischen Proteingröße von 24,4 kDa entspricht.

#### 4.2.1.2 2xTLM, Strep-Tag, leader, core 1-78, E2a, core 80-151, 6xHIS (HBV-core 1-151, E2a-Konstrukt)

Durch einen Restriktionsverdau mit *EcoRI* wurde das E2a-Fragment aus dem Vektor *pBacPAK9*, Strep-Tag, leader, HBV core 1-78, E2a, 79-184, 6xHIS ausgeschnitten und in den mit *EcoRI* linearisierten und dephosphorylierten HBV core 1.151-Vektor (2xTLM, Strep-Tag, leader, core 1-151, 6xHIS) inseriert.





**Abb. 21** Schematische Darstellung der kodierenden Sequenz des Expressionskonstruktes pet24d(+), 2xTLM, Strep-Tag, leader, core 1-78, E2A, core 80-151, 6xHIS (HBV core 1-151, E2a-Konstrukt).

Die Sequenz des E2a-Konstrukts ist 882 Bp lang und kodiert für ein etwa 36 kDa großes Protein.

## 4.2.2 Proteinsynthese – strukturelle Charakterisierung

### 4.2.2.1 Evaluierung der besten Konditionen zur Optimierung der Partikelausbeute

Um zu überprüfen unter welchen Bedingungen die beste Protein- bzw. Partikelausbeute für das HBV core 1-151- bzw. HBV core 1-151, E2a-Konstrukt erzielt werden kann und unter welchen Bedingungen das hergestellte Protein am besten löslich und korrekt gefaltet ist, wurden die *E. coli*-Stämme BL 21 (DE3) und Rosetta (DE3) bei verschiedenen Kultivierungsbedingungen (32°C und 37 °C) verglichen.

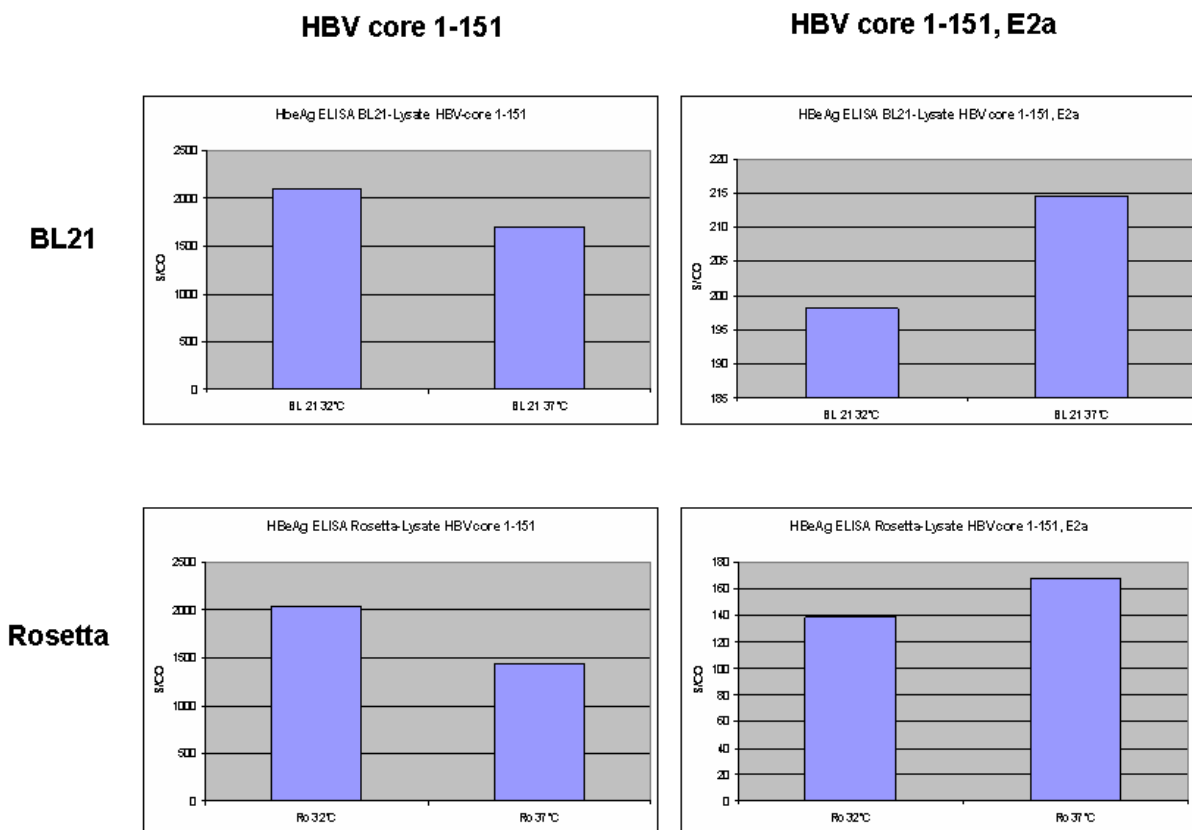
Dazu wurden die jeweiligen Kulturen 3 h nach Induktion abzentrifugiert und im Anschluss wurden Lysate hergestellt. Zudem wurden die Pellets, die die Zelltrümmer nach dem Lysieren enthielten, mit dem Ziel unlösliches Protein nachzuweisen, in denaturierendem Gua-Puffer in Lösung gebracht und im Anschluss gegen Puffer W mit einem Dialyseschlauch mit einem MWCO von 10000 Da (Spectrum Lab, USA) dialysiert.

Lysate und Dialysate wurden zunächst auf HBcAg untersucht und im Anschluss durch Strep-Tag Affinitätschromatografie gereinigt. Die Reinigung wurde jeweils wieder analysiert. Durch Gelfiltration und elektronenmikroskopische Untersuchungen wurde dann ermittelt, bei welchen Bedingungen der Gehalt an Partikeln am höchsten ist.



#### 4.2.2.1.1 Nachweis von HBV core 1-151- und HBV core 1-151, E2a-Fusionsproteinen in nativ hergestellten Zelllysaten

Um zu untersuchen, ob das jeweilige Fusionsprotein löslich oder unlöslich ist, wurden die wie in Kapitel Material und Methoden hergestellten Lysate durch Westernblotanalyse mit anti-HBV core-spezifischem Antikörper und mit HBe-Antigen-ELISA untersucht (hier repräsentatives Experiment gezeigt). Als Negativkontrolle dienten die vom Hersteller mitgelieferten Kontrollen.



**Abb. 22 Nachweis von HBV core 1-151- und HBV core 1-151, E2a- Fusionsproteinen in Lysaten mittels HBe-Antigen-ELISA.**

Die Säulendiagramme zeigen die jeweiligen ermittelten HBeAg-Werte für die HBV core 1-151- und HBV core 1-151, E2a- Fusionsproteine für BL21- und Rosetta-Lysate bei 32 und 37 °C.

In den HBV core 1-151-Lysaten ließ sich sowohl im Westernblot (hier nicht gezeigt) als auch im HBeAg ELISA (**Abb. 22**) das Vorhandensein eines HBV core-spezifischen Proteins nachweisen. Dabei unterschied sich die Proteinsynthese und -löslichkeit weder in den beiden unterschiedlichen *E. coli*-Stämmen, noch bei den verschiedenen Temperaturen besonders. Sowohl in BL21 als auch in Rosetta wurden bei 32 °C für das HBV core 1-151-Konstrukt HBeAg ELISA-Titer von ca 2000 S/CO erreicht. Für 37 °C wurden Titer von ca. 1700 (BL21) bzw. ca. 1500 S/CO (Rosetta) gemessen.

Für die HBV core 1-151, E2a-Lysate wurden bei 32 °C Titer von knapp 200 S/CO (BL 21) bzw. 140 S/CO (Rosetta) und bei 37 °C Titer von 215 S/CO (BL21) bzw. 170 S/CO (Rosetta) erreicht (**Abb. 22**).

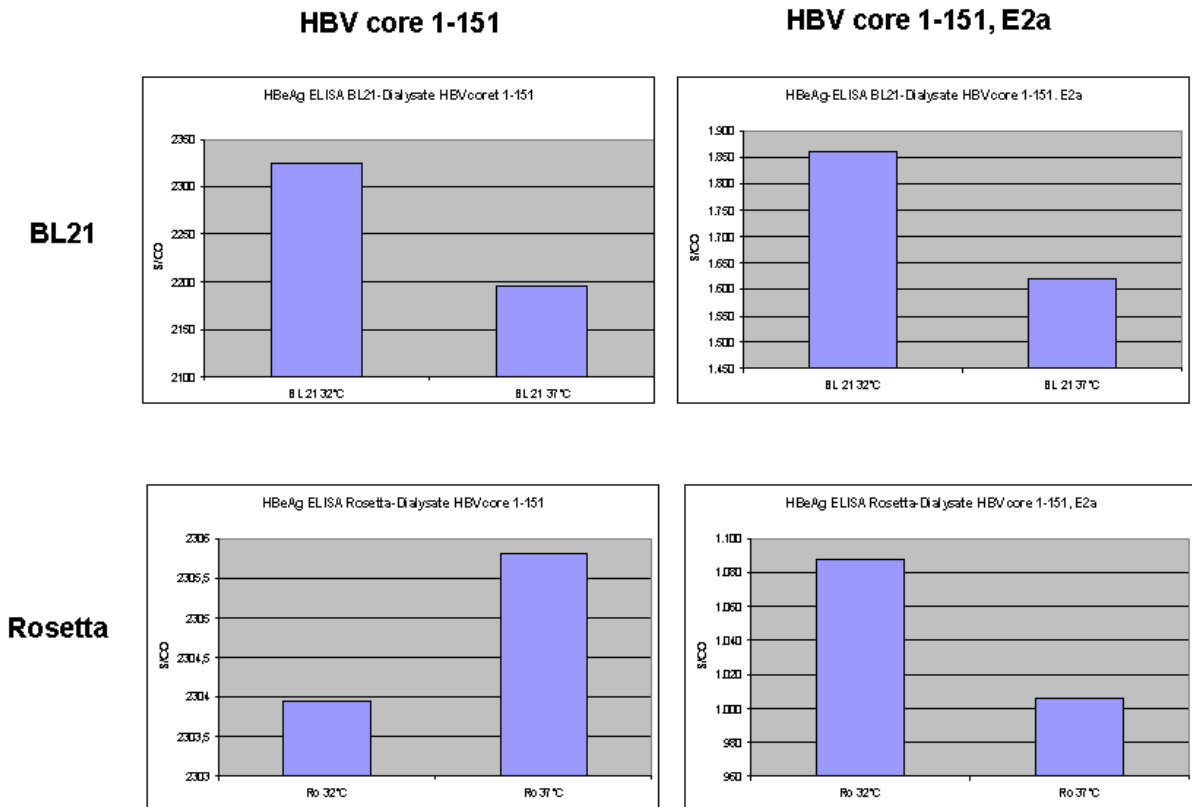
Aus den oben aufgezeigten Ergebnissen wird deutlich, dass im Falle des HBV core 1-151-Fusionsproteins dieses sowohl in BL21 als auch in Rosetta gut hergestellt wurde und zu einem erheblichen Teil löslich war. Die unterschiedlichen Temperaturen hatten keinen großen Einfluss auf die Ausbeute und das Löslichkeitsverhalten, wobei die ELISA-Titer jeweils für 32 °C leicht höher waren als für 37 °C.

Die Produktion des HBV core 1-151, E2a-Fusionsprotein wurde ebenfalls in beiden *E. coli*-Stämmen induziert. In den verschiedenen Lysaten waren die Titer der Induktionskulturen, die bei 37 °C inkubiert wurden, höher als bei einer Inkubationstemperatur von 32 °C. Des Weiteren zeigten sich in BL21-Lysaten leicht höhere Titer als in Rosetta-Lysaten. Allerdings betragen die Titer für HBV core 1-151, E2a jeweils nur etwa 1/10 der HBV core 1-151-Titer, was darauf hindeutet, dass das HBV core 1-151, E2a-Fusionsprotein weniger gut gebildet wurde oder aber zu einem größeren Anteil unlöslich ist bzw. in inclusion bodies aggregiert vorlag. Zudem stellt sich auch hier die Frage, wie gut der HBe-Antigen-ELISA HBe-Fusionsproteine mit dem E2a-Fragment in den *Spike-tips* erkennt.

#### **4.2.2.1.2 Nachweis von HBV core 1-151- und HBV core 1-151, E2a-Fusionsproteinen in denaturierend hergestellten Dialysaten**

Um evtl. unlösliches Protein nachzuweisen, wurden zudem die jeweiligen Pellets von den Lysaten in 4xSDS Probenpuffer gelöst, bevor ebenfalls eine SDS-PAGE mit anschließender Westernblotanalyse mit den oben beschriebenen Antikörpern durchgeführt wurde. Auch hier konnten sowohl für das HBV core 1-151- als auch für das HBV core 1-151, E2a-Konstrukt jeweils spezifische Proteinbanden nachgewiesen werden.

Um nun den nicht löslichen Proteinanteil in Lösung zu bringen wurden die Pellets in denaturierendem Gua-Puffer gelöst und im Anschluss gegen Puffer W mit einem Dialyseschlauch mit einem MWCO von 10000 Da (Spectrum Lab, USA) dialysiert. Die verschiedenen Dialysate wurden nun ebenfalls mittels Westernblot und HBe-Antigen-ELISA analysiert.



**Abb. 23** Nachweis von HBV core 1-151- und HBV core 1-151, E2a- Fusionsproteinen in Dialysaten nach Denaturierung mittels HBe-Antigen-ELISA.

Die Säulendiagramme zeigen die jeweiligen ermittelten HBeAg-Werte für die HBV core 1-151- und HBV core 1-151, E2a- Fusionsproteine für BL21- und Rosetta -Dialysate bei 32 und 37 °C.

In allen Fällen war im Westernblot (hier nicht gezeigt) eine HBe-spezifische Proteinbande mit der jeweils entsprechenden Größe feststellbar. Auch im HBeAg ELISA wurden im Falle des HBV core 1-151-Fusionsproteins unter allen Bedingungen Titer zwischen 2200 und 2300 S/CO erreicht (**Abb. 23**).

Für das HBV core 1-151, E2a-Konstrukt wurden für BL21-Dialysate Titer bis 1850 S/CO (32 °C) und für Rosetta-Dialysate Titer bis 1090 S/CO (32 °C) gemessen (**Abb. 23**).

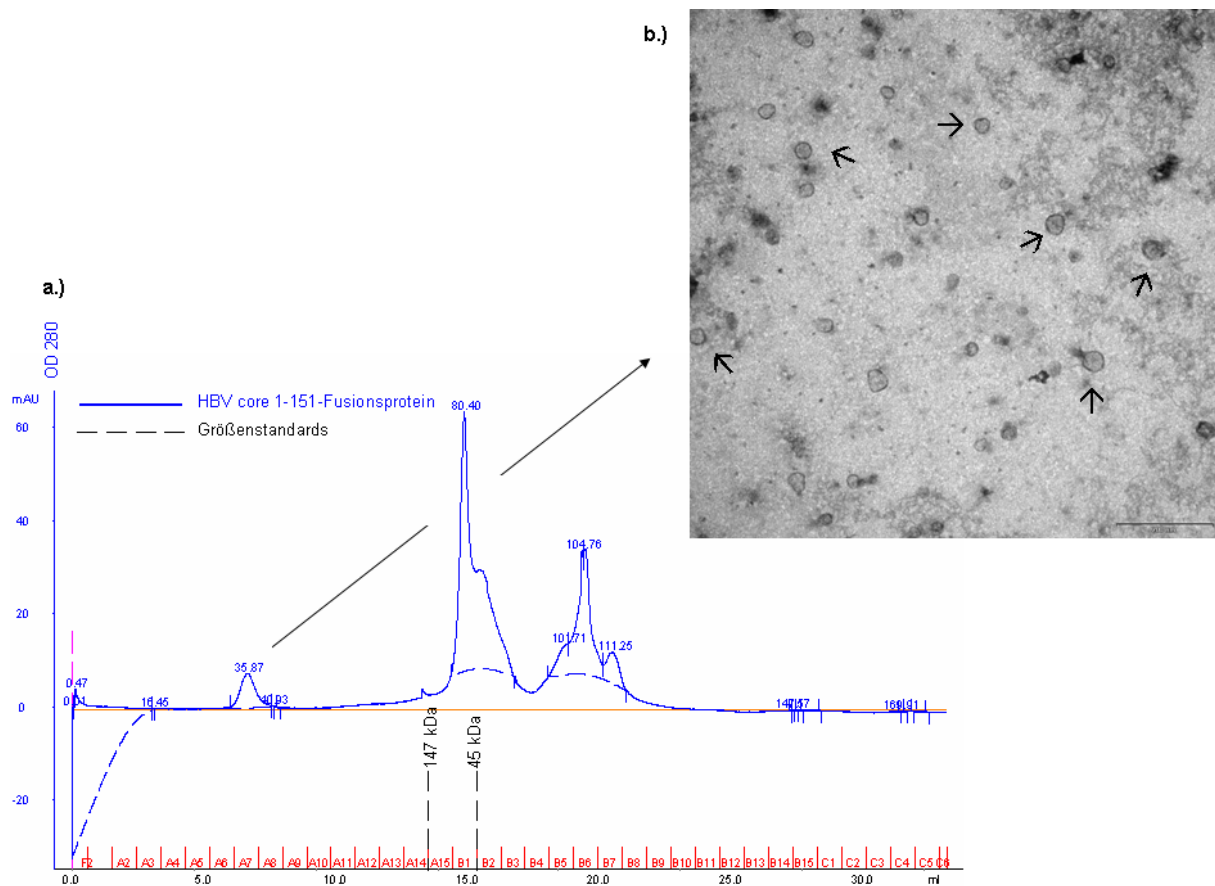
Daraus ergibt sich, dass für beide Konstrukte, insbesondere für das HBV core 1-151, E2a-Konstrukt, bei dem die gemessenen ELISA-Titer in den Dialysaten um einen Faktor von 5 bis 10 höher lagen als bei den untersuchten Lysaten (**Abb. 22**), ein erheblicher Proteinanteil nicht löslich war. Auch bedacht werden muss, dass evtl. die Bakterienzellen nicht effizient durch die Ultraschallbehandlung lysiert wurden, was ein Freisetzen der Proteine verhindert haben könnte.

#### **4.2.2.1.3 Beste Partikelausbeute in Rosetta-Lysat bei 37 °C**

Nachdem nun nachgewiesen wurde, dass sowohl die Lysate als auch die Dialysate unter allen verschiedenen Bedingungen das jeweilige Fusionsprotein enthielten, wurden diese zunächst durch Strep-Tag Affinitätschromatografie separat gereinigt, bevor jeweils die Reinigungseffizienz durch SDS-PAGE und Silbergel sowie durch Westernblot analysiert wurde. In allen Fällen konnte ein spezifisches Signal in guter Reinheit in den erwarteten Eluatfraktionen nachgewiesen werden (hier nicht gezeigt).

Es stellte sich nun die Frage unter welchen Bedingungen am besten korrekt assemblierte Kapside ausgebildet wurden. Um dieses zu analysieren wurden die Strep-Tag Eluatfraktionen 2 bis 6 im Anschluss gepoolt und mit einem Amicon-Konzentrator (Millipore, USA) mit einem MWCO von 30 kDa konzentriert. Das jeweilige Konzentrat wurde dann auf eine Superose 6-Gelfiltrationssäule (Amersham, Freiburg) geladen. Die Fraktionen A6 bis A8, in denen auf Grund des Ausschlussvolumens von 6,2 ml der Superose 6-Säule evtl. vorhandene Partikel zu erwarten waren, wurden gepoolt und mit einem Amicon-Konzentrator (Millipore, USA) mit einem MWCO von 30 kDa ankonzentriert. Um das Vorhandensein von Partikeln nachzuweisen wurden die Proben elektronenmikroskopisch untersucht.

Um am Beispiel des HBV core 1-151-Fusionsproteins darzustellen, welchen Einfluss die Denaturierung durch den Gua-Puffer auf die Partikelausbeute hat, werden im Folgenden die Gelfiltrationsprofile und die elektronenmikroskopischen Aufnahmen für das HBV core 1-151-Lysat aus Rosetta-Induktionskulturen mit einer Temperatur von 37 °C im Vergleich zum HBV core 1-151-Dialysat aus Rosetta-Induktionskulturen mit einer Temperatur von 37 °C exemplarisch für alle durchgeführten Analysen dargestellt:

**HBV core 1-151 Rosetta-Lysat 37 °C (unter nativen Bedingungen hergestellt):**


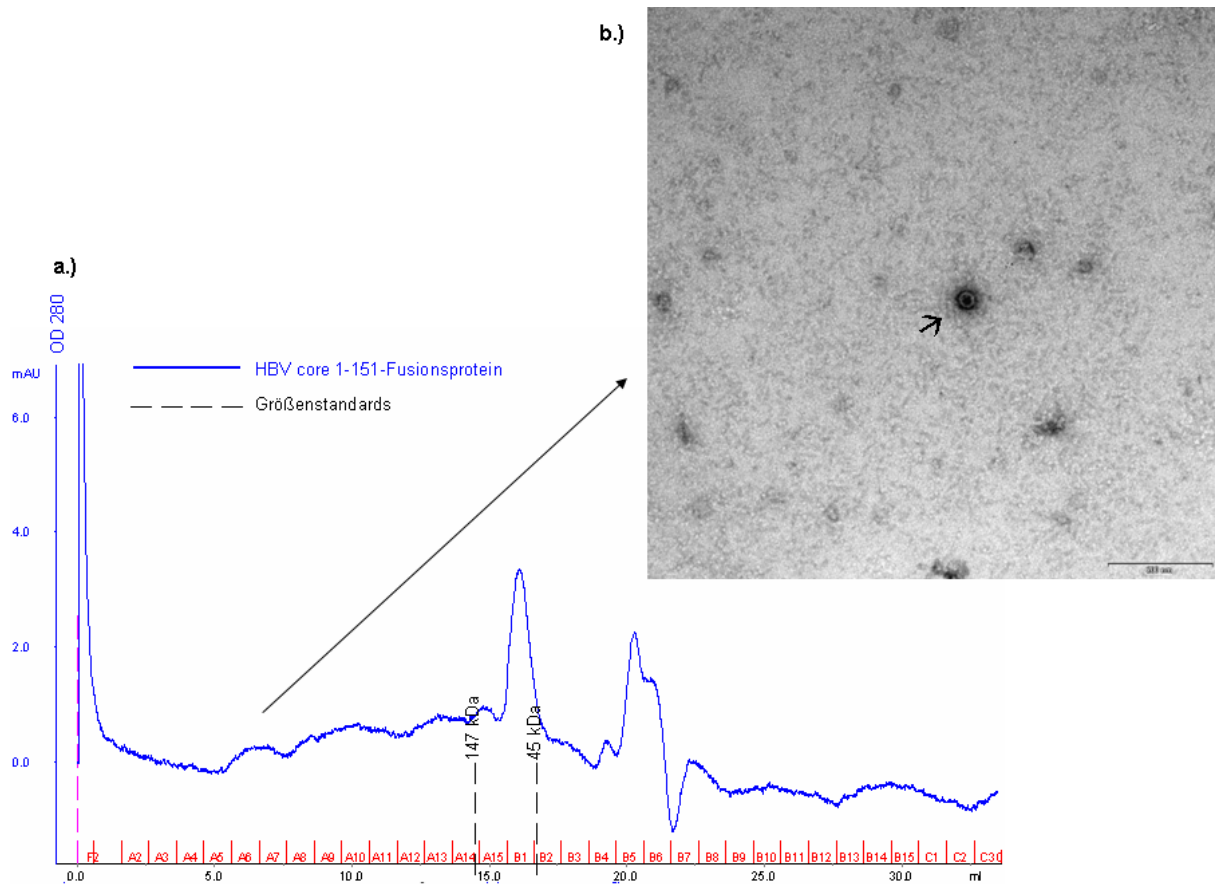
**Abb. 24 HBV core 1-151-Partikel ausbeute in Rosetta-Lysat bei einer Wachstumstemperatur von 37 °C.**

**a.)** Gelfiltrationselutionsprofil der gepoolten und konzentrierten HBV core 1-151-Strep-Tag Eluate 2 bis 6. Die x-Achse zeigt das Durchflussvolumen in ml, die y-Achse die mAU bei einer Absorption von 280 nm.  
**b.)** Elektronenmikroskopische Aufnahme der gepoolten Fraktionen A6 bis A8 mit korrekt assemblierten Partikeln (Pfeile). Der eingezeichnete Größenstandard beträgt 200 nm.

Im Gelfiltrationsprofil (**Abb. 24 a.)**) ist nach Durchfluss von 6,2 ml, was dem Ausschlussvolumen der Superose 6-Säule entspricht, ein *Peak* von ca. 8 mAU bei OD 280 nm bei den Fraktionen A6 bis A8 zu sehen. Nach einem Durchflussvolumen von etwa 14 bis 22 ml gibt es weitere *Peaks* bis 60 mAU. Die verschiedenen *Peaks* sind mit großer Wahrscheinlichkeit unterschiedliche Oligomerisationsformen der generierten HBc-Ag-Fusionsproteine.

In der elektronenmikroskopischen Aufnahme (**Abb. 24 b.)**) sind deutlich 30 bis 40 nm große sphärische Partikel zu erkennen, die korrekt assembliert sind (schwarze Pfeile).

## HBV core 1-151 Rosetta-Dialysat 37 °C (unter denaturierenden Bedingungen hergestellt):



**Abb. 25** HBV core 1-151-Partikel aus Rosetta-Dialysat bei einer Wachstumstemperatur von 37 °C.

**a.)** Gelfiltrationselutionsprofil der gepoolten und konzentrierten HBV core 1-151-Strep-Tag Eluate 2 bis 6. Die x-Achse zeigt das Durchflussvolumen in ml, die y-Achse die mAU bei einer Absorption von 280 nm. **b.)** Elektronenmikroskopische Aufnahme der gepoolten Fraktionen A6 bis A8 mit korrekt assembliertem Partikel (Pfeil). Der eingezeichnete Größenstandard beträgt 200 nm.

Aus dem Gelfiltrationsprofil (**Abb. 25 a.)** geht hervor, dass nur ein minimaler Anstieg der Absorption bei OD 280 bei den Fraktionen A6 bis A8 vorhanden ist. Die Absorptionskurve steigt bis zu einem Durchflussvolumen von ca. 16 ml kontinuierlich leicht an, bis sich verschiedene *Peaks* bei einem Volumen von 16 bis 23 ml ergeben.

Der Verlauf der Kurve deutet darauf hin, dass sich die Proteine in verschiedenen unspezifischen Aggregaten zusammengefügt haben und deshalb nicht als scharfe *Peaks* von der Säule eluiert werden. Weiterhin sieht man in der elektronenmikroskopischen Aufnahme (**Abb. 25 b.)**), dass zwar korrekt assemblierte Partikel vorhanden sind (schwarzer Pfeil), die Menge aber sehr gering ist.

Vergleicht man die beiden Gelfiltrationsprofile und die elektronenmikroskopischen Aufnahmen in **Abb. 24** und **Abb. 25**, so wird deutlich, dass die Ausbeute an korrekt assemblierten Partikeln in den Lysaten wesentlich höher war, als in den Dialysaten. Ein

Grund hierfür ist, dass die Lysate unter nativen Bedingungen hergestellt worden waren, während bei den Dialysaten sämtliche Proteine zunächst durch den Gua-Puffer denaturiert wurden.

Im Wesentlichen sind die oben aufgezeigten Ergebnisse repräsentativ für die zur Evaluierung der Besten Konditionen durchgeführten Untersuchungen.

Sowohl für das HBV core 1-151- als auch für das HBV core 1-151, E2a-Konstrukt konnte gezeigt werden, dass es möglich war korrekt assemblierte Partikel zu generieren, die die jeweiligen Modifikationen enthielten.

Anhand des Gelfiltrationsprofils und der elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde für beide Konstrukte die beste Partikelausbeute in Lysaten aus Rosetta-Induktionskulturen bei einer Wachstumstemperatur von 37 °C erzielt, so dass für sämtliche folgende Experimente die Proteinherstellung in Rosetta-induktionskulturen bei 37 °C durchgeführt wurde.

### 4.2.2.2 Proteinsynthese und Nachweis der Proteinsynthese

Nach jeder Induktion und vor weiteren Experimenten erfolgte eine Analyse der Lysate aus Rosetta-Induktionskulturen (37 °C) zum Nachweis der Proteinsynthese sowohl für das HBV core 1-151- als auch für das HBV core 1-151, E2a-Fusionsprotein durch Westernblot und HBeAg ELISA.

Für das HBV core 1-151- und für das HBV core 1-151, E2a-Konstrukt konnte stets die Synthese des jeweiligen Proteins nachgewiesen werden.

### 4.2.3 Proteinreinigung unter nativen Bedingungen

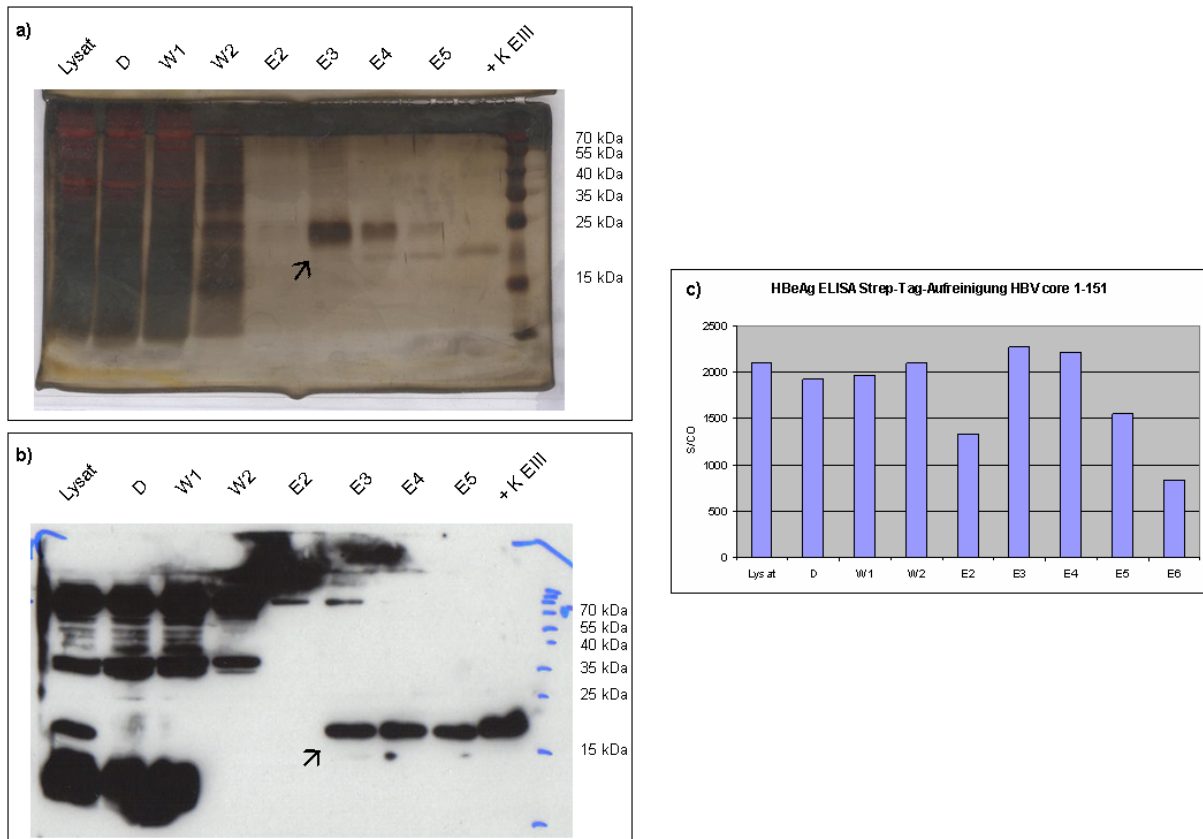
#### 4.2.3.1 Anreicherung des Fusionsproteins durch Strep-Tag

##### Affinitätschromatografie

Um die generierten HBV core 1-151- bzw. HBV core 1-151, E2a-Fusionsproteine aus den jeweiligen Lysaten zu isolieren, wurden diese, wie gezeigt, durch Strep-Tag Affinitätschromatografie gereinigt. Die Reinigungsschritte wurden jeweils durch SDS-PAGE mit anschließendem Silbergel zur Kontrolle der Reinigungseffizienz analysiert. Zur Identitätskontrolle wurden zusätzlich Westernblot- sowie HBeAg ELISA-Analysen durchgeführt.

Die in den Proben enthaltenen Proteine wurden für die SDS-PAGE in 4x SDS-Puffer mit anschließendem 10minütigen Kochen zum größten Teil denaturiert, wobei nicht abschließend geklärt ist, wie stabil die assemblierten Kapside sind. Die HBeAg ELISA-Titerbestimmung erfolgte unter nativen Bedingungen.

#### 4.2.3.1.1 Strep-Tag Reinigung des HBV core 1-151-Fusionsproteins



**Abb. 26 Strep-Tag Aufreinigung des HBV core 1-151-Fusionsprotein (ca. 24 kDa).**

**a.) Silbergelanalyse:** SDS-PAGE (14 %-Gel) mit anschließender Silberfärbung zur Kontrolle der Strep-Tag Reinigungseffizienz: Geladen wurde das Lysat, der Durchlauf (D), die Waschfraktionen (W) 1 und 2 sowie die Eluatfraktionen (E) 2 bis 5. Als Positivkontrolle (+ K) wurde die Strep-Tag Eluatfraktion 3 eines bakteriell hergestellten und C-terminal gekürzten HBV core-Konstrukts (pet24a(+)<sub>2xTLM</sub>, Strep-Tag, leader, core 1-151, 6xHIS, ca. 24 kDa, K. Himmelsbach) geladen.

**b.) Westernblotanalyse:** SDS-PAGE (14 %-Gel) und anschließender Westernblot zur Identitätskontrolle des angereicherten Proteins. Geladen wurde das Lysat, der Durchlauf (D), die Waschfraktionen (W) 1 und 2, die Eluatfraktionen (E) 2 bis 5 und die E III Positivkontrolle (s.o.). 1. AK: Kaninchen-Serum Anti-2xTLM, HBV core, 2. AK: HRP-gekoppelten Anti-Kaninchen-IgG (GE Healthcare, GB). **c.) HBeAg ELISA-Analyse:** Das Balkendiagramm zeigt die Titer (in S/CO) für das Lysat, den Durchlauf (D), die Waschfraktion (W) 1 und 2, und die Eluatfraktion (E) 3 bis 6.

Im Silbergel in **Abb. 26 a.)** ist in den Fraktionen E3 bis E5 eine deutliche Proteinbande von ca. 24 kDa zu sehen, die der theoretischen Größe des erwarteten HBV core 1-151-Monomers entspricht (schwarzer Pfeil). Weiterhin wird deutlich, dass das isolierte Protein in relativ reiner Form vorliegt.

Der in **Abb. 26 b.)** gezeigte Westernblot bestätigt, dass es sich bei dem isolierten Protein um das HBV core 1-151-Fusionsprotein handelt (schwarzer Pfeil).

Da die Proteinbande in E3 bis E5 bei ca. 24 kDa weder im Durchlauf noch in den Waschfraktionen zu sehen war, liegt der Schluss nahe, dass dieses ca. 24 kDa große modifizierte HBV core-Protein sehr effizient an das in der Strep-Tag Säule (Iba, Göttingen) vorhandene Material Streptactin gebunden wurde.



Betrachtet man im Westernblot (**Abb. 26 b.**) die 3. Eluatfraktion so ist eine weitere Proteinbande zwischen 130 und 170 kDa sichtbar. Proteinbanden auf der gleichen Höhe sind im Lysat, im Durchlauf und in den Waschfraktionen zu sehen, wobei hier die Signale wesentlich stärker sind. Aufgrund der Reaktion mit dem anti-HBV core-spezifischen Antikörper ist davon auszugehen, dass es sich bei diesen Banden trotz Kochen in denaturierendem 4xSDS-Puffer um eine größere Oligomerisationsform des HBV core 1-151-Fusionsproteins handelt.

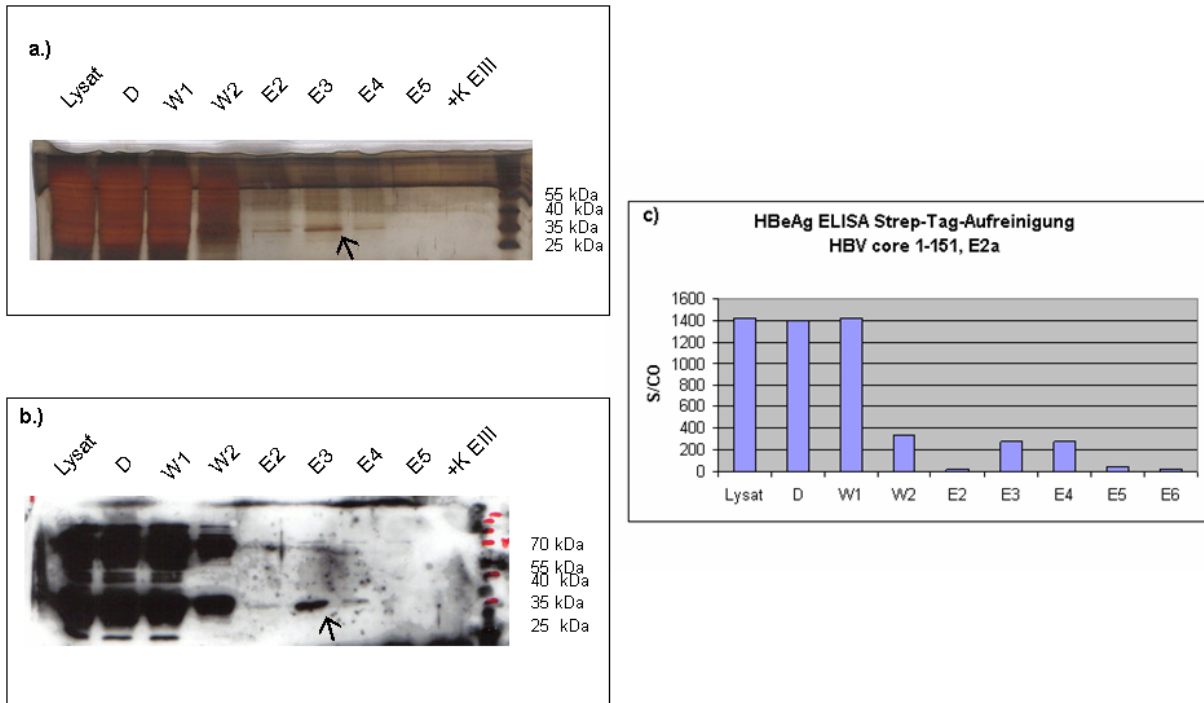
Im Westernblot sind v.a. im Lysat, im Durchlauf und in den Waschfraktionen noch weitere Proteine nachweisbar, die spezifisch mit dem eingesetzten Antikörper reagieren, allerdings nicht in den Eluatfraktionen auftauchen.

Ob durch das Kochen in 4xSDS-Puffer assemblierte HBV core 1-151-Partikel komplett zerlegt werden oder aber so stabil sind, dass sie nicht komplett denaturiert werden wird später diskutiert, ebenso wie die Frage, ob das in den Strep-Tag Säulen (Iba, Göttingen) vorhandene Streptactin besser kleinere Oligomerisationsformen des HBV core 1-151-Fusionsproteins bindet als größere, insbesondere als korrekt assemblierte Partikel.

Das Balkendiagramm in **Abb. 26 c.**) macht deutlich, dass das hergestellte Lysat mit einem Titer von über 2000 S/CO stark reaktiv ist. Auffällig ist, dass der Durchlauf und die Waschfraktionen mit einem Titer von je ca. 2000 S/CO ebenfalls einen großen Proteingehalt aufweisen, der im ELISA wie das HBe-Antigen reagiert, aber nicht an das Material in den Strep-Tag Säulen (Iba, Göttingen) bindet. Trotzdem sind die Titer in den Eluatfraktionen 3 und 4 mit je etwa 2250 S/CO am höchsten.

Aus den oben aufgezeigten Ergebnissen wird deutlich, dass es möglich war das generierte HBV core 1-151-Fusionsprotein durch Strep-Tag Affinitätschromatografie in relativ hoher Konzentration und guter Reinheit zu isolieren.

#### 4.2.3.1.2 Strep-Tag Reinigung des HBV core 1-151, E2a Fusionsproteins



**Abb. 27 Strep-Tag Reinigung des HBV core 1-151, E2a-Fusionsproteins (ca. 36 kDa).**

**a.) Silbergelanalyse:** SDS-PAGE (14 %-Gel) mit anschließender Silberfärbung zur Kontrolle der Strep-Tag Reinigungseffizienz: Geladen wurde das Lysat, der Durchlauf (D), die Waschfraktionen (W) 1 und 2 sowie die Eluatfraktionen (E) 2 bis 5. Als Positivkontrolle (+ K) wurde die 3. Strep-Tag Eluatfraktion eines bakteriell hergestellten und C-terminal gekürzten Wt-Konstrukts (pet24a(+) 2xTLM, Strep-Tag, leader, core 1-151, 6xHIS, ca. 24 kDa, Himmelsbach et al.) geladen.

**b.) Westernblotanalyse:** SDS-PAGE (14 %-Gel) und anschließender Westernblot zur Identitätskontrolle des angereicherten Proteins. Geladen wurde das Lysat, der Durchlauf (D), die Waschfraktionen (W) 1 und 2, die Eluatfraktionen (E) 2 bis 5 und die E III Positivkontrolle (s.o.). 1. AK: Kaninchen-Serum Anti-2xTLM, HBV core, 2. AK: HRP-gekoppelten Anti-Kaninchen-IgG (GE Healthcare, Freiburg). **c.) HBsAg ELISA-Analyse:** Das Balkendiagramm zeigt die Titer (in S/CO) für das Lysat, den Durchlauf (D), die Waschfraktion (W) 1 und 2, und die Eluatfraktion (E) 3 bis 6.

Im Silbergel in **Abb. 27 a.)** ist in den Eluatfraktionen E3 und E4 eine deutliche Proteinbande bei ca. 36 kDa zu sehen (schwarzer Pfeil), wobei die Eluatfraktionen nur gering mit weiteren Proteinen verunreinigt waren. Der Westernblot in **Abb. 27 b.)** bestätigte, dass es sich bei dieser Proteinbande um ein mit dem Anti-2xTLM, HBV core-Kaninchenserum reagierendes Protein gehandelt hat (schwarzer Pfeil). Auch in diesem Fall sind entsprechende stärkere Banden im Lysat und in den Fraktionen D, W1 und W2 vorhanden, was annehmen lässt, dass das mit dem E2a-modifizierte Fusionsprotein relativ schlecht an das Streptactin bindet. Dies lässt sich auch aus der in **Abb. 27 c.)** dargestellten ELISA-Analyse ableiten, in dem für das Lysat ein Titer von ca. 1400 S/CO gemessen wurde. Insbesondere im Durchlauf und in der 1. Waschfraktion wurden annähernd ebenso hohe Titer gemessen, wodurch sich erneut die Frage ergibt, ob einerseits das in die *Spike-tips* inserierte E2a und andererseits die

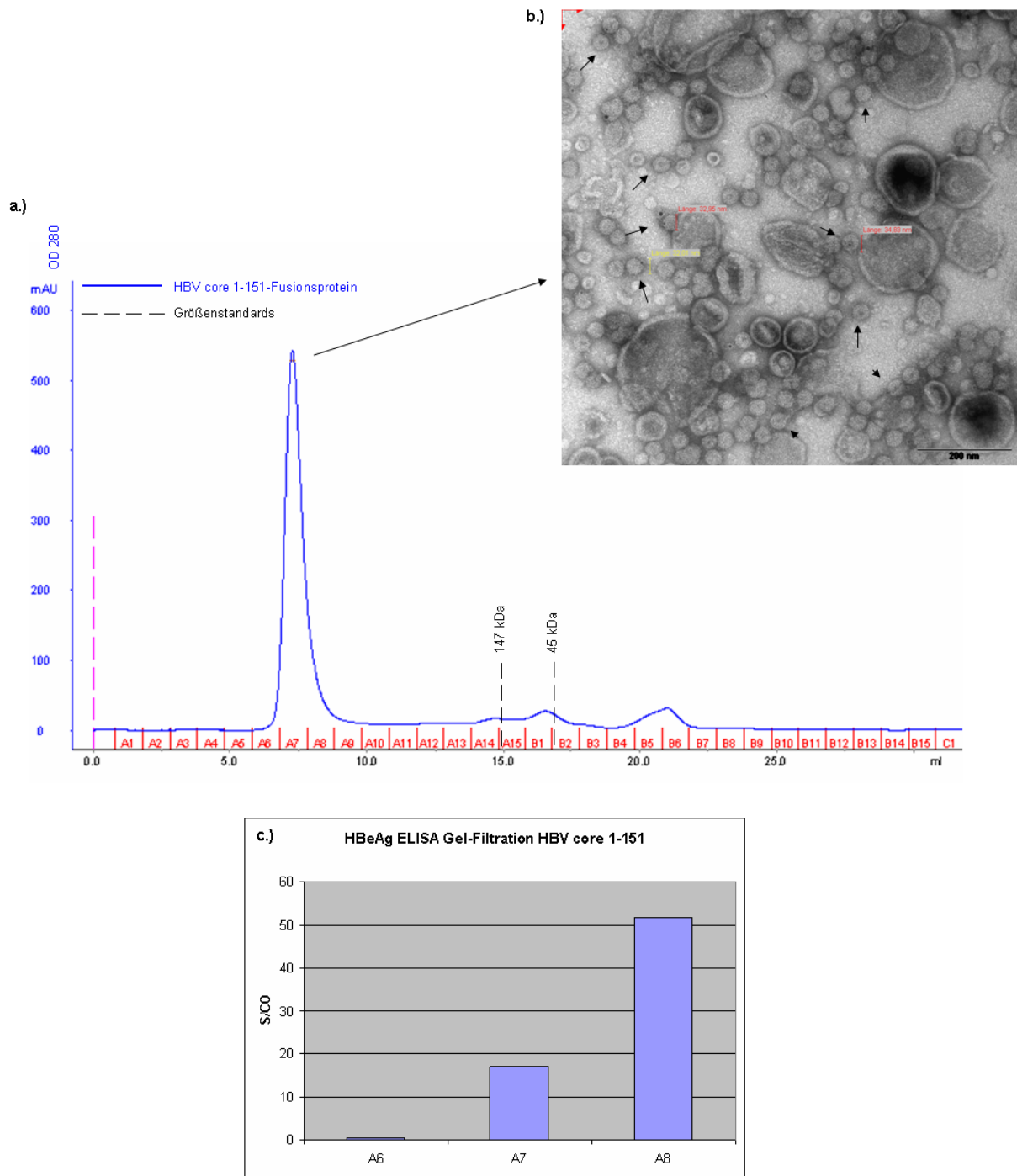
Oligomerisationsform die Bindungsverhalten an die Säule beeinflusst. In den Fraktionen E3 und E4 wurden jeweils Titer von ca. 300 S/CO gemessen.

Die Ergebnisse zeigen, dass es möglich war E2a-Fusionsproteine in guter Reinheit zu isolieren.

### 4.2.3.2 Isolierung und Charakterisierung von assemblierten Kapsiden durch Gelfiltrationschromatografie

Die Eluatfraktionen 2 bis 6 aus der Strep-Tag Affinitätschromatografie wurden jeweils für das HBV core 1-151- und für das HBV core 1-151, E2a-Fusionsprotein gepoolt und mit einem Amicon-Konzentrator (Millipore, USA) mit einem MWCO von 30 kDa konzentriert. Im Anschluss wurde eine Gelfiltration mit einer Superose 6-Säule (Amersham, Freiburg) durchgeführt, um korrekt assemblierte rekombinante Kapside von HBcAg-Mono- und Oligomeren zu trennen. Die Fraktionen, in denen Partikel erwartet wurden, wurden gepoolt, ankonzentriert und zum Nachweis elektronenmikroskopisch untersucht. Zusätzlich wurde eine HBeAg ELISA-Titerbestimmung durchgeführt.

### 4.2.3.2.1 Nachweis von HBV core 1-151-Partikeln



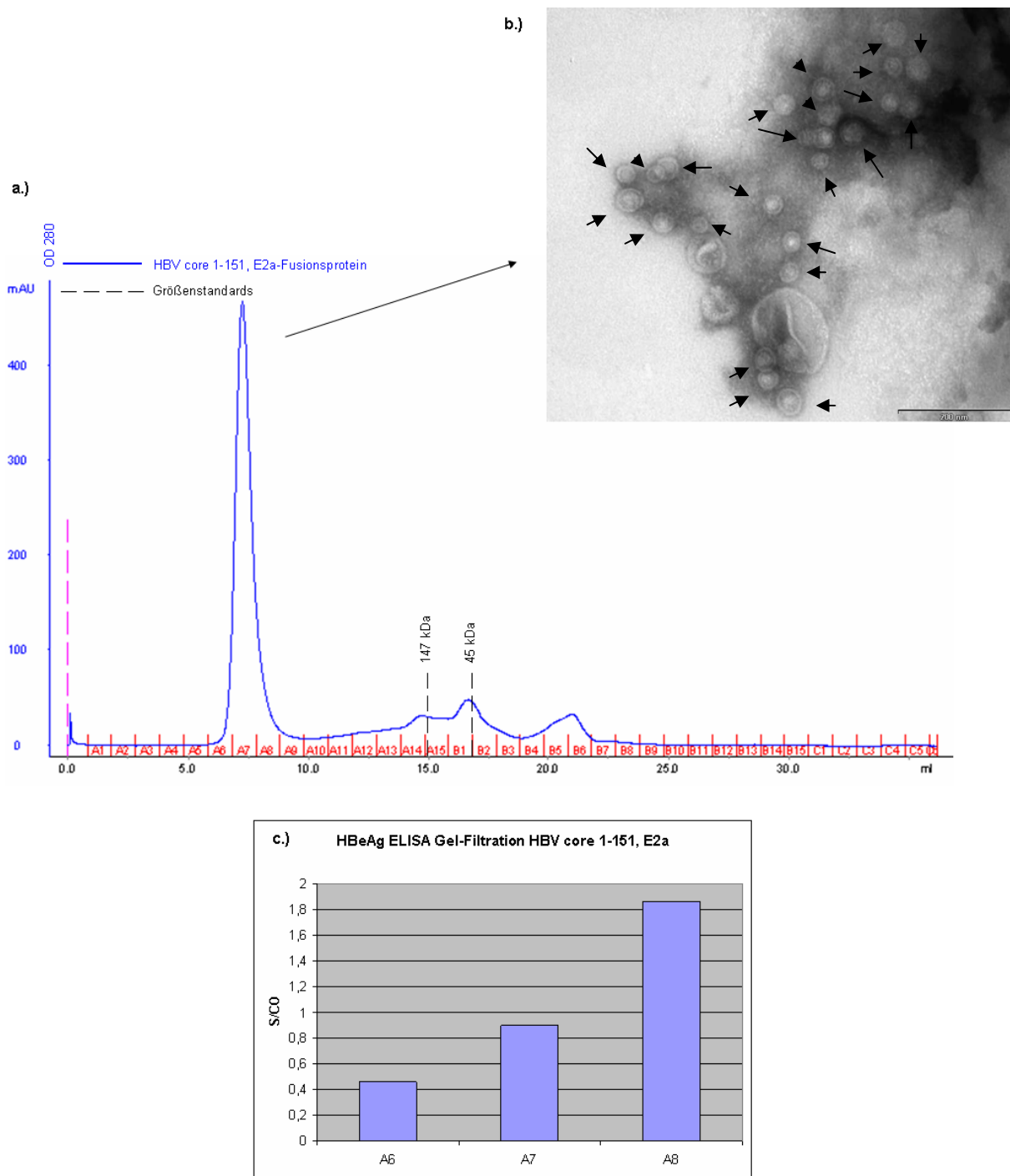
**Abb. 28 Nachweis korrekt assemblierter HBV core 1-151-Partikel.**

**a.)** Gelfiltrationselutionsprofil der konzentrierten HBV core 1-151-Strep-Tag Eluate 2 bis 6. Die x-Achse zeigt das Durchflussvolumen in ml, die y-Achse die mAU bei einer Absorption von 280 nm.

**b.)** Elektronenmikroskopische Aufnahme der gepoolten und ankonzentrierten Fraktionen A6 bis A8 mit 30 bis 40 nm großen sphärischen Partikeln. Der Größenstandard beträgt 200 nm. **c.)** HBeAg ELISA-Balkendiagramm mit den jeweiligen HBeAg-Titern in S/CO für die Fraktionen A6, A7 und A8 aus der Gelfiltration.

Im Gelfiltrationsprofil in **Abb. 28 a.)** ist nach Durchfluss des Säulenausschlussvolumens ein scharfer *Peak* von ca. 600 mAU bei OD 280 nm zu sehen, in dem die erwarteten korrekt assemblierten HBV core 1-151-Partikel elektronenmikroskopisch nachgewiesen wurden (**Abb. 28 b.)**(schwarze Pfeile). Weiterhin fällt auf, dass im hinteren Bereich der Kurve in **Abb. 28 a.)** nur noch kleine *Peaks* von höchstens 10 bis 20 mAU folgen, was annehmen lässt, dass ein Großteil der durch Strep-Tag Affinitätschromatografie isolierten HBV core 1-151-Fusionsproteine als korrekt assemblierte Partikel bzw. in größeren Aggregaten vorliegt. Die in **Abb. 28 c.)** im Säulendiagramm dargestellten ELISA-Titer lagen in den Fraktionen A7 und A8 bei ca. 20 und 50 S/CO, wodurch auch durch den HBe-Antigen-ELISA die Identität der HBV core 1-151-Partikel nachgewiesen werden konnte. Die Frage, ob der HBe-spezifische ELISA assemblierte Partikel schlechter erkennt als kleinere Formen, lässt sich hier nicht klären.

### 4.2.3.2.2 Nachweis von HBV core 1-151, E2a-Partikeln



**Abb. 29 Nachweis korrekt assemblierter HBV core 1-151, E2a-Partikel.**

**a.)** Gelfiltrationselutionsprofil der konzentrierten HBV core 1-151, E2a-Strep-Tag Eluate 2 bis 6. Die x-Achse zeigt das Durchflussvolumen in ml, die y-Achse die mAU bei einer Absorption von 280 nm.

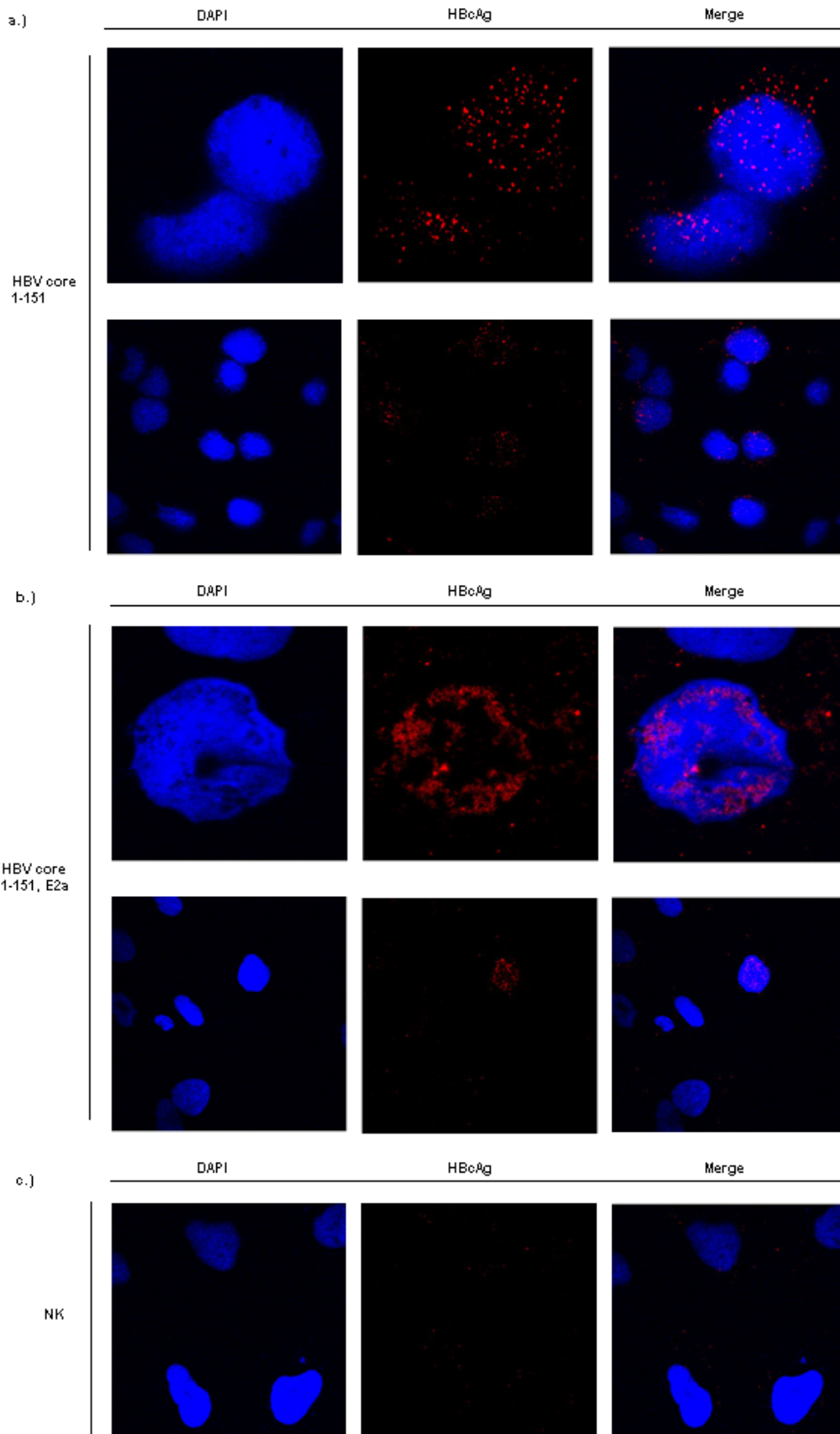
**b.)** Elektronenmikroskopische Aufnahme der gepoolten und konzentrierten Fraktionen A6 bis A8 mit 30 bis 40 nm großen sphärischen Partikeln. Der Größenstandard beträgt 200 nm. **c.)** HBeAg ELISA-Balkendiagramm mit den jeweiligen HBeAg-Titern in S/CO für die Fraktionen A6, A7 und A8 aus der Gelfiltration.

Für das HBV core 1-151, E2a-Konstrukt ergibt sich in der Gelfiltrationskurve in **Abb. 29 a.)** ein *Peak* von knapp 500 mAU bei den Fraktionen A6, A7 und A8. Im hinteren Bereich der Kurve sind auch hier nur kleine *Peaks* zu erkennen, die durch die Absorption kleinerer Proteine verursacht wurden. In der elektronenmikroskopischen Aufnahme der gepoolten und mit einem Amicon-Konzentrator (Millipore, USA) mit einem MWCO von 30 kDa ankonzentrierten Fraktionen A6, A7 und A8 sind deutlich korrekt assemblierte 30 bis 40 nm große HBV core 1-151, E2a-Partikel identifizierbar (**Abb. 29 b.)** (schwarze Pfeile). Die in den Fraktionen A6, A7 und A8 gemessenen ELISA-Titer (**Abb. 29 c.)** liegen mit 0,5, 0,9 und 1,9 S/CO im Falle des A8 zwar im reaktiven Bereich, liegen jedoch weit unter den für die HBV core 1-151-Partikel in den entsprechenden Fraktionen gemessenen Werte. Dies deutet auch hier wieder darauf hin, dass der ELISA die Fusionsproteine mit E2a-Fragment in den *Spike-tips* schlechter erkennen könnte. Weiter fällt auf, dass auch für das HBV core 1-151, E2a-Fusionsprotein die meisten Proteine in korrekt assemblierten Partikeln vorliegen oder wie für das HBV core 1-151-Konstrukt beschrieben in unspezifischen größeren Aggregaten.

#### **4.2.4 Proteinfunktionalität – Zellbiologische Charakterisierung**

##### **4.2.4.1 Nachweis der Membranpermeabilität generierter VLPs *in vitro***

Um die Fähigkeit der Membranpermeabilität der generierten HBV core 1-151- und HBV core 1-151, E2a-VLP zu überprüfen, wurden die gepoolten und mit einem Amicon-Konzentrator (Millipore, USA) mit einem MWCO von 30 kDa ankonzentrierten Strep-Tag Eluate 2-6 auf Huh7.5-Zellen gegeben. Nach einer 2stündigen Inkubation wurden die Zellen fixiert und im Anschluss für die Immunfluoreszenzmikroskopie gefärbt und analysiert.



**Abb. 30 Nachweis der Membranpermeabilität der generierten VLPs in Huh7.5-Zellen durch konfokale Laser-Rastermikroskop-Aufnahme.**

Als 1. AK wurde ein anti HBV core-spezifischer Antikörper (MAB 3120, Institut of Immunology, Japan) verwendet, der exklusiv assemblierte Partikel erkennt. Detektiert wurde dieser mit einem Cy3-gekoppeltem Zweitantikörper. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. **a.)** HBV core 1-151-VLPs, **b.)** HBV core 1-151, E2a-VLPs, **c.)** Negativkontrolle (NK).



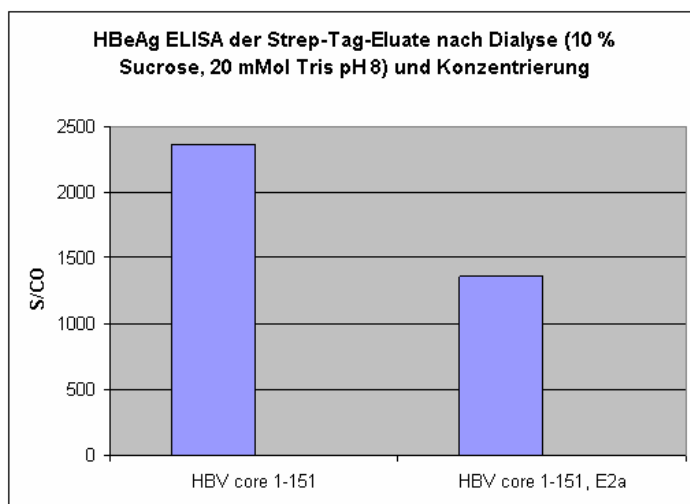
Im Falle der HBV core 1-151-VLPs sind deutliche Signale im gesamten Cytoplasma der Huh7.5-Zellen zu erkennen (**Abb. 30 a.**). Die HBV 1-151-VLPs sind sehr regelmäßig und geordnet verteilt und scheinen sich strahlenartig in Richtung Zellkern zu orientieren. Aufgrund dieses Verteilungsmusters lässt sich annehmen, dass sich die HBV core 1-151-VLPs nach der Translokation durch die Zellmembran entlang der Aktinfilamente anordnen bzw. entlang derer transportiert werden.

Im Gegensatz dazu konnten im Falle der HBV core 1-151, E2a-VLPs diese in erster Linie innerhalb der Zellkerne detektiert werden (**Abb. 30 b.**).

In beiden Fällen machen die Immunfluoreszenz-Analysen deutlich, dass durch die N-terminale Fusion des doppelten TLM-Peptids an die jeweils modifizierten HBV core-Konstrukte *in vitro* zellpermeable VLPs generiert werden konnten.

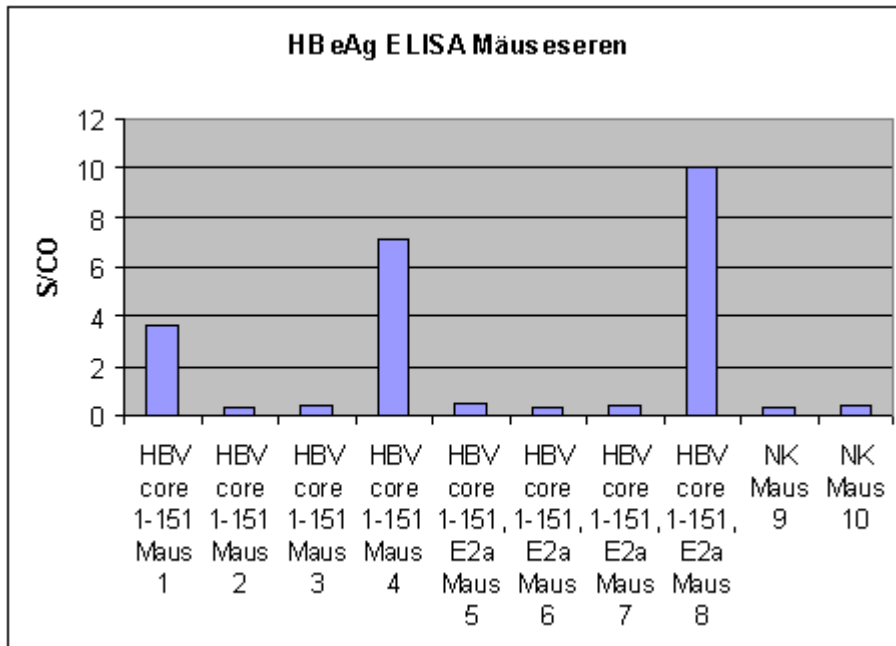
#### 4.2.4.2 Nachweis der Membranpermeabilität generierter VLPs *in vivo*

Mit dem Ziel, die Fähigkeit der Membranpermeabilität der generierten VLPs *in vivo* zu untersuchen, wurden die verschiedenen Fusionsproteine zunächst wieder durch Strep-Tag Affinitätschromatografie gereinigt. Anschließend wurden sie über Nacht in einem Dialyseschlauch mit einem MWCO von 10000 Da (Spectrum Lab, USA) gegen 10 % Sucrose und 20 mM TRIS pH 8 dialysiert und anschließend jeweils mit einem Amicon-Konzentrator (Millipore, USA) mit einem MWCO von 30 kDa auf ein Gesamtvolumen von je 2 ml ankonzentriert. Zur Kontrolle wurden die HBeAg ELISA-Titer bestimmt (**Abb. 31**).



**Abb. 31 HBe-Antigen-ELISA der Strep-Tag gereinigten, dialysierten und ankonzentrierten HBV core 1-151- und HBV core 1-151, E2a-Fusionsproteine.** Die Titer sind in S/CO angegeben.

Danach wurden die jeweiligen Fusionsproteine den Mäusen oral verabreicht und das 2-6 h später gewonnene Serum im Anschluss mittels HBeAg-ELISA untersucht.



**Abb. 32 Nachweis der generierten Fusionsproteine im Mäuseserum durch HBe-Antigen-ELISA.** Den Mäusen 1-4 wurde das HBV core 1-151-, den Mäusen 5-8 das HBV core 1-151, E2a-Fusionsprotein verabreicht. Die Mäuse 9 und 10 dienten als Negativkontrolle. Die Titer wurden in S/CO angegeben.

Bei den Mäusen 1 und 4 konnte mit Titern im HBe-Antigen spezifischen ELISA von 3,7 und 7,2 S/CO eine Reaktivität festgestellt werden. Maus 8 liegt mit einem Titer von 10 S/CO ebenfalls im reaktiven Bereich. Die Titer der beiden Negativkontrollen liegen jeweils bei ca. 0,4 S/CO und sind somit nicht reaktiv (**Abb.32**).

Es konnte also sowohl für das HBV core 1-151- Als auch für das HBV core 1-151, E2a-Konstrukt eine Absorption des jeweiligen Fusionsproteins über den Verdauungstrakt nachgewiesen werden.

#### 4.2.4.3 Induktion einer Immunantwort in Mäusen

Wie zum in *vivo*-Nachweis der Membranpermeabilität wurden die verschiedenen generierten VLPs hergestellt, aufbereitet und den Mäusen verabreicht. Im 14 Tage später gewonnenen Serum konnten weder im ELISA noch im Westernblot HCV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden.

## 5 Diskussion

Die Infektion mit dem Hepatitis C Virus (HCV) kann zu einer chronischen Infektion führen, aus der heraus eine Leberzirrhose und schließlich ein hepatozelluläres Karzinom entstehen kann. Weltweit sind gegenwärtig ca. 170 Mio. Menschen mit HCV infiziert. Ein Impfstoff gegen HCV ist derzeit noch nicht verfügbar.

Ziel dieser Arbeit war, weitere Grundlagen für die Entwicklung einer HCV-Vakzine zu legen. Dies sollte mittels zellpermeabler *virus like particles* (VLPs) auf der Basis des Kapsids vom Hepatitis B Virus, die an ihrer Oberfläche HCV-spezifische Antigene tragen, erfolgen, um so sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort zu induzieren. Auf Grund der geordneten Struktur der Antigene auf der Partikeloberfläche einerseits sollte eine effiziente Induktion der B-Zellantwort erfolgen. Andererseits sollte die durch das TLM-Peptid vermittelte Membranpermeabilität einen Transfer der VLPs ins Cytoplasma und somit eine proteasomale Degradation erlauben, um so eine effiziente Beladung von MHC-Klasse I Komplexen für die Induktion einer effizienten T-Zellantwort zu erzielen.

### 5.1 Generierung, Reinigung und strukturelle Charakterisierung der VLPs

Effiziente Träger für Fremdepitope sind HBcAgs. Dabei können rekombinant hergestellte HBV core-Proteine in großen Mengen in heterologen Expressionssystemen hergestellt werden. Diese assemblieren spontan zu ikosaedrischen *virus like particles* (VLPs). Durch elektronencryomikroskopische und röntgenkristallografische Untersuchungen gelang die Auflösung der Quartärstruktur, die eine Zusammenlagerung der über eine Disulfidbrücke zu  $\alpha$ -helikalen Dimeren verbundenen HBcAg-Monomere zeigt, die sich wiederum zu T=3- oder in größerem Maße zu T=4-Partikeln zusammenlagern. Die Partikel zeigen Fortsätze (*spikes*), wobei die Spitzen (*tips*) dieser Fortsätze sich als ideale Lokalisation für das Einfügen fremder Antigene bis zu einer Sequenz von 238 AS erwies (Kratz, Bottcher et al. 1999; Pumpens and Grens 2001).

#### 5.1.1 Wahl des Expressionssystems und Proteinsynthese

Im Rahmen von Vorarbeiten konnte bereits grundsätzlich gezeigt werden, dass die Generierung membranpermeabler VLPs auf der Basis des HBV-Kapsids und des Membranpermeabilität vermittelnden TLM-Peptids sowohl im Baculovirus-Sf9- als auch im *E. coli*-Expressionssystem möglich ist (Brandenburg, Stockl et al. 2005).

### 5.1.1.1 Baculovirus-Sf9-Expressionssystem

In dieser Arbeit wurde zunächst versucht, die verschiedenen Fusionsproteine mit Hilfe des pBacPAK9-Transfervektors im Baculovirus-Sf9-Expressionssystem zu generieren. Das Baculovirus-Sf9-Expressionssystem eignet sich insbesondere für die Herstellung komplexer rekombinanter Proteine (Davis, Wickham et al. 1993), da in Sf9-Zellen die meisten posttranslationalen Modifikationen wie in Säugetierzellen durchgeführt werden. Zu diesen zählen Phosphorylierungen und Glykosylierungen sowie die Bildung von Disulfidbrücken (Altmann, Staudacher et al. 1999). Auf diese Weise ist es in vielen Fällen möglich, korrekt gefaltete und lösliche rekombinante Proteine zu generieren (Jones and Morikawa 1996). Dazu wurden zunächst die verschiedenen Konstrukte hergestellt, die alle die Sequenz für das vollständige HBV core-Protein (AS 1-184) enthielten. Durch co-Transfektion mit der linearisierten Baculogold-DNA wurden die für die verschiedenen Fusionsproteine kodierenden DNA-Sequenzen in das Virus-Genom eingebracht. Das Amplifizieren der rekombinanten Viren erfolgte zunächst über drei Runden.

Sowohl die erfolgreiche Generierung der jeweiligen Baculoviren als auch die erfolgreiche Infektion der Sf9-Zellen (**Abb. 13**) und die Synthese der jeweiligen Konstrukte (**Abb. 14** und **Abb. 15**) konnte nachgewiesen werden. Allerdings war die Ausbeute synthetisierter rekombinanter Fusionsproteine in allen Fällen, aber insbesondere für das HBV core 1-184, E2\_1- und -E2\_3-Konstrukt, sehr gering. Dieses könnte zum einen daran liegen, dass die in den *Spike-tips* eingefügten Inserts mit 840 Basenpaaren für das E2\_1-Fragment und 450 Basenpaaren für das E2\_3-Fragment relativ groß sind und aufgrund dessen schwieriger zu produzieren waren. Andererseits könnte hier auch ein Löslichkeitsproblem der jeweiligen Proteine vorliegen oder aber eine starke Proteolyse. Ein weiterer Grund für die niedrige Proteinausbeute könnte auch auf die relativ schlechte Infektionsrate der Sf9-Zellen mit den jeweiligen rekombinanten Baculoviren zurückzuführen sein (**Abb. 16**), die trotz monatelanger Virusamplifizierung auf einen niedrigen Virustiter der Überstände hindeuten könnte.

Problematisch gestaltete sich zeitweise die Kultivierung nicht-infizierter Sf9-Zellen. Im Gegensatz zu T-25- und T-75-Zellkulturflaschen (Greiner, Frickenhausen) waren die Sf9-Zellen in T-125-Zellkulturflaschen (Greiner, Frickenhausen) 8 Stunden nach dem Aussähen in vielen Fällen nicht adhärent. Aus diesem Grund wurde sowohl die Kultivierung nicht-infizierter Sf9-Zellen als auch die Infektion zur Proteinherstellung in den kleineren T-75-Zellkulturflaschen durchgeführt. Ein Grund für die schlechtere Adhärenz könnte durch eventuelle Materialunterschiede der verschieden großen Zellkulturflaschen zu erklären sein. Weiterhin fiel auf, dass, im Gegensatz zu den mit dem Kontrollvektor infizierten Sf9-Zellen, die mit den jeweiligen HBV-Konstrukten infizierten Zellen 72 h *p.i.* zum größten Teil tot waren, was darauf hindeuten könnte, dass die hergestellten Proteine toxisch auf die Zellen wirkten.

Um größere Mengen der augenscheinlich besser zu synthetisierenden HBV core 1-184- und HBV core 1-184, E2a-Fusionsproteine zu gewinnen, wurde nach einiger Zeit auf die Herstellung der HBV core 1-184, E2\_1- und -E2\_3-Fusionsproteine verzichtet, um mehr Zellen für eine Infektion mit den rekombinanten HBV core 1-184- und HBV core 1-184, E2a-Baculoviren zur Verfügung zu haben.

So gelang zwar die Generierung korrekt assemblierter HBV core 1-184- und HBV core 1-184, E2a-VLPs (**Abb. 18** und **Abb. 19**). Jedoch war die Menge auch für diese relativ unbefriedigend und reichte nicht aus, um weitere zellbiologische Untersuchungen der VLPs durchzuführen.

### **5.1.2 *E. coli*-Expressionssystem**

Da die Ausbeute korrekt assemblierter VLPs im Baculovirus-Sf9-System relativ gering war, wurde auf das *E. Coli*-Expressionssystem mit dem pet24(a)+-Expressionsvektor umgestellt. Dieses prokaryotische Expressionssystem ist ein relativ einfaches und kostengünstiges System, in dem durch schnelles Wachstum der Bakterien eine große Proteinausbeute in kurzer Zeit möglich ist. Ein Nachteil dieses Systems ist, dass nur bedingt posttranslationale Modifikationen (N- und O-Glykosylierung) durchgeführt und Disulfidbrücken ausgebildet werden, was einerseits Auswirkungen auf die Bioaktivität und andererseits auf die Löslichkeit des synthetisierten rekombinanten Proteins hat. Durch die Fusion mit einem N-terminalen Leader kann ein Transport bzw. eine Sekretion des rekombinant hergestellten Proteins in das Periplasma, ein oxidierendes Zellkompartiment, und so eine Ausbildung von Disulfidbrücken und dadurch eine korrekte Faltung und Aktivität erreicht werden (Tsiomenko, Lupashin et al. 1990; Sachdev and Chirgwin 1999).

In anderen Arbeiten konnte allerdings auch demonstriert werden, dass auch ohne das Verwenden eines Fusionsproteins, sondern durch Induktion der Genexpression in der späten log-Phase die Menge löslichen Proteins gesteigert werden konnte (Galloway, Sowden et al. 2003).

Bei einer starken Proteinsynthese aggregieren die Expressionsprodukte in einigen Fällen in schwer löslichen *inclusion bodies* innerhalb der Zelle. *Inclusion bodies* sind Aggregate im Zellinneren, die aus Ansammlungen von nicht sekretierten oder fehlerhaft gefalteten Proteinen entstehen (Baneyx and Mujacic 2004; Ventura and Villaverde 2006), wobei sie trotzdem biologisch aktiv sein können (de Groot and Ventura 2006). Durch eine Senkung der Wachstumstemperatur und eine geringe IPTG-Konzentration kann durch langsamere Synthese und somit besserer Faltungsmöglichkeiten evtl. eine größere Ausbeute löslichen rekombinanten Proteins erzielt werden (Schein 1991; Galloway, Sowden et al. 2003).

In verschiedenen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass die Herstellung löslicher rekombinanter modifizierter HBV core-Fusionsproteine im *E. Coli*-Expressionssystem möglich ist (Brandenburg, Stockl et al. 2005; Schmidt 2008).

Als Expressionsvektor wurde in dieser Arbeit der pet24a(+)-Vektor (Novagen, Darmstadt) verwendet, bei dem die Genexpression unter Kontrolle des lac I-Repressors steht, für den auf dem Plasmid kodiert wird und der nach der Transformation exprimiert wird. Der lac I-Repressor bindet einerseits an die lac-Operatorregion des *E. coli*-Genoms und verhindert damit die Synthese von T7-Polymerase. Auf der anderen Seite bindet er an die lac-Operatorregion des Plasmids, die sich neben dem T7-Promotor befindet. Durch die Zugabe von IPTG löst sich der lac I-Repressor und es erfolgt die Expression des gewünschten Gens. Durch Klonierung wurden die HBV core 1-151- und HBV core 1-151, E2a-Konstrukte hergestellt, wobei die Sequenz für das HBV core-Protein C-terminal gekürzt wurde, sodass es eine Länge von 151 AS besaß. Eine C-terminale Verkürzung des core-Proteins auf wenigstens 140 As hat keine Bedeutung für die korrekte Assemblierung der HBcAg-Monomere zu Partikeln und für die Lokalisation der inserierten Antigene auf der Partikeloberfläche (Borisova, Berzins et al. 1989; Zlotnick, Cheng et al. 1996). Jedoch ist im prokaryotischen Expressionssystem die Ausbeute korrekt assemblierter Partikel besser, als bei aus gesamtem Protein aufgebauten Partikeln (Birnbaum and Nassal 1990).

Für die Synthese der verschiedenen rekombinanten HBV core-Proteine wurden zunächst die *E. coli* Stämme BL21 (DE3) und Rosetta (DE3) und die Wachstumstemperaturen 32 und 37 °C verglichen.

Beide *E. coli*-Stämme enthalten das für das pet-Expressionssystem notwendige DE3-Fragment des Bakteriophagen  $\lambda$ , das für die T7-RNA-Polymerase und den vorgeschalteten LacI-Repressor kodiert. Beide Stämme enthalten weder eine lon- noch eine ompT-Protease, was eine möglichst geringe Proteolyse während der Proteinexpression gewährleisten soll. In *E. coli*-Bakterien korreliert die Häufigkeit der unterschiedlichen Aminosäurekodons, aus denen die synthetisierten Proteine zusammengesetzt werden, mit der Anzahl der exprimierten tRNAs. Daraus ergibt sich, dass für seltene tRNAs nur wenige Aminosäurekodons in der Zelle vorhanden sind (Dong, Nilsson et al. 1996), wodurch entscheidend die Translationseffizienz beeinträchtigt wird (Kane 1995). Diese Problematik bei der Synthese eukaryotischer rekombinanter Proteine im prokaryotischen System soll bei dem Rosetta-Stamm umgangen werden, da dieser Plasmide enthält, die für seltene tRNAs kodieren und diese mit dem gewünschten Zielprotein co-exprimiert werden.

Ziel des Vergleiches war einerseits zu evaluieren, ob es im prokaryotischen Expressionssystem generell möglich ist, korrekt gefaltete biologisch aktive jeweils modifizierte HBV core-Fusionsproteine zu generieren und ob diese dann löslich oder unlöslich sind. Da sich herausstellte, dass die Herstellung löslicher Fusionsproteine möglich

war, galt es herauszufinden, unter welchen Bedingungen die maximale Ausbeute löslicher Proteine bzw. korrekt assemblierter Partikel erreicht werden konnte.

Im Falle der Ausbeute des HBV core 1-151-Fusionsproteins konnte weder ein signifikanter Unterschied zwischen den *E. coli*-Stämmen BL21 und Rosetta, noch zwischen den Wachstumstemperaturen von 32 bzw. 37 °C festgestellt werden.

Das Fusionsprotein konnte sowohl in den nach Ultraschallbehandlung hergestellten Lysaten (**Abb. 22**) als auch nach Lösen der Zelllysat-Pellets in denaturierendem Gua-Puffer und Dialyse in den Dialysaten (**Abb. 23**) festgestellt werden. Das Verhältnis von löslichem zu nicht löslichem Protein lag dabei laut HBeAg ELISA unabhängig von den verschiedenen Induktionskonditionen bei etwa 50:50. Allerdings stellt sich hier die Frage, ob der ELISA, der für das HBe-Antigen spezifisch ist, kleinere HBV core-Oligomerisationsformen besser erkennt als größere (s.u.). Wäre dieses der Fall, so wäre die Menge des HBV core 1-151-Fusionsproteins in größerem Maße löslich als nicht löslich, da der Gua-Puffer einerseits nach der Ultraschallbehandlung übrig gebliebene, nicht aufgeschlossene Zellen zerstört und die darin vorliegenden löslichen Proteine freisetzt. Andererseits wären durch diesen auch sämtliche Proteine denaturiert, was ein Zerlegen der evtl. vorkommenden assemblierten Partikel in seine Einzelteile und somit einen evtl. höheren ELISA-Titer bewirkt.

Im Falle des HBV core 1-151, E2a-Fusionsproteins waren die gemessenen ELISA-Titer in den Lysaten 5 bis 10 mal niedriger als nach Denaturierung und Dialyse in den Dialysaten, wobei auch hier keine großen Unterschiede zwischen den verwendeten *E. coli*-Stämmen und den verschiedenen Wachstumstemperaturen festgestellt werden konnte. Daraus könnte man schließen, dass die Löslichkeit durch das inserierte E2a-Fragment im Vergleich zum HBV core 1-151-Fusionsprotein herabgesetzt ist. Andererseits könnten die ELISA-Werte auch bedeuten, dass das HBV core 1-151, E2a-Fusionsprotein schlechter hergestellt oder dieses, insbesondere die HBV core 1-151, E2a-Partikel, schlechter im ELISA erkannt wird als das HBV core 1-151-Fusionsprotein. Da aber die ELISA-Titer in den Dialysaten ähnlich dem HBV core 1-151-Konstrukt sehr hoch waren, ist zumindest ein schlechteres Erkennen von nicht assemblierten HBV core 1-151, E2a-Fusionsproteinen sehr unwahrscheinlich.

Da sich für beide rekombinanten Fusionsproteine große Mengen in den nativ hergestellten Zelllysaten befanden und ebenso in den denaturierend hergestellten Dialysaten nachgewiesen werden konnten, ist davon auszugehen, dass die beiden in BL21 als auch in Rosetta hergestellten Fusionsproteine prinzipiell löslich sind und dass der nicht lösliche Anteil auf in *inclusion bodies* aggregierte Proteine zurückzuführen ist.

Durch Gelfiltration und elektronenmikroskopische Untersuchungen wurde festgestellt, dass in den nativ hergestellten Lysaten wesentlich mehr korrekt assemblierte Partikel vorhanden waren als in den denaturierend hergestellten Dialysaten (**Abb. 24** und **Abb. 25**). Grund

hierfür ist wahrscheinlich die Tatsache, dass durch den Gua-Puffer bei der Herstellung der Dialysate assemblierte Partikel zerlegt wurden.

Zur Generierung der VLPs für weitere Experimente wurden Lysate hergestellt und aufgereinigt.

### **5.1.3 Proteinreinigung**

Die Reinigung der generierten Fusionsproteine erfolgte sowohl für das Sf9- als auch für das *E. coli*-Expressionssystem nach Zellyse mit Ultraschall mit Hilfe des N-terminalen Strep-Tags über 1 ml Streptactin Sepharose-Affinitätschromatografiesäulen (Iba, Göttingen). Als alternative Reinigungsstrategien wurden Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitäts- und Ionenaustauschchromatografie sowie eine Kombination dieser beiden Methoden durchgeführt. Die Analyse der Reinigungseffizienz erfolgte in allen Fällen durch Silbergel- und Westernblot mit anti-HBc-spezifischem Antikörper sowie durch HBeAg ELISA.

#### **5.1.3.1 pBacPAK9-Konstrukte**

Im Falle der im Sf9-System generierten rekombinanten Proteine stellte sich lange die Frage nach der Reinigungseffizienz der Strep-Tag Säulen. Für das HBV core 1-184, E2\_1- und -, E2\_3-Konstrukt konnten diese zwar im Lysat nachgewiesen werden, allerdings konnten nach Strep-Tag Reinigung und Analyse der Reinigungsschritte weder im Silbergel noch im Westernblot spezifische Signale erzielt werden. Da die HBeAg ELISA-Titer für diese beiden Fusionsproteine in den entsprechenden Lysaten allerdings stets sehr niedrig waren, könnte dies insbesondere bei diesen Konstrukten, auf eine ohnehin geringe Proteinmenge in den Lysaten zurückzuführen sein. Allerdings gelang auch nach Erhöhung der Menge rekombinanten Proteins durch Poolen der jeweiligen Lysate und anschließende Reinigung über 1 ml Strep-Tactin Säulen (Iba, Göttingen) keine Anreicherung der Fusionsproteine. Im Falle des HBV core-1-184- und HBV core 1-184, E2a-Konstrukts gelang eine Reinigung durch Strep-Tag Affinitätschromatografie. Allerdings konnte gezeigt werden, dass nach Strep-Tag Reinigung und Gelfiltration die Menge enthaltener HBV core 1-184- bzw- HBV core 1-184, E2a-Partikel sehr gering war (**Abb. 18** und **Abb. 19**). Im Gegensatz dazu wurde anhand des Gelfiltrationsprofils deutlich, dass im Verhältnis wesentlich mehr kleinere Oligomerisationsformen (Monomere, Dimere etc.) in den Strep-Tag Eluaten vorhanden waren (**Abb. 18**).

Zum einen könnte die niedrige Partikelausbeute an einer geringen Syntheserate durch die Sf9-Zellen zurückzuführen sein. Allerdings gelang in anderen Arbeiten im Baculovirus-Sf9-System eine sehr hohe Ausbeute korrekt assemblierter Partikel (Brandenburg, Stockl et al. 2005). Außerdem zeigte sich in der Immunfluoreszenzuntersuchung der mit dem HBV core 1-184-Konstrukt rekombinanten Baculovirus infizierten Sf9-Zellen mit einem ausschließlich



assemblierte HBV-Partikel detektierenden Antikörper, dass, obwohl die Infektionseffizienz der Zellen nur bei etwa 30 % lag, durchaus genügend Partikel generiert werden konnten (**Abb. 16**). Aus diesen Gründen könnte es einerseits sein, dass assemblierte Partikel evtl. schlechter als kleinere Oligomerisationsformen an das Material in den verwendeten Strep-Tag Affinitätschromatografiesäulen binden könnten, wobei in vorausgegangenen Arbeiten die Aufreinigung rekombinant hergestellter HBV core-Fusionsproteine und die Anreicherung korrekt assemblierter Partikel über Strep-Tag Affinitätschromatografiesäulen problemlos möglich war (Brandenburg, Stockl et al. 2005). Allerdings wurden in der Arbeit von (Brandenburg, Stockl et al. 2005) zur Herstellung der Zelllysate nicht wie hier eine Ultraschallsonde sondern eine French-Press verwendet, bei der eine mechanische Zellöffnung durch Scherkräfte erfolgt. Es wäre also denkbar, dass durch die Prozedur der Ultraschallbehandlung, trotz Kühlung und Intervallbeschallung, assemblierte Partikel zerstört wurden.

### 5.1.3.2 pet24a(+)-Konstrukte

Im Falle des bakteriell hergestellten HBV core 1-151-Fusionsproteins ließ sich dieses zwar problemlos durch Strep-Tag Affinitätschromatografie anreichern (**Abb. 26**). Allerdings fiel auch hier auf, dass sowohl im Durchlauf als auch in den Waschfraktionen sowohl eine hohe Reaktivität im HBe-Antigen-spezifischen ELISA (**c.**) als auch im Westernblot (**b.**) mit einem anti-HBcAg-Antikörper nachweisbar war. Aus dem Silbergel (**a.**) und dem Westernblot wird deutlich, dass die im Lysat und in den Eluatfraktionen 3-5 zwischen 20 und 25 kDa laufende spezifische Bande (schwarzer Pfeil) angereichert werden konnte und der Größe des HBV core 1-151-Monomers entspricht. In der Fraktion E3 ist eine weitere hoch laufende Proteinbande vorhanden, die auch in stärkerer Intensität im Lysat und in den Fraktionen D, W1 und W2 auftaucht und ebenfalls spezifisch mit dem Antikörper reagiert. Weitere Signale sind im Lysat, D und den W-Fraktionen vorhanden, die nicht im Eluat auftauchen.

Dieses könnte einerseits darauf hindeuten, dass durch das Kochen in 4xSDS zwar ein Teil der assemblierten Partikel in seine Einzelteile zerlegt wurde und als Monomere im Silbergel und im Westernblot nachweisbar waren, ein weiterer Teil aber in größeren Oligomerisationsformen vorlag. Hier könnten die höher laufenden Proteinbanden auf größere Oligomerisationsformen insbesondere im Lysat, im Durchlauf und in den Waschfraktionen hindeuten, die eventuell in diesen Fraktionen durch Wechselwirkungen mit anderen Proteinen stabiler und auf Grund dessen schwieriger zu denaturieren sein könnten als in den relativ reinen Eluatfraktionen.

Andererseits könnte dies zeigen, dass das in den Strep-Tag Säulen (Iba, Göttingen) vorhandene Streptactin besser kleinere Oligomerisationsformen bindet als größere, insbesondere als assemblierte Partikel.

Weiterhin könnten die hohen HBeAg ELISA-Titer im Durchlauf und in den Waschfraktionen im Falle des HBV core 1-151-Fusionsproteins auch auf ein Kapazitätsproblem der 1 ml Strep-Tag Säulen hindeuten.

Im Gegensatz zum HBV core 1-151-Konstrukts ließ sich das HBV core 1-151, E2a-Fusionsprotein schlechter durch Strep-Tag Affinitätschromatografie anreichern (**Abb. 27**). Einerseits wird aus dem Silbergel (**a.**) und dem Westernblot (**b.**) deutlich, dass die in E3 spezifische HBV core 1-151, E2a-Bande (schwarzer Pfeil) in stärkerer Intensität auch im Durchlauf und den Waschfraktionen auftaucht. Andererseits liegen die HBeAg ELISA-Titer in E3 und E4 mit je ca. 250 S/CO weit unter den im Lysat, im Durchlauf und in der Waschfraktion 1 gemessenen Titern (**c.**). Auch hier stellt sich zum einen die Frage, wie effektiv die assemblierten Partikel für die SDS-PAGE in den verschiedenen Fraktionen denaturiert werden konnten und zum anderen, wie spezifisch der HBeAg ELISA die mit dem E2a-Fragment modifizierten HBV core-Partikel bzw. Mono- und Oligomere erkennt.

## **5.1.4 Proteinnachweis**

### **5.1.4.1 Spezifität HBeAg ELISA**

Die Messung der HBeAg-Titer zum Nachweis der rekombinanten modifizierten HBV core-Proteine erfolgte am Architect i1000SR (Abbott Laboratories, USA) unter Verwendung des ARCHITECT HBeAg assays (Abbott Laboratories, USA), einem Immunassay, der in der Probe enthaltenes HBe-Antigen detektiert und nach Messung der Chemilumineszenz-Reaktion letztere in *relative light units* (RLU) angibt. Die Bestimmung des HBeAg-Titers erfolgt durch den Vergleich der in der Probe gemessenen RLU zu einer *cutoff*-RLU und wird in S/CO (*Sample RLU/Cutoff RLU*) angegeben, wobei Proben mit einem Titer von < 1.000 S/CO nicht reaktiv und solche mit einem S/CO > 1.000 reaktiv sind.

Der Immunassay wurde für humanes Serum oder Plasma entwickelt und getestet.

Das HBeAg (hepatitis B virus early antigen) ist eine N-terminal verlängerte und C-terminal verkürzte Version des HBcAg, das während der HBV-Replikation in der Leber in die Blutbahn abgegeben wird (Mitamura 1995).

Es stellt sich also einerseits die Frage, ob der für die Detektion des HBeAg-Monomers entwickelte Immunassay assemblierte Partikel ebenso gut erkennt wie Mono-, Di- und Oligomere.

Weiterhin konnte nicht geklärt werden, wie effektiv die modifizierten rekombinanten HBV core-Fusionsproteine durch den Immunassay detektiert werden und es ist nicht klar, ob durch die Insertion einer Fremdsequenz in die *Spike-tips* zwischen die HBV core AS 78-82, die die hauptimmunogene Region des HBV core-Proteins darstellt (Bottcher, Wynne et al. 1997; Conway, Cheng et al. 1997), eine Erkennung durch den verwendeten Immunassay beeinträchtigt wird.

Da aber für das HBV core 1-151, E2a-Konstrukt im Falle der hergestellten Dialysate durchaus hohe HBeAg ELISA-Werte von ca. 1850 S/CO gemessen werden konnten (**Abb. 23**), ist davon auszugehen, dass eine Beeinträchtigung der Messung durch die Fremdsequenz im *Spike-tip* unwahrscheinlich ist und dass die niedrigeren Werte für das HBV core 1-151, E2a-Konstrukt auf eine geringere Proteinmenge zurückzuführen sind.

#### 5.1.4.2 Spezifität HBc-Antikörper

In vielen Westernblots reagierte der anti-HBV core-spezifische Antikörper mit verschiedenen Proteinen unterschiedlicher Größe (z.B. **Abb. 17 b.**), **Abb. 26 b.**) und **Abb. 27 b.**)), so dass sich hier die Frage stellte, ob es sich dabei um eine Kreuzreaktivität mit unspezifischen Proteinen handelt, oder ob diese Banden andere Oligomerisationsformen der modifizierten HBV core-Fusionsproteine darstellen. Da einige Proteinbanden beim Verwenden unterschiedlicher Primärantikörper (anti-HBcAg, Pierce, USA; Serum Anti-2xTLM, HBV core, Brandenburg, Stockl et al. 2005) auftauchten, gilt letzteres als wahrscheinlich.

#### 5.1.4.3 Nachweis der generierten VLPs

Um nachzuweisen, dass korrekt assemblierte Kapside in den Strep-Tag Eluaten vorhanden waren, wurden letztere mittels Gelfiltration und Elektronenmikroskopie analysiert (**Abb. 28** und **Abb. 29**). Dabei ließen sich im Gelfiltrationsprofil für die HBV core 1-151- und HBV core 1-151, E2a-Konstrukte große Mengen von Proteinaggregaten nachweisen, die nach dem Ausschlussvolumen der Superose-6-Säule eluiert wurden. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen ließ sich bestätigen, dass es sich dabei z.T. um gleichmäßig geformte und etwa 30 bis 40 nm große sphärische Partikel handelt. Die HBV core 1-151-Partikeln ließen sich morphologisch nicht von den HBV core 1-151, E2a-Partikeln unterscheiden.

Sowohl für das HBV core 1-151- als auch für das HBV core 1-151, E2a-Konstrukt konnten also korrekt assemblierte Partikel in ausreichenden Mengen gereinigt werden. Vergleicht man jedoch die Partikelmenge in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen anderer Arbeiten, so fällt eine relativ geringe Partikelmenge auf. Da jedoch die jeweiligen Gelfiltrationsprofile in **Abb. 28** und **Abb. 29** indizieren, dass der größte Teil der gereinigten Proteine in Partikeln assembliert vorliegt, stellt sich hier einerseits die Frage, ob die am Paul Ehrlich Institut durchgeführten elektronenmikroskopischen Aufnahmen repräsentativ für die jeweiligen gesamten Proben waren. Andererseits könnten hier die entsprechenden *Peaks*, in denen die assemblierten Partikel erwartet wurden, auch unspezifische Aggregate von HBV-Monomeren oder zusammen gelagerte Baculovirus- oder *E. coli*-Zell-Proteine beinhalten.

## 5.2 Zellbiologische Charakterisierung der generierten VLPs

### 5.2.1 Zellpermeabilität

In zahlreichen Untersuchungen konnte die Eigenschaft der Membranpermeabilität des aus der PreS2-Region des HBV stammenden TLM-Peptids allein oder in Fusion mit anderen Proteinfragmenten belegt werden (Oess and Hildt 2000; Brandenburg, Stockl et al. 2005; Hillemann, Brandenburg et al. 2005; Bleifuss, Kammertoens et al. 2006; Stoeckl, Funk et al. 2006), wobei die Effizienz des Transports durch die Fusion eines TLM-Dimers an das HBV core-Protein gesteigert werden konnte (Brandenburg, Stockl et al. 2005).

Zur *in vitro*-Untersuchung der Membranpermeabilität wurden nach Strep-Tag Reinigung die Eluatfraktionen 2-6 der Fusionsproteine HBV core 1-151 und HBV core 1-151, E2a jeweils gepoolt. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch durch Absorptionsmessung bei 280 nm bestimmt, wobei sich die Gesamtkonzentration jeweils aus den korrekt assemblierten VLPs, kleineren Oligomerisationsformen sowie Verunreinigungen co-gereinigter Proteine zusammensetzte. Im Anschluss wurden die ankonzentrierten Strep-Tag Eluate auf Huh7.5-Zellen gegeben. Die Detektion der VLPs in den Huh7.5-Zellen erfolgte mit einem anti-HBcAg-Primärantikörper, der ausschließlich assemblierte Partikel erkennt und mit einem Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper durch konfokale immunfluoreszenzmikroskopie.

**Abb. 30** zeigt die konfokalen Laser-Rastermikroskop-Aufnahmen. Durch die Negativkontrolle einerseits und durch das unterschiedliche Verteilungsmuster der HBV core 1-151- und HBV core 1-151, E2a-VLPs andererseits können Artefakte ausgeschlossen werden. Die HBV core 1-151-VLPs waren v.a. im Cytoplasma lokalisiert und zeigten ein strahlenförmiges Verteilungsmuster (**a.**)), wodurch anzunehmen ist, dass diese mit den Aktinfilamenten in Wechselwirkung treten. Die HBV core 1-151, E2a-VLPs waren hingegen zum größten Teil nucleär lokalisiert (**b.**)), was möglicherweise auf eine geringere Stabilität und in der Folge eine Translokation durch die Kernporen zurückzuführen sein könnte.

Um die Fähigkeit der Membranpermeabilität *in vivo* zu untersuchen, wurden nach Strep-Tag Aufreinigung die Eluatfraktionen 2-6 der Fusionsproteine HBV core 1-151 und HBV core 1-151, E2a jeweils wieder gepoolt und Mäusen oral verabreicht. In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass VLPs, die ohne Adjuvantien Probanden oral verabreicht wurden über die Schleimhaut des Verdauungstraktes absorbiert wurden und eine Immunantwort auslösten (Ball, Graham et al. 1999).

Das 2 bis 6 Stunden später gewonnene Serum wurde anschließend mittels HBcAg ELISA untersucht. Bei 2 von 4 mit dem HBV core 1-151-Fusionsprotein gefütterten Mäusen konnte eine Reaktivität im ELISA-Test nachgewiesen werden (**Abb. 32**). Für das HBV core 1-151, E2a-Konstrukt war das Serum einer Maus reaktiv. Somit konnte gezeigt werden, dass eine

Resorption der generierten Fusionsproteine über den oberen Verdauungstrakt möglich ist. Beachtet werden muss allerdings, dass zwar das Vorhandensein korrekt assemblierte VLPs in den Strep-Tag Eluaten nachgewiesen wurde. Allerdings befanden sich darin ebenso kleinere Oligomerisationsformen des jeweils rekombinanten modifizierten HBcAgs, sodass der ELISA-Titer nicht eindeutig auf assemblierte Partikel zurückzuführen werden kann. Des Weiteren war das Serum von 5 mit den jeweiligen Strep-Tag Eluaten gefütterten Mäusen negativ im HBeAg ELISA. Dieses könnte auf die Art der oralen Applikation zurückzuführen sein. So fraßen einige Mäuse das mit der Proteinlösung getränkte Futterpellet unverzüglich, wohingegen andere dieses erst nach einigen Stunden fraßen, wodurch es zu einem proteolytischen Abbau gekommen sein könnte.

Um eine Standardisierung und eine sichere und unverzügliche orale Aufnahme durch die Mäuse zu erreichen, wäre es in Zukunft bei ähnlichen Experimenten sinnvoll, den Tieren die aufzunehmende Lösung direkt oral zu applizieren.

### **5.2.2 Induktion einer Immunantwort**

*Virus like particles* als Träger für Fremdartigene auf ihrer Oberfläche können eine effiziente B- und T-Zellantwort induzieren (Pumpens and Grens 2001; Ruedl, Schwarz et al. 2005).

Durch die geordnete Struktur der Fremdartigene auf der Partikeloberfläche kommt es einerseits zu einer deutlich erhöhten Effizienz der humoralen Immunantwort. Zudem kann nach endocytotischer Aufnahme der Antigene und nach Kreuzpräsentation eine effektive T-Zellantwort ausgelöst werden. So konnte durch HCV *like particles*, die das HCV-Protein p7 auf ihrer Oberfläche exponierten, in verschiedenen Mausmodellen eine starke, Virus-spezifische humorale und zelluläre Immunantwort, die auch HCV-spezifische, cytotoxische T-Zellen umfasste, erreicht werden (Lechmann, Murata et al. 2001).

Im Tiermodell haben mehrere Untersuchungen gezeigt, dass eine Immunisierung mit *Norwalkvirus like particles* eine effiziente Immunantwort hervorruft, die zum Schutz vor einer Infektion führt (Herbst-Kralovetz, Mason et al. 2010). Klinische Studien am Menschen, bei denen eine hohe Immunogenität der auf VLPs basierenden Vakzine gezeigt werden konnte (Ball, Graham et al. 1999; Estes, Ball et al. 2000; Harro, Pang et al. 2001), sowie die Entwicklung einer Papilloma-VLP-Vakzine, die effektiv vor einer chronischen Papillomavirusinfektion und deren Folgen (Cervixkarzinom) schützt (Villa, Costa et al. 2005), machen das Potential der in dieser Arbeit verfolgten Strategie zur Generierung einer HCV-Vakzine deutlich.

So ist es auf der Grundlage von nicht-infektiösen HBV *like particles* möglich, Antigene in geordneter Struktur zu präsentieren, um eine effiziente B-Zellantwort auszulösen.

Rekombinante HBV *like particles* wurden als Träger für immunodominante Epitope u.a. für das Hepatitis B-, -C- und -E-Virus, das humane Rhinovirus, das Papillomavirus, das

Hantavirus, das humane Influenzavirus, das humane und simiane Immundefizienzvirus, das bovine und feline Leukämievirus, das Maul- und Klauenseuchevirus, das murine Cytomegalovirus und Poliovirus sowie für weitere virale Proteine und für einige Bakterien- und Protozoenproteine verwendet (Pumpens and Grens 2001).

Bakteriell hergestellte chimäre HBc-Fusionsproteine konnten eine starke Immunantwort gegen das HBcAg und gegen das Fremdanigen auslösen (Clarke, Brown et al. 1990). Durch das Einfügen verschiedener HBV-Epitope konnte ein signifikanter anti-Tumor-Effekt gegen HCC *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden (Ding, Wang et al. 2009). Mit Hilfe bakteriell hergestellter chimärer HBV core-Partikel konnte die Bildung neutralisierender Antikörper gegen ein Antigen des Maul- und Klauenseuchevirus erreicht (Chambers, Dougan et al. 1996) und z.T. eine protektive Immunantwort in Tiermodellen induziert werden (Boulter, Glass et al. 1995; Ulrich, Lundkvist et al. 1998).

### 5.2.2.1 Induktion einer B-Zellantwort

HCV-spezifische Antikörper konnten nicht nachgewiesen werden, was zum einen dadurch zu erklären sein kann, dass der verwendete ELISA für humane HCV-Antikörper entwickelt wurde und somit die Mausantikörper schlechter erkennt. Zum anderen kann es sein, dass die im Zuge der frühen Antikörperantwort gebildeten IgMs schlechter sowohl durch den ELISA als auch durch den Primärantikörper bei der Westernblot-Untersuchung erkannt werden. In Zukunft wäre es sinnvoll bei ähnlichen Experimenten die Mäuse frühestens 8 Wochen nach der Immunisierung nach eventueller Boosterung zu töten und das Serum zu untersuchen. Einerseits können beim Menschen erst 7 bis 8 Wochen nach einer HCV-Infektion entsprechende Antikörper mittels ELISA nachgewiesen werden. Andererseits ist es denkbar, dass die dann vorhandenen IgGs besser sowohl im ELISA als auch im Westernblot nachweisbar sind.

Um eine unverzügliche und vollständige Aufnahme der zu verabreichenden rekombinanten Proteine zu gewährleisten, wäre es sinnvoll, wie bereits oben erwähnt, den Mäusen bei weiteren Immunisierungsexperimenten diese direkt ins Maul einzugeben.

## 5.3 Ausblick: Zellpermeable HBV-LPs mit HCV-Epitopen als HCV-Vakzine

Beim natürlichen Verlauf einer ausheilenden HCV-Infektion spielt neben der humoralen Immunantwort (Pestka, Zeisel et al. 2007) insbesondere eine polyklonale CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellantwort eine entscheidende Rolle (Lechner, Wong et al. 2000; Lauer and Walker 2001; Grakoui, Shoukry et al. 2003; Shoukry, Grakoui et al. 2003; Jo, Aichele et al. 2009).

Patienten, bei denen die HCV-Infektion einen chronischen Verlauf nimmt, fehlt diese CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellantwort gegen verschiedene HCV-Proteine.

Die große genetischen Variabilität des HCV (Lyra, Fan et al. 2004) und die durch das Fehlen einer *proof-reading*-Funktion der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase Entstehung von Quasispezies stellen sowohl in der Therapie einer HCV-Infektion als auch in der Impfstoffentwicklung erhebliche Probleme dar.

Eine ideale HCV-Vakzine sollte daher neben einer starken B-Zellantwort mit der Bildung neutralisierender Antikörper vor allem eine effiziente multispezifische T-Zellantwort auslösen. Insbesondere vom Hepatitis B-Virus abgeleitete Kapside eignen sich als partikuläre Antigenträger. Dieses liegt zum einen an der Möglichkeit, fremde Antigene in hoher Dichte und in geordneter Struktur auf der Partikeloberfläche unterzubringen, wodurch eine effektive B-Zellantwort ausgelöst werden kann (Pumpens and Grens 2001). Durch Kreuzpräsentation und insbesondere nach Kopplung mit einem Translokationsmotiv, in dieser Arbeit das TLM-Peptid, kann zudem über eine MHC-1-abhängige Präsentation eine starke T-Zellantwort induziert werden (Milich and McLachlan 1986). Ein weiterer Vorteil ist, dass sich korrekt assemblierte modifizierte HBV-Kapside relativ einfach rekombinant herstellen lassen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die rekombinante Generierung und Reinigung korrekt assemblierter HBV-LPs mit dem HCV-Epitop E2a möglich ist. Zudem erfolgte der Nachweis der Membranpermeabilität *in vitro* und *in vivo*.

In weiteren Experimenten muss nun zunächst im Mausexperiment untersucht werden, ob eine effiziente Immunantwort ausgelöst werden kann. Wie oben bereits erwähnt empfiehlt es sich die Applikation der Proteine zu standardisieren. Um eine B-Zellantwort nachzuweisen, sollte den Mäusen zum Nachweis von IgGs frühestens 8 Wochen nach Applikation Blut entnommen werden und dieses im Anschluss durch ELISA und Western-Blot untersucht werden.

Zudem muss untersucht werden, ob eine T-Zellantwort induziert werden kann. Sollten die durchgeführten Immunisierungsversuche erfolgreich sein, wären die so generierten Proteine vielversprechende Kandidaten für eine prophylaktische HCV-Vakzine.

Je nach Ergebnis der verschiedenen Immunisierungsexperimente wäre es sinnvoll weitere VLPs mit anderen HCV-Proteinen herzustellen. Aufgrund der leichteren Handhabung und der effizienteren Ausbeute sollte dieses zunächst mit dem prokaryotischen Expressionssystem versucht werden. Sollte dieses z.B. durch Löslichkeitsprobleme nicht möglich sein, müsste man versuchen, die Probleme bei der Herstellung und Reinigung der Proteine im eukaryotischen Expressionssystem abzustellen.

Ein interessanter Ansatz wäre auch die Entwicklung eines universellen Fremdepitopträgers auf Basis des HBV core-Proteins (HBcAg), der ebenfalls spontan zu Partikeln assembliert. In

deren *Spike-tips* könnte das Protein Streptactin inseriert werde, das verschieden Strep-getagte HCV-Epitope bindet. Zum einen könnten so eventuelle Löslichkeitsprobleme beseitigt werden. Zum anderen hat man so die Möglichkeit, verschiedene HCV-Epitope in den *Spike-tips* zu präsentieren und so eine Immunantwort gegen verschiedene HCV-Proteine auszulösen.

So hergestellte VLPs könnten sowohl als prophylaktische als auch als therapeutische Vakzine eingesetzt werden (Chen 2011).

Auch die DNA-Vakzinierung könnte ein interessantes Feld in der Therapie chronisch HCV-infizierter Patienten bieten. So etablierte eine schwedische Arbeitsgruppe um Lars Frelin in einer noch nicht veröffentlichten Studie eine DNA-HCV-Vakzinkandidaten auf Basis eines eukaryotischen Expressionsplasmids, der für das NS5A-Gen kodiert. Dieser konnte nach intramuskulärer Injektion und *in vivo*-Elektroporation starke T-Zellantworten in Wildtyp- als auch in NS5A-transgenen Mäusen auslösen und das Wachstum NS5A-exprimierender Tumorzellen *in vivo* hemmen und stellt somit einen vielversprechenden therapeutischen Impfstoffkandidaten bei chronischer HCV-Infektion dar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Arbeit die Grundlage für die Generierung und Reinigung von korrekt assemblierten, zellpermeablen HBV-LP mit HCV-Epitopen gelegt werden konnte. Sollten weitere Immunisierungsexperimente im Mausmodell erfolgreich sein wären diese Proteine vielversprechende Kandidaten für eine prophylaktische bzw. für eine therapeutische HCV-Vakzine.



## 6 Zusammenfassung

### **Generierung, Isolierung und funktionelle Charakterisierung von zellpermeablen *virus like particles* (HBV-Kapside) als Carrier für HCV-Antigene zur effizienten Induktion einer B- und T-Zellantwort.**

Das Hepatitis C Virus ist ein einzelsträngiges (+)-Strang RNA-Virus, das zur Familie der Flaviviridae gehört und dort das Genus der Hepaciviren bildet. Es lässt sich in 6 verschiedene Genotypen und 30 Subtypen gruppieren, wobei die Genotypen und Subtypen eine unterschiedliche geographische Verteilung aufweisen. Die Infektion mit HCV kann neben einer akuten Leberentzündung zu einer chronischen Infektion führen, aus der heraus eine Leberzirrhose und schließlich ein hepatozelluläres Karzinom (HCC) entstehen können. Aufgrund der großen globalen Bedeutung, gegenwärtig sind ca. 170 Mio. Menschen weltweit mit HCV infiziert, den mangelnden therapeutischen Möglichkeiten und dem Fehlen eines prophylaktischen Impfstoffes, wäre es von großem Nutzen, einen HCV-Impfstoff zu entwickeln, um eine weitere Ausbreitung der HCV-Infektion mit Übergang in eine Leberzirrhose zu verhindern und somit eine Primärprävention des HCV-induzierten HCCs zu erreichen.

Da man davon ausgeht, dass insbesondere das Fehlen einer effizienten T-Zellantwort für die Chronizität einer HCV-Infektion verantwortlich ist, gibt es vermehrt Ansätze HCV-spezifische T-Zell-Vakzine zu entwickeln.

Ziel dieses Projekts war, weitere Grundlagen für die Entwicklung einer HCV-Vakzine zu legen. Dieses erfolgte mittels zellpermeabler *virus like particles* (VLPs) auf der Basis des Kapsids vom Hepatitis B Virus, die an ihrer Oberfläche HCV-spezifische Antigene trugen. Durch die geordnete Struktur soll es einerseits zu einer effizienten humoralen Immunantwort kommen. Andererseits soll durch die Membranpermeabilität ein Transfer der Partikel ins Cytoplasma und eine proteasomale Degradation erlaubt werden, um eine effiziente Beladung von MHC-Klasse I Komplexen für die Induktion einer T-Zellantwort zu erzielen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten korrekt assemblierte zellpermeable HCV-Antigene tragende VLP hergestellt und isoliert werden. Die Fähigkeit zur Membranpermeabilität konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden. In weiteren Projekten muss nun in ersten Immunisierungsversuchen untersucht werden, ob eine effiziente B- und T-Zellantwort induziert werden kann. Sollten die Versuche erfolgreich sein wären die so hergestellten VLPs interessante Kandidaten für eine prophylaktische - oder eine therapeutische Vakzine.

## 7 Summary

**Generation, isolation and functional characterization of cell permeable virus like particles (HBV-capside) as an carrier for HCV-Antigens to induce an efficient B- and T-cell response.**

The hepatitis c virus is a single-stranded (+)-strand RNA-virus. It belongs to the genus *Hepacivirus* a member of the family *Flaviviridae*. It is classified into 6 different genotypes and 30 subtypes with a different geographic distribution. The infection with HCV can cause an acute hepatitis that can lead to a chronic infection associated with the development of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). Because of the enormous global meaning, there are currently 170 million people infected with HCV worldwide, the insufficient therapeutic options and the lack of a prophylactic vaccine it would be of great importance to develop an HCV specific vaccine. This way it would be possible to prevent the spread of HCV-infection with passing into liver cirrhosis and to reach primary prevention against HCV-induced HCCs.

Because it is expected that especially the lack of an efficient t-cell response is responsible for the chronicity of a HCV infection there are increased approaches to develop HCV specific T-cell vaccines.

The aim of this project was to establish more basics for the development of a HCV vaccine. This has been achieved by cell permeable virus like particles (VLPs) based on the capsid from the hepatitis B virus presenting HCV specific antigens on their surface. On the one hand the highly ordered structure should induce an efficient humeral immune answer. On the other hand the membrane permeability should allow a transfer of the particles into the cytoplasm and a proteasomal degradation to obtain the efficient loading of MHC class I complexes for the induction of a t-cell mediated immune response. In this work correct assembled cell permeable particles carrying HCV specific antigens were generated and isolated. The ability of membrane permeability could be shown *in vitro* and *in vivo*. In further projects it must be investigated in first immunization trials if it is possible to induce an efficient B- and T-cell response. If these tests prove positive in this way produced VLPs were interesting prophylactic or therapeutic vaccine candidates.

## 8 Literaturverzeichnis

Aden, D. P., A. Fogel, et al. (1979). "Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line." Nature **282**(5739): 615-6.

Alary, M., J. R. Joly, et al. (2005). "Lack of evidence of sexual transmission of hepatitis C virus in a prospective cohort study of men who have sex with men." Am J Public Health **95**(3): 502-5.

Alter, M. J. (2002). "Prevention of spread of hepatitis C." Hepatology **36**(5 Suppl 1): S93-8.

Altmann, F., E. Staudacher, et al. (1999). "Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins." Glycoconj J **16**(2): 109-23.

Argentini, C., D. Genovese, et al. (2009). "HCV genetic variability: from quasispecies evolution to genotype classification." Future Microbiol **4**(3): 359-73.

Arthanari, Y., A. Pluen, et al. (2010). "Delivery of therapeutic shRNA and siRNA by Tat fusion peptide targeting BCR-ABL fusion gene in Chronic Myeloid Leukemia cells." J Control Release **145**(3): 272-80.

Astriab-Fisher, A., D. S. Sergueev, et al. (2000). "Antisense inhibition of P-glycoprotein expression using peptide-oligonucleotide conjugates." Biochem Pharmacol **60**(1): 83-90.

Ball, J. M., D. Y. Graham, et al. (1999). "Recombinant Norwalk virus-like particles given orally to volunteers: phase I study." Gastroenterology **117**(1): 40-8.

Baneyx, F. and M. Mujacic (2004). "Recombinant protein folding and misfolding in Escherichia coli." Nat Biotechnol **22**(11): 1399-408.

Baranov, A. V. and V. V. Maleev (2009). "[Association between HCV RNA level and anti-HCV antibodies during chronic hepatitis C]." Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol(5): 19-22.

Bartosch, B., J. Dubuisson, et al. (2003). "Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes." J Exp Med **197**(5): 633-42.

Bartosch, B., G. Verney, et al. (2005). "An interplay between hypervariable region 1 of the hepatitis C virus E2 glycoprotein, the scavenger receptor BI, and high-density lipoprotein promotes both enhancement of infection and protection against neutralizing antibodies." J Virol **79**(13): 8217-29.

Baumert, T. F., S. Ito, et al. (1998). "Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells." J Virol **72**(5): 3827-36.

Baumert, T. F., J. Vergalla, et al. (1999). "Hepatitis C virus-like particles synthesized in insect cells as a potential vaccine candidate." Gastroenterology **117**(6): 1397-407.

Becker-Hapak, M., S. S. McAllister, et al. (2001). "TAT-mediated protein transduction into mammalian cells." Methods **24**(3): 247-56.

Bentley, G. A. and R. A. Mariuzza (1996). "The structure of the T cell antigen receptor." Annu Rev Immunol **14**: 563-90.

- Beutler, B. (2004). "Innate immunity: an overview." Mol Immunol **40**(12): 845-59.
- Birnbaum, F. and M. Nassal (1990). "Hepatitis B virus nucleocapsid assembly: primary structure requirements in the core protein." J Virol **64**(7): 3319-30.
- Bleifuss, E., T. Kammertoens, et al. (2006). "The translocation motif of hepatitis B virus improves protein vaccination." Cell Mol Life Sci **63**(5): 627-35.
- Blight, K. J., J. A. McKeating, et al. (2002). "Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication." J Virol **76**(24): 13001-14.
- Bliss, J., V. Van Cleave, et al. (1996). "IL-12, as an adjuvant, promotes a T helper 1 cell, but does not suppress a T helper 2 cell recall response." J Immunol **156**(3): 887-94.
- Blonski, W. and K. R. Reddy (2008). "Hepatitis C virus infection and hepatocellular carcinoma." Clin Liver Dis **12**(3): 661-74, x.
- Borisova, G. P., I. Berzins, et al. (1989). "Recombinant core particles of hepatitis B virus exposing foreign antigenic determinants on their surface." FEBS Lett **259**(1): 121-4.
- Bostan, N. and T. Mahmood (2010). "An overview about hepatitis C: a devastating virus." Crit Rev Microbiol **36**(2): 91-133.
- Bottcher, B., S. A. Wynne, et al. (1997). "Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy." Nature **386**(6620): 88-91.
- Boulter, N. R., E. J. Glass, et al. (1995). "Theileria annulata sporozoite antigen fused to hepatitis B core antigen used in a vaccination trial." Vaccine **13**(13): 1152-60.
- Bowen, D. G. and C. M. Walker (2005). "Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection." Nature **436**(7053): 946-52.
- Branch, A. D., D. D. Stump, et al. (2005). "The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others." Semin Liver Dis **25**(1): 105-17.
- Brandenburg, B., L. Stockl, et al. (2005). "A novel system for efficient gene transfer into primary human hepatocytes via cell-permeable hepatitis B virus-like particle." Hepatology **42**(6): 1300-9.
- Bressanelli, S., L. Tomei, et al. (2002). "Structural analysis of the hepatitis C virus RNA polymerase in complex with ribonucleotides." J Virol **76**(7): 3482-92.
- Brettler, D. B., H. J. Alter, et al. (1990). "Prevalence of hepatitis C virus antibody in a cohort of hemophilia patients." Blood **76**(1): 254-6.
- Brooks, N. A., D. S. Pouniotis, et al. (2010). "A membrane penetrating multiple antigen peptide (MAP) incorporating ovalbumin CD8 epitope induces potent immune responses in mice." Biochim Biophys Acta **1798**(12): 2286-95.
- Brown, R. J., V. S. Juttla, et al. (2005). "Evolutionary dynamics of hepatitis C virus envelope genes during chronic infection." J Gen Virol **86**(Pt 7): 1931-42.
- Burckstummer, T., M. Kriegs, et al. (2006). "Raf-1 kinase associates with Hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication." FEBS Lett **580**(2): 575-80.

- Burt, R. D., H. Thiede, et al. (2009). "Serosorting for hepatitis C status in the sharing of injection equipment among Seattle area injection drug users." Drug Alcohol Depend **105**(3): 215-20.
- Castello, G., S. Scala, et al. (2010). "HCV-related hepatocellular carcinoma: From chronic inflammation to cancer." Clin Immunol **134**(3): 237-50.
- Cavalheiro Nde, P. (2007). "Sexual transmission of hepatitis C." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **49**(5): 271-7.
- Chambers, M. A., G. Dougan, et al. (1996). "Chimeric hepatitis B virus core particles as probes for studying peptide-integrin interactions." J Virol **70**(6): 4045-52.
- Champion, J. A. and S. Mitragotri (2006). "Role of target geometry in phagocytosis." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(13): 4930-4.
- Chaplin, D. D. (2010). "Overview of the immune response." J Allergy Clin Immunol **125**(2 Suppl 2): S3-23.
- Chayama, K. and C. N. Hayes (2010). "Hepatitis C virus: How genetic variability affects pathobiology of disease." J Gastroenterol Hepatol **26 Suppl 1**: 83-95.
- Chen, A., G. Ahlen, E. D. Brenndorfer, A. Brass, F. Holmstrom, M. Chen, J. Soderholm, D. R. Milich, L. Frelin, M. Sallberg (2011). "Heterologous T cells can help restore function in dysfunctional hepatitis C virus nonstructural 3/4A-specific T cells during therapeutic vaccination." J. Immunol **186**(5107).
- Chen, G., L. Da, et al. (2010). "HIV-Tat-mediated delivery of an LPTS functional fragment inhibits telomerase activity and tumorigenicity of hepatoma cells." Gastroenterology **140**(1): 332-43.
- Chen, Y. H., A. Diassiti, et al. (2006). "Genetic fusion of proteins to the SIV Tat protein enhances their immunogenicity." Vaccine **24**(6): 708-15.
- Choo, Q. L., G. Kuo, et al. (1994). "Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(4): 1294-8.
- Choo, Q. L., G. Kuo, et al. (1989). "Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome." Science **244**(4902): 359-62.
- Clarke, B. E., A. L. Brown, et al. (1990). "Presentation and immunogenicity of viral epitopes on the surface of hybrid hepatitis B virus core particles produced in bacteria." J Gen Virol **71** (Pt 5): 1109-17.
- Conner, S. D. and S. L. Schmid (2003). "Regulated portals of entry into the cell." Nature **422**(6927): 37-44.
- Conway, J. F., N. Cheng, et al. (1997). "Visualization of a 4-helix bundle in the hepatitis B virus capsid by cryo-electron microscopy." Nature **386**(6620): 91-4.
- Conway JF, W. N., Belnap DM, Cheng N, Stahl SJ, Wingfield PT, Steven AC (2003). "Characterisation of a conformational epitope on hepatitis B virus core antigen and quasiequivalent variations in antibody binding." J. Virol **77**: 6466-73.
- Cucchiaroni, M., A. R. Kammer, et al. (2000). "Vigorous peripheral blood cytotoxic T cell response during the acute phase of hepatitis C virus infection." Cell Immunol **203**(2): 111-23.

- Czepiel, J., G. Biesiada, et al. (2008). "Viral hepatitis C." Pol Arch Med Wewn **118**(12): 734-40.
- Darwish, N. M., M. O. Abbas, et al. (1995). "Study of the high prevalence of HCV in Egypt." J Egypt Public Health Assoc **70**(3-4): 397-414.
- Davis, T. R., T. J. Wickham, et al. (1993). "Comparative recombinant protein production of eight insect cell lines." In Vitro Cell Dev Biol Anim **29A**(5): 388-90.
- de Groot, N. S. and S. Ventura (2006). "Effect of temperature on protein quality in bacterial inclusion bodies." FEBS Lett **580**(27): 6471-6.
- Deleersnyder, V., A. Pillez, et al. (1997). "Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes." J Virol **71**(1): 697-704.
- Derossi, D., S. Calvet, et al. (1996). "Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent." J Biol Chem **271**(30): 18188-93.
- Derossi, D., G. Chassaing, et al. (1998). "Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery." Trends Cell Biol **8**(2): 84-7.
- Derossi, D., A. H. Joliot, et al. (1994). "The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes." J Biol Chem **269**(14): 10444-50.
- Di Bisceglie, A. M. and J. H. Hoofnagle (2002). "Optimal therapy of hepatitis C." Hepatology **36**(5 Suppl 1): S121-7.
- Diepolder, H. M., R. Zachoval, et al. (1995). "Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection." Lancet **346**(8981): 1006-7.
- Dietz, G. P. (2010). "Cell-penetrating peptide technology to deliver chaperones and associated factors in diseases and basic research." Curr Pharm Biotechnol **11**(2): 167-74.
- Ding, F. X., F. Wang, et al. (2009). "Multiepitope peptide-loaded virus-like particles as a vaccine against hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma." Hepatology **49**(5): 1492-502.
- Djordjevic, V., K. Stojanovic, et al. (2000). "Prevention of nosocomial transmission of hepatitis C infection in a hemodialysis unit. A prospective study." Int J Artif Organs **23**(3): 181-8.
- Donahue, J. G., A. Munoz, et al. (1992). "The declining risk of post-transfusion hepatitis C virus infection." N Engl J Med **327**(6): 369-73.
- Dong, H., L. Nilsson, et al. (1996). "Co-variation of tRNA abundance and codon usage in Escherichia coli at different growth rates." J Mol Biol **260**(5): 649-63.
- Dvory-Sobol, H., P. S. Pang, et al. (2010). "The Future of HCV Therapy: NS4B as an Antiviral Target." Viruses **2**(11): 2481-2492.
- Elliott, G. and P. O'Hare (1999). "Intercellular trafficking of VP22-GFP fusion proteins." Gene Ther **6**(1): 149-51.
- Encke, J., J. Findelee, et al. (2005). "Prophylactic and therapeutic vaccination with dendritic cells against hepatitis C virus infection." Clin Exp Immunol **142**(2): 362-9.

- Encke, J., J. zu Putlitz, et al. (1999). "DNA vaccines." Intervirology **42**(2-3): 117-24.
- Essafi, M., A. D. Baudot, et al. (2010). "Cell-penetrating TAT-FOXO3 fusion proteins induce apoptotic cell death in leukemic cells." Mol Cancer Ther **10**(1): 37-46.
- Estes, M. K., J. M. Ball, et al. (2000). "Norwalk virus vaccines: challenges and progress." J Infect Dis **181** Suppl 2: S367-73.
- Farci, P., H. J. Alter, et al. (1996). "Hepatitis C virus-associated fulminant hepatic failure." N Engl J Med **335**(9): 631-4.
- Farci, P., H. J. Alter, et al. (1994). "Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated in vitro neutralization." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(16): 7792-6.
- Farci, P., A. Shimoda, et al. (2000). "The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies." Science **288**(5464): 339-44.
- Farci, P., A. Shimoda, et al. (1996). "Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(26): 15394-9.
- Fattori, E., I. Zampaglione, et al. (2006). "Efficient immunization of rhesus macaques with an HCV candidate vaccine by heterologous priming-boosting with novel adenoviral vectors based on different serotypes." Gene Ther **13**(14): 1088-96.
- Feinstone, S. M. and R. H. Purcell (1978). "Non-A, non-B hepatitis." Annu Rev Med **29**: 359-66.
- Ferenci, P. (2006). "Pegylated interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C: the role of combination therapy today, tomorrow and in the future." Minerva Gastroenterol Dietol **52**(2): 157-74.
- Fittipaldi, A., A. Ferrari, et al. (2003). "Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins." J Biol Chem **278**(36): 34141-9.
- Flisiak, R. and I. Flisiak (2010). "Albinterferon-alpha 2b: a new treatment option for hepatitis C." Expert Opin Biol Ther **10**(10): 1509-15.
- Foerg, C. and H. P. Merkle (2008). "On the biomedical promise of cell penetrating peptides: limits versus prospects." J Pharm Sci **97**(1): 144-62.
- Folgori, A., S. Capone, et al. (2006). "A T-cell HCV vaccine eliciting effective immunity against heterologous virus challenge in chimpanzees." Nat Med **12**(2): 190-7.
- Fontana, R. J. and A. S. Lok (2002). "Noninvasive monitoring of patients with chronic hepatitis C." Hepatology **36**(5 Suppl 1): S57-64.
- Frick, D. N., R. S. Rypma, et al. (2004). "Electrostatic analysis of the hepatitis C virus NS3 helicase reveals both active and allosteric site locations." Nucleic Acids Res **32**(18): 5519-28.
- Friebe, P. and R. Bartenschlager (2002). "Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication." J Virol **76**(11): 5326-38.

- Galloway, C. A., M. P. Sowden, et al. (2003). "Increasing the yield of soluble recombinant protein expressed in *E. coli* by induction during late log phase." *Biotechniques* **34**(3): 524-6, 528, 530.
- Gazit, E., W. J. Lee, et al. (1994). "Mode of action of the antibacterial cecropin B2: a spectrofluorometric study." *Biochemistry* **33**(35): 10681-92.
- Gerlach, J. T., H. M. Diepolder, et al. (1999). "Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C." *Gastroenterology* **117**(4): 933-41.
- Gerlach, J. T., H. M. Diepolder, et al. (2003). "Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance." *Gastroenterology* **125**(1): 80-8.
- Giannini, C. and C. Brechot (2003). "Hepatitis C virus biology." *Cell Death Differ* **10 Suppl 1**: S27-38.
- Gill, H. S., J. Soderholm, et al. (2010). "Cutaneous vaccination using microneedles coated with hepatitis C DNA vaccine." *Gene Ther* **17**(6): 811-4.
- Gosert, R., D. Egger, et al. (2003). "Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons." *J Virol* **77**(9): 5487-92.
- Grakoui, A., D. W. McCourt, et al. (1993). "Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites." *J Virol* **67**(5): 2832-43.
- Grakoui, A., N. H. Shoukry, et al. (2003). "HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help." *Science* **302**(5645): 659-62.
- Griffin, S. D., L. P. Beales, et al. (2003). "The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine." *FEBS Lett* **535**(1-3): 34-8.
- Gruner, N. H., T. J. Gerlach, et al. (2000). "Association of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells with viral clearance in acute hepatitis C." *J Infect Dis* **181**(5): 1528-36.
- Habersetzer, F., G. Honnet, C. Bain, M. Maynard-Muet, V. Leroy, J. P. Zarski, C. Feray, T. F. Baumert, J. P. Bronowicki, M. Doffoel, C. Trepo, D. Agathon, M. L. Toh, M. Baudin, J. Y. Bonnefoy, J. M. Limacher, G. Inchauspe (2011). "A poxvirus vaccine is safe, induces T-cell responses, and decreases viral load in patients with chronic hepatitis C." *Gastroenterology* **141**: 890.
- Hafner, A., B. Brandenburg, et al. (2003). "Reconstitution of gene expression from a regulatory-protein-deficient hepatitis B virus genome by cell-permeable HBx protein." *EMBO Rep* **4**(8): 767-73.
- Hallbrink, M., A. Floren, et al. (2001). "Cargo delivery kinetics of cell-penetrating peptides." *Biochim Biophys Acta* **1515**(2): 101-9.
- Harding, C. V. (1993). "Cellular and molecular aspects of antigen processing and the function of class II MHC molecules." *Am J Respir Cell Mol Biol* **8**(5): 461-7.
- Harding, C. V. (1996). "Class II antigen processing: analysis of compartments and functions." *Crit Rev Immunol* **16**(1): 13-29.
- Harding, C. V. and H. J. Geuze (1993). "Immunogenic peptides bind to class II MHC molecules in an early lysosomal compartment." *J Immunol* **151**(8): 3988-98.



- Harris, E., K. L. Holden, et al. (2006). "Molecular biology of flaviviruses." Novartis Found Symp **277**: 23-39; discussion 40, 71-3, 251-3.
- Harro, C. D., Y. Y. Pang, et al. (2001). "Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine." J Natl Cancer Inst **93**(4): 284-92.
- Hawiger, J. (1999). "Noninvasive intracellular delivery of functional peptides and proteins." Curr Opin Chem Biol **3**(1): 89-94.
- Heath, W. R. and F. R. Carbone (2001). "Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance." Nat Rev Immunol **1**(2): 126-34.
- Heijtkink, R. A., J. Snobl, et al. (1995). "Quantitative measurement of HBeAg in chronic hepatitis B: a comparison between a radioimmunoassay, a fluorescence ELISA and a chemiluminescence ELISA." J Med Virol **47**(3): 245-50.
- Helle, F., A. Goffard, et al. (2007). "The neutralizing activity of anti-hepatitis C virus antibodies is modulated by specific glycans on the E2 envelope protein." J Virol **81**(15): 8101-11.
- Herbst-Kralovetz, M., H. Mason, et al. (2010). "Norwalk virus-like particles as vaccines." Expert Rev Vaccines(3): 299-307.
- Higuchi, M., E. Tanaka, et al. (2002). "Epidemiology and clinical aspects on hepatitis C." Jpn J Infect Dis **55**(3): 69-77.
- Hillemann, A., B. Brandenburg, et al. (2005). "Protein transduction with bacterial cytosine deaminase fused to the TLM intercellular transport motif induces profound chemosensitivity to 5-fluorocytosine in human hepatoma cells." J Hepatol **43**(3): 442-50.
- Himmelsbach, K., D. Sauter, et al. (2009). "New aspects of an anti-tumour drug: sorafenib efficiently inhibits HCV replication." Gut **58**(12): 1644-53.
- Honda, M., E. A. Brown, et al. (1996). "Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA." Rna **2**(10): 955-68.
- Hoofnagle, J. H. (1997). "Hepatitis C: the clinical spectrum of disease." Hepatology **26**(3 Suppl 1): 15S-20S.
- Hoofnagle, J. H. (2002). "Course and outcome of hepatitis C." Hepatology **36**(5 Suppl 1): S21-9.
- Hoofnagle, J. H., A. S. Wahed, et al. (2009). "Early changes in hepatitis C virus (HCV) levels in response to peginterferon and ribavirin treatment in patients with chronic HCV genotype 1 infection." J Infect Dis **199**(8): 1112-20.
- Houghton, M. and S. Abrignani (2005). "Prospects for a vaccine against the hepatitis C virus." Nature **436**(7053): 961-6.
- Indolfi, G. and M. Resti (2009). "Perinatal transmission of hepatitis C virus infection." J Med Virol **81**(5): 836-43.
- Jaeckel, E., M. Cornberg, et al. (2001). "Treatment of acute hepatitis C with interferon alfa-2b." N Engl J Med **345**(20): 1452-7.

- Jain, M. K. and C. Zoellner (2010). "Role of ribavirin in HCV treatment response: now and in the future." Expert Opin Pharmacother **11**(4): 673-83.
- Jamieson, B. D. and R. Ahmed (1989). "T cell memory. Long-term persistence of virus-specific cytotoxic T cells." J Exp Med **169**(6): 1993-2005.
- Janeway, C. A., Jr. (2001). "How the immune system protects the host from infection." Microbes Infect **3**(13): 1167-71.
- Jo, J., U. Aichele, et al. (2009). "Analysis of CD8+ T-cell-mediated inhibition of hepatitis C virus replication using a novel immunological model." Gastroenterology **136**(4): 1391-401.
- Jones, I. and Y. Morikawa (1996). "Baculovirus vectors for expression in insect cells." Curr Opin Biotechnol **7**(5): 512-6.
- June, C. H., J. A. Ledbetter, et al. (1990). "Role of the CD28 receptor in T-cell activation." Immunol Today **11**(6): 211-6.
- Kane, J. F. (1995). "Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in Escherichia coli." Curr Opin Biotechnol **6**(5): 494-500.
- Kaplan, D. E., K. Sugimoto, et al. (2007). "Discordant role of CD4 T-cell response relative to neutralizing antibody and CD8 T-cell responses in acute hepatitis C." Gastroenterology **132**(2): 654-66.
- Kappler, J. W., N. Roehm, et al. (1987). "T cell tolerance by clonal elimination in the thymus." Cell **49**(2): 273-80.
- Karmochkine, M., F. Carrat, et al. (1998). "[Transmission modes of hepatitis C virus]." Presse Med **27**(18): 871-6.
- Kim, J., V. Gambhir, et al. (2010). "Delivery of Exogenous Antigens to Induce Cytotoxic CD8+ T Lymphocyte Responses." J Biomed Biotechnol **2010**: 218752.
- Kratz, P. A., B. Bottcher, et al. (1999). "Native display of complete foreign protein domains on the surface of hepatitis B virus capsids." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(5): 1915-20.
- Krieger, N., V. Lohmann, et al. (2001). "Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations." J Virol **75**(10): 4614-24.
- Kristensen, O., A. Sundoy, et al. (2009). "[Short-term treatment of Hepatitis C in heroin-dependent patients]." Tidsskr Nor Laegeforen **129**(16): 1639-42.
- Kronenberger, B. and S. Zeuzem (2009). "Current and future treatment options for HCV." Ann Hepatol **8**(2): 103-12.
- Kuzushita, N., S. H. Gregory, et al. (2006). "Vaccination with protein-transduced dendritic cells elicits a sustained response to hepatitis C viral antigens." Gastroenterology **130**(2): 453-64.
- Lachmann, S., H. Meisel, et al. (1999). "Characterization of potential insertion sites in the core antigen of hepatitis B virus by the use of a short-sized model epitope." Intervirology **42**(1): 51-6.

- Ladner, S. K., M. J. Otto, et al. (1997). "Inducible expression of human hepatitis B virus (HBV) in stably transfected hepatoblastoma cells: a novel system for screening potential inhibitors of HBV replication." Antimicrob Agents Chemother **41**(8): 1715-20.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Lagging, M., R. Wejstal, et al. (2009). "Treatment of hepatitis C virus infection: updated Swedish Consensus recommendations." Scand J Infect Dis **41**(6-7): 389-402.
- Lauer, G. M. and B. D. Walker (2001). "Hepatitis C virus infection." N Engl J Med **345**(1): 41-52.
- Laufer, S. D. and T. Restle (2008). "Peptide-mediated cellular delivery of oligonucleotide-based therapeutics in vitro: quantitative evaluation of overall efficacy employing easy to handle reporter systems." Curr Pharm Des **14**(34): 3637-55.
- Laufs, R., S. Polywka, et al. (2002). "[Hepatitis C. Virology, transmission modes, clinical aspects, prevention and therapy]." Anaesthesist **51**(11): 884-9.
- Law, M., T. Maruyama, et al. (2008). "Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge." Nat Med **14**(1): 25-7.
- Lechmann, M., K. Murata, et al. (2001). "Hepatitis C virus-like particles induce virus-specific humoral and cellular immune responses in mice." Hepatology **34**(2): 417-23.
- Lechner, F., D. K. Wong, et al. (2000). "Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus." J Exp Med **191**(9): 1499-512.
- Lepere, C., M. Regeard, et al. (2007). "The translocation motif of hepatitis B virus envelope proteins is dispensable for infectivity." J Virol **81**(14): 7816-8.
- Lesburg, C. A., M. B. Cable, et al. (1999). "Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site." Nat Struct Biol **6**(10): 937-43.
- Li, X., L. J. Jeffers, et al. (1995). "Identification of hepatitis C virus by immunoelectron microscopy." J Viral Hepat **2**(5): 227-34.
- Lindenbach, B. D., M. J. Evans, et al. (2005). "Complete replication of hepatitis C virus in cell culture." Science **309**(5734): 623-6.
- Liu-Young, G. and M. J. Kozal (2008). "Hepatitis C protease and polymerase inhibitors in development." AIDS Patient Care STDS **22**(6): 449-57.
- Lizzano, R. A., B. Yang, et al. (2010). "The C-terminal region of the hepatitis B virus X protein is essential for its stability and function." Virus Res **155**(1): 231-9.
- Ljunggren, H. G. and K. Karre (1990). "In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition." Immunol Today **11**(7): 237-44.
- Lochmann, D., E. Jauk, et al. (2004). "Drug delivery of oligonucleotides by peptides." Eur J Pharm Biopharm **58**(2): 237-51.
- Lopez-Labrador, F. X. (2008). "Hepatitis C Virus NS3/4A Protease Inhibitors." Recent Pat Antiinfect Drug Discov **3**(3): 157-67.

- Ludwig, C. and R. Wagner (2007). "Virus-like particles-universal molecular toolboxes." Curr Opin Biotechnol **18**(6): 537-45.
- Lugo-Baruqui, A., C. A. Bautista Lopez, et al. (2009). "[Novel treatments for hepatitis C viral infection and the hepatic fibrosis]." Rev Med Chil **137**(2): 280-8.
- Luik, P., C. Chew, et al. (2009). "The 3-dimensional structure of a hepatitis C virus p7 ion channel by electron microscopy." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(31): 12712-6.
- Lundberg, P. and U. Langel (2003). "A brief introduction to cell-penetrating peptides." J Mol Recognit **16**(5): 227-33.
- Lyra, A. C., X. Fan, et al. (2004). "Molecular biology and clinical implication of hepatitis C virus." Braz J Med Biol Res **37**(5): 691-5.
- Lytle, J. R., L. Wu, et al. (2002). "Domains on the hepatitis C virus internal ribosome entry site for 40s subunit binding." Rna **8**(8): 1045-55.
- MacDonald, D. C., M. Nelson, et al. (2008). "Hepatocellular carcinoma, human immunodeficiency virus and viral hepatitis in the HAART era." World J Gastroenterol **14**(11): 1657-63.
- Maiolo, J. R., M. Ferrer, et al. (2005). "Effects of cargo molecules on the cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides." Biochim Biophys Acta **1712**(2): 161-72.
- Mariyanna, L., P. Priyadarshini, et al. (2012). "Excision of HIV-1 proviral DNA by recombinant cell permeable tre-recombinase." PLoS One **7**(2): e31576.
- Marrack, P. and J. Kappler (1987). "The T cell receptor." Science **238**(4830): 1073-9.
- Martinelli, C. and J. M. Reichhart (2005). "Evolution and integration of innate immune systems from fruit flies to man: lessons and questions." J Endotoxin Res **11**(4): 243-8.
- Matsuzaki, K. (1998). "Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides." Biochim Biophys Acta **1376**(3): 391-400.
- McDonnell, A. M., B. W. Robinson, et al. (2010). "Tumor antigen cross-presentation and the dendritic cell: where it all begins?" Clin Dev Immunol **2010**: 539519.
- McDuffie, M., N. Roehm, et al. (1987). "T cell receptor/MHC interactions in the thymus and the shaping of the T cell repertoire." Transplant Proc **19**(6 Suppl 7): 111-6.
- Memarnejadian, A. and F. Roohvand (2010). "Fusion of HBsAg and prime/boosting augment Th1 and CTL responses to HCV polytope DNA vaccine." Cell Immunol **261**(2): 93-8.
- Mengshol, J. A., L. Golden-Mason, et al. (2007). "Mechanisms of Disease: HCV-induced liver injury." Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol **4**(11): 622-34.
- Mihailova, M., M. Boos, et al. (2006). "Recombinant virus-like particles as a carrier of B- and T-cell epitopes of hepatitis C virus (HCV)." Vaccine **24**(20): 4369-77.
- Milich, D. R. and A. McLachlan (1986). "The nucleocapsid of hepatitis B virus is both a T-cell-independent and a T-cell-dependent antigen." Science **234**(4782): 1398-401.
- Min, S. H., D. M. Kim, et al. (2010). "Gene delivery using a derivative of the protein transduction domain peptide, K-Antp." Biomaterials **31**(7): 1858-64.

- Mitamura, K. (1995). "[Structure and replication of HBV]." Nippon Rinsho **53 Suppl**(Pt 2): 3-12.
- Mosmann, T. R., H. Cherwinski, et al. (1986). "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." J Immunol **136**(7): 2348-57.
- Murakami, S. (2004). "[Function of HBV proteins and control of HBV replication]." Nippon Rinsho **62 Suppl 8**: 26-32.
- Nakabayashi, H., K. Taketa, et al. (1982). "Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium." Cancer Res **42**(9): 3858-63.
- Negro, F. (2010). "Adverse effects of drugs in the treatment of viral hepatitis." Best Pract Res Clin Gastroenterol **24**(2): 183-92.
- Nishikawa, M., T. Otsuki, et al. (2010). "Induction of tumor-specific immune response by gene transfer of Hsp70-cell-penetrating peptide fusion protein to tumors in mice." Mol Ther **18**(2): 421-8.
- Oess, S. and E. Hildt (2000). "Novel cell permeable motif derived from the PreS2-domain of hepatitis-B virus surface antigens." Gene Ther **7**(9): 750-8.
- Oguchi, H., M. Terashima, et al. (1990). "Prevalence of anti-HCV in patients on long-term hemodialysis." Nippon Jinzo Gakkai Shi **32**(3): 313-7.
- Parnes, J. R. (1989). "Molecular biology and function of CD4 and CD8." Adv Immunol **44**: 265-311.
- Parthiban, R., S. Shanmugam, et al. (2009). "Transmission of hepatitis C virus infection from asymptomatic mother to child in southern India." Int J Infect Dis **13**(6): e394-400.
- Paul, W. E., M. Brown, et al. (1987). "Regulation of B-lymphocyte activation, proliferation, and differentiation." Ann N Y Acad Sci **505**: 82-9.
- Paula, T., R. Pablo, et al. (2009). "New drug targets for hepatitis C and other Flaviviridae viruses." Infect Disord Drug Targets **9**(2): 133-47.
- Pavlovic, D., D. C. Neville, et al. (2003). "The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(10): 6104-8.
- Pawlotsky, J. M. (2009). "Hepatitis: HCV variability, the immune system and resistance to antiviral drugs." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **6**(7): 383-5.
- Penin, F., J. Dubuisson, et al. (2004). "Structural biology of hepatitis C virus." Hepatology **39**(1): 5-19.
- Pestka, J. M., M. B. Zeisel, et al. (2007). "Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(14): 6025-30.
- Pietersz, G. A., W. Li, et al. (2001). "A 16-mer peptide (RQIKIWFQNRRMKWKK) from antennapedia preferentially targets the Class I pathway." Vaccine **19**(11-12): 1397-405.

- Pleiman, C. M., D. D'Ambrosio, et al. (1994). "The B-cell antigen receptor complex: structure and signal transduction." Immunol Today **15**(9): 393-9.
- Podack, E. R., H. Hengartner, et al. (1991). "A central role of perforin in cytolysis?" Annu Rev Immunol **9**: 129-57.
- Pooga, M., M. Hallbrink, et al. (1998). "Cell penetration by transportan." Faseb J **12**(1): 67-77.
- Pouny, Y., D. Rapaport, et al. (1992). "Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes." Biochemistry **31**(49): 12416-23.
- Pradat, P. and C. Trepo (2000). "HCV: epidemiology, modes of transmission and prevention of spread." Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol **14**(2): 201-10.
- Prochiantz, A. (1996). "Getting hydrophilic compounds into cells: lessons from homeopeptides." Curr Opin Neurobiol **6**(5): 629-34.
- Pumpens, P. and E. Grens (2001). "HBV core particles as a carrier for B cell/T cell epitopes." Intervirology **44**(2-3): 98-114.
- Richard, J. P., K. Melikov, et al. (2005). "Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors." J Biol Chem **280**(15): 15300-6.
- RKI (2010).
- Roberts, E. A. and L. Yeung (2002). "Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection." Hepatology **36**(5 Suppl 1): S106-13.
- Rojas, M., J. P. Donahue, et al. (1998). "Genetic engineering of proteins with cell membrane permeability." Nat Biotechnol **16**(4): 370-5.
- Rojas, M., S. Yao, et al. (1996). "Controlling epidermal growth factor (EGF)-stimulated Ras activation in intact cells by a cell-permeable peptide mimicking phosphorylated EGF receptor." J Biol Chem **271**(44): 27456-61.
- Rong, L. and A. S. Perelson (2010). "Treatment of hepatitis C virus infection with interferon and small molecule direct antivirals: viral kinetics and modeling." Crit Rev Immunol **30**(2): 131-48.
- Ruedl, C., K. Schwarz, et al. (2005). "Virus-like particles as carriers for T-cell epitopes: limited inhibition of T-cell priming by carrier-specific antibodies." J Virol **79**(2): 717-24.
- Ruedl, C., T. Storni, et al. (2002). "Cross-presentation of virus-like particles by skin-derived CD8(-) dendritic cells: a dispensable role for TAP." Eur J Immunol **32**(3): 818-25.
- Ruffatti, A., F. Bortolotti, et al. (1992). "Hepatitis C virus infection in hemodialyzed patients detected by first and second generation assays." Nephron **61**(3): 344-5.
- Rustgi, V. K. (2009). "Albinterferon alfa-2b, a novel fusion protein of human albumin and human interferon alfa-2b, for chronic hepatitis C." Curr Med Res Opin **25**(4): 991-1002.
- Sachdev, D. and J. M. Chirgwin (1999). "Properties of soluble fusions between mammalian aspartic proteinases and bacterial maltose-binding protein." J Protein Chem **18**(1): 127-36.

- Said Hassane, F., A. F. Saleh, et al. (2010). "Cell penetrating peptides: overview and applications to the delivery of oligonucleotides." Cell Mol Life Sci **67**(5): 715-26.
- Sakoman, S. (2009). "[Prevention and treatment of hepatitis C in illicit drug users]." Acta Med Croatica **63**(5): 437-42.
- Sallberg, M., L. Frelin, et al. (2009). "DNA vaccine therapy for chronic hepatitis C virus (HCV) infection: immune control of a moving target." Expert Opin Biol Ther **9**(7): 805-15.
- Sambrook J., F. E. F., Maniatis T. (1989). "Molecular Cloning A Laboratory Manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press **Second edition**: 1.25-1.28.
- Sanai, F. M., A. Benmoussa, et al. (2008). "Is serum alanine transaminase level a reliable marker of histological disease in chronic hepatitis C infection?" Liver Int **28**(7): 1011-8.
- Santolini, E., L. Pacini, et al. (1995). "The NS2 protein of hepatitis C virus is a transmembrane polypeptide." J Virol **69**(12): 7461-71.
- Saudrais, C., D. Spehner, et al. (1998). "Intracellular pathway for the generation of functional MHC class II peptide complexes in immature human dendritic cells." J Immunol **160**(6): 2597-607.
- Schein, C. H. (1991). "Optimizing protein folding to the native state in bacteria." Curr Opin Biotechnol **2**(5): 746-50.
- Schmidt, M. (2008). "Herstellung und charakterisierung von virusähnlichen Partikeln auf der Basis von Fusionsproteinen aus HBV-Coreprotein und HCV-Oberflächenproteinen E1 und E2."
- Schodel, F., D. Peterson, et al. (1993). "A virulent Salmonella expressing hybrid hepatitis B virus core/pre-S genes for oral vaccination." Vaccine **11**(2): 143-8.
- Schwarze, S. R. and S. F. Dowdy (2000). "In vivo protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA." Trends Pharmacol Sci **21**(2): 45-8.
- Schwarze, S. R., A. Ho, et al. (1999). "In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse." Science **285**(5433): 1569-72.
- Seef (2002).
- Shiffman, M. L. (2009). "What future for ribavirin?" Liver Int **29 Suppl 1**: 68-73.
- Shoukry, N. H., A. Grakoui, et al. (2003). "Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection." J Exp Med **197**(12): 1645-55.
- Sidorkiewicz, M. and A. Plucienniczak (1994). "[Envelope and core proteins of HBV and their role on the development of hepatitis B]." Postepy Biochem **40**(3): 143-9.
- Silverman, B. C., A. Y. Kim, et al. (2010). "Interferon-induced psychosis as a "psychiatric contraindication" to hepatitis C treatment: a review and case-based discussion." Psychosomatics **51**(1): 1-7.
- Spahn, C. M., J. S. Kieft, et al. (2001). "Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit." Science **291**(5510): 1959-62.

- Stevens, T. L., A. Bossie, et al. (1988). "Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells." Nature **334**(6179): 255-8.
- Stewart, K. M., K. L. Horton, et al. (2008). "Cell-penetrating peptides as delivery vehicles for biology and medicine." Org Biomol Chem **6**(13): 2242-55.
- Stoeckl, L., A. Funk, et al. (2006). "Identification of a structural motif crucial for infectivity of hepatitis B viruses." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(17): 6730-4.
- Tai, C. L., W. K. Chi, et al. (1996). "The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3)." J Virol **70**(12): 8477-84.
- Takaki, A., M. Wiese, et al. (2000). "Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C." Nat Med **6**(5): 578-82.
- Tanaka, T., N. Kato, et al. (1996). "Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome." J Virol **70**(5): 3307-12.
- Thimme, R., V. Lohmann, et al. (2006). "A target on the move: innate and adaptive immune escape strategies of hepatitis C virus." Antiviral Res **69**(3): 129-41.
- Thimme, R., C. Neumann-Haefelin, et al. (2008). "Adaptive immune responses to hepatitis C virus: from viral immunobiology to a vaccine." Biol Chem **389**(5): 457-67.
- Thimme, R., D. Oldach, et al. (2001). "Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection." J Exp Med **194**(10): 1395-406.
- Thitinan, S. and J. T. McConville (2009). "Interferon alpha delivery systems for the treatment of hepatitis C." Int J Pharm **369**(1-2): 121-35.
- Thoren, P. E., D. Persson, et al. (2000). "The antennapedia peptide penetratin translocates across lipid bilayers - the first direct observation." FEBS Lett **482**(3): 265-8.
- Tinega, A. N., R. Pelle, et al. (2009). "Fusion of a cell penetrating peptide from HIV-1 TAT to the Theileria parva antigen Tp2 enhances the stimulation of bovine CD8+ T cell responses." Vet Immunol Immunopathol **130**(1-2): 107-13.
- Torresi, J., D. Johnson, et al. (2012). "Progress in the development of preventive and therapeutic vaccines for hepatitis C virus." J Hepatol **54**(6): 1273-85.
- Tsai, W. L. and R. T. Chung (2010). "Viral hepatocarcinogenesis." Oncogene **29**(16): 2309-24.
- Tsiomenko, A. B., V. V. Lupashin, et al. (1990). "[The nature of N-terminal signal sequence determines the type of intracellular distribution and effectiveness of export of human growth hormone in Saccharomyces cerevisiae]." Mol Biol (Mosk) **24**(4): 1126-33.
- Ulrich, R., A. Lundkvist, et al. (1998). "Chimaeric HBV core particles carrying a defined segment of Puumala hantavirus nucleocapsid protein evoke protective immunity in an animal model." Vaccine **16**(2-3): 272-80.
- Vaughn, J. L., R. H. Goodwin, et al. (1977). "The establishment of two cell lines from the insect Spodoptera frugiperda (Lepidoptera; Noctuidae)." In Vitro **13**(4): 213-7.



- Vcev, A. (2009). "[Management of side effects during antiviral therapy]." Acta Med Croatica **63**(5): 463-7.
- Ventura, S. and A. Villaverde (2006). "Protein quality in bacterial inclusion bodies." Trends Biotechnol **24**(4): 179-85.
- Vieyres, G., X. Thomas, et al. (2010). "Characterization of the envelope glycoproteins associated with infectious hepatitis C virus." J Virol **84**(19): 10159-68.
- Villa, L. L., R. L. Costa, et al. (2005). "Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial." Lancet Oncol **6**(5): 271-8.
- Vives, E. (2005). "Present and future of cell-penetrating peptide mediated delivery systems: "is the Trojan horse too wild to go only to Troy?"" J Control Release **109**(1-3): 77-85.
- von Engelhardt, W. and G. Breves (2000). "Physiologie der Haustiere." **2. Auflage**: 7-13, 213-228.
- Wakita, T., T. Pietschmann, et al. (2005). "Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome." Nat Med **11**(7): 791-6.
- Win, S. J., V. K. Ward, et al. (2010). "Cross-presentation of epitopes on virus-like particles via the MHC I receptor recycling pathway." Immunol Cell Biol.
- Woollard, D. J., A. Grakoui, et al. (2003). "Characterization of HCV-specific Patr class II restricted CD4+ T cell responses in an acutely infected chimpanzee." Hepatology **38**(5): 1297-306.
- Wright, T. L. (2002). "Treatment of patients with hepatitis C and cirrhosis." Hepatology **36**(5 Suppl 1): S185-94.
- Yamaga, A. K. and J. H. Ou (2002). "Membrane topology of the hepatitis C virus NS2 protein." J Biol Chem **277**(36): 33228-34.
- Yasui, K., T. Wakita, et al. (1998). "The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein." J Virol **72**(7): 6048-55.
- Yazdanpanah, Y., G. De Carli, et al. (2005). "Risk factors for hepatitis C virus transmission to health care workers after occupational exposure: a European case-control study." Clin Infect Dis **41**(10): 1423-30.
- Ye, J., S. A. Fox, et al. (2010). "Determination of penetratin secondary structure in live cells with Raman microscopy." J Am Chem Soc **132**(3): 980-8.
- Zampieron, A., H. Jayasekera, et al. (2006). "Sero-conversion of HCV negative patients: a European study on the epidemiology and management of HCV haemodialysis patients." Edtna Erca J **32**(1): 45-50.
- Zhang, P., C. G. Wu, et al. (2007). "Hepatitis C virus epitope-specific neutralizing antibodies in Igs prepared from human plasma." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(20): 8449-54.
- Zhang, X., J. Dou, et al. (2009). "Characterization of the cellular immune response in hepatitis C virus infection." Med Res Rev **29**(6): 843-66.

Zhong, J., P. Gastaminza, et al. (2005). "Robust hepatitis C virus infection in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(26): 9294-9.

Zidovec Lepej, S., D. Dusek, et al. (2009). "[Molecular diagnosis of hepatitis C and hepatitis B infection]." Acta Med Croatica **63**(5): 361-9.

Zlotnick, A., N. Cheng, et al. (1996). "Dimorphism of hepatitis B virus capsids is strongly influenced by the C-terminus of the capsid protein." Biochemistry **35**(23): 7412-21.

Zlotnick, A., I. Palmer, et al. (1999). "Separation and crystallization of T = 3 and T = 4 icosahedral complexes of the hepatitis B virus core protein." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **55**(Pt 3): 717-20.

Zule, W. A., E. C. Costenbader, et al. (2009). "Effects of a hepatitis C virus educational intervention or a motivational intervention on alcohol use, injection drug use, and sexual risk behaviors among injection drug users." Am J Public Health **99** Suppl 1: S180-6.

## 9 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Betreuer Eberhard Hildt danken, der mich in der ganzen Zeit meiner Doktorarbeit so hervorragend betreut hat. Jederzeit hatte er ein offenes Ohr für mich und half mir auf beeindruckende Weise Antworten und Lösungen für sämtliche auftretenden Fragen und Probleme zu finden. Zudem schaffte er es immer wieder, einen aufs Neue zu motivieren, auch wenn die Stimmung mal am Boden war.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Klaus Osterrieder danke ich für die nette und unkomplizierte Zusammenarbeit und Herrn Prof. Dr. Günther Schönrich, dass er sich so spontan bereit erklärt hat, das Drittgutachten zu erstellen.

Vielen Dank auch an Kiyoshi Himmelsbach, der neben Eberhard mein wichtigster Ansprechpartner im Labor war, der stets super geduldig und engagiert war und der sich immer die Zeit genommen hat, mir zu helfen, bei Unklarheiten einen Lösungsweg zu finden.

Herrn Dr. Klaus Boller vom Paul Ehrlich Institut, der die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Partikel gemacht hat, möchte ich für die freundliche Unterstützung danken.

Desweiteren danke ich dem Rest der Arbeitsgruppe, Jasmin Guhl, Daniela Ploen, Miriam Wenzel, Beata Tryniecki, Markus Heilmann, Maja Mucha, Isabella Weisser und Maraike Probst für die Unterstützung aber auch für eine nette Zeit im Institut und für die lustigen Abende in Kiel. Insbesondere meinem Bruder Markus danke ich für die witzige Doktorarbeits- und WG-Zeit in Kiel.

Ein großer Dank gilt im Übrigen meinen Eltern, ohne die mein Studium und meine Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre und meiner Freundin Franziska Beschow, die während des Schreibens meiner Arbeit meine Launen so tapfer ertragen hat.

## **10 Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Michael Heilmann

Lübeck, den 28.03.2013