



Daniela Lieder (Autor)

Untersuchung der Reifung des Hepatitis B Virus Nukleokapsids

Daniela Lieder

**Untersuchung der Reifung des Hepatitis B Virus
Nukleokapsids**



Cuvillier Verlag Göttingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/3644>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	VI
1. EINLEITUNG	1
1.1. Überblick	1
1.2. Genomstruktur und Genomreplikation	2
1.3. Virusstruktur und Genprodukte	5
1.4. Infektionszyklus des Hepatitis B Virus	6
1.5. Das Hepatitis B Virus Core-Protein	9
1.6. Modelle zur Untersuchung der HBV Biologie	12
1.7. Ziel der Arbeit	13
2. MATERIAL	15
2.1. Bakterienstämme	15
2.2. Zelllinien	15
2.3. Baculoviren	16
2.4. Plasmide	17
2.5. Enzyme	25
2.6. Oligonukleotide	25
2.7. Antikörper	26
2.8. Peptide	27
2.9. DNA-Längenstandards	27
2.10. Proteinstandards	28
2.11. Radionukleotide	29
2.12. Nährmedien für die Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	29
2.13. Nährmedien für die Kultivierung eukaryotischer Zellen	30
2.14. Lösungen und Puffer	30
2.15. Geräte	34
2.16. Chemikalien	36
3. METHODEN	38
3.1. Mikrobiologische Methoden	38
3.1.1. Anzucht der <i>E. coli</i> -Stämme	38
3.1.2. Bestimmung der Zelldichte	38
3.1.3. Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	38

3.1.4. Transformation von <i>E. coli</i>	39
3.1.5. Induktion IPTG-induzierbarer Promotoren im präparativen Maßstab	39
3.2. Methoden zur DNA-Analyse und Plasmidkonstruktion	39
3.2.1. Reinigung und Konzentrierung von DNA	39
3.2.1.1. Phenol-Chloroform-Extraktion	39
3.2.1.2. Ethanolfällung	39
3.2.1.3. Isopropanolfällung	40
3.2.2. DNA-Aufreinigung mittels „QIAquick Gel Extraction Kit“	40
3.2.3. Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	40
3.2.4. Polymerase-Ketten-Rektion (PCR)	41
3.2.5. <i>In vitro</i> -Mutagenese mittels überlappender PCR	42
3.2.6. Analytische Agarosegelelektrophorese	43
3.2.7. Präparative Agarosegelelektrophorese und DNA-Extraktion	43
3.2.8. Ligation mit der T4 DNA-Ligase	43
3.2.9. Präparation kleiner Plasmid-DNA-Mengen (nach BIRNBOIM & DOLY, 1979; modifiziert)	44
3.2.10. Plasmidpräparation kleiner Plasmid-DNA-Mengen mit hoher Reinheit	44
3.2.11. Plasmidpräparation im präparativen Maßstab (nach BIRNBOIM & DOLY, 1979; modifiziert)	44
3.2.12. Konzentrationsbestimmung von DNA	45
3.2.13. DNA-Sequenzierung	45
3.2.13.1. Sequenzierung mit $\alpha^{35}\text{S}$ -dATP	45
3.2.13.2. Automatische Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs	46
3.3. Zellkulturtechniken	48
3.3.1. Kultivierung, Transfektion und Infektion von Säugerzellen	48
3.3.1.1. Subkultivierung von Säugerzellen	48
3.3.1.2. Transfektion von HuH7- und HepG2-Zellen mittels Kalziumphosphat	48
3.3.1.3. Infektion von HepG2-Zellen mit rekombinanten Baculoviren (DELANEY & ISOM, 1998)	49
3.3.1.4. Bestimmung von HBsAg und HBeAg	49
3.3.2. Vermehrung von Insektenzellen	49
3.3.2.1. Subkultivierung von Insektenzellen als Suspensionskultur	50
3.3.2.2. Subkultivierung von Insektenzellen als adhärenente Kultur	50
3.3.2.3. Zellzahlbestimmung	50
3.3.3. Arbeiten mit Baculoviren	50

3.3.3.1. Herstellung rekombinanter Baculoviren	50
3.3.3.2. Herstellung eines rekombinanten Baculovirusstocks	51
3.3.3.3. Konzentration von Baculoviren (O'REILLY et al., 1994)	51
3.3.3.4. Titration rekombinanter Baculoviren	52
3.4. Arbeiten mit Proteinen	53
3.4.1. Präparation von <i>E. coli</i> -Zellextrakten	53
3.4.2. Aufreinigung von rekombinant in <i>E. coli</i> -exprimierten Core-Partikeln (HATTON et al., 1992; modifiziert)	53
3.4.3. Lysatherstellung von Zellkulturen	54
3.4.4. Immunpräzipitation	55
3.4.5. HBc-ELISA	55
3.4.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	56
3.4.7. Coomassiefärbung	57
3.4.8. Western Blot (BURNETTE, 1981)	57
3.4.9. Immunblot	58
3.4.10. Farbreaktion mit 3,3-Diaminobenzidintetrahydro–Chlorid (DAB)	58
3.4.11. Chemilumineszenzdetektion von Meerrettich-Peroxidase-Konjugaten	58
3.4.12. Bestimmung der Proteinkonzentration	59
3.5. Southern Blot (SOUTHERN, 1975)	59
3.5.1. DNA-Transfer auf Nylonmembran	59
3.5.2. Hybridisierung mit dem „Alk Phos Direct“-Kit	60
3.5.3. Direktmarkierung mit Alkalischer Phosphatase	60
3.5.4. Detektion von Sonden	60
3.6. Präparation von Nukleokapsiden	61
3.6.1. Anreicherung durch Saccharosegradientenzentrifugation	61
3.6.2. Anreicherung durch Nycodenzgradientenzentrifugation	61
3.6.3. Anreicherung durch isopyknische CsCl-Dichtegradientenzentrifugation	62
3.7. Elektronenmikroskopie	62
3.8. Peptidbindungsansatz	62
3.9. Radioaktive metabolische Markierung von Zellen (pulse-chase-Experimente)	63
3.10. Phosphorylierung von Nukleokapsiden (KANN & GERLICH, 1994; modifiziert)	63
3.11. Bindung von DNA an Nukleokapside	64
3.11.1. ³² P-radioaktive Markierung von linearisierter Plasmid-DNA	64
3.11.2. DNA-Bindungsversuch	65
3.12. Trypsinverdau der Nukleokapside	65

3.12.1. Verwendung von ungekoppeltem Trypsin (SEIFER & STANDRING, 1994; modifiziert)	65
3.12.2. Verwendung von an Gold-gekoppeltem Trypsin (Au-Trypsin)	65
3.13. Bindung von Nukleokapsiden und Mikrosomen	66
3.13.1. Mikrosomenpräparation (PRANGE et al., 1992)	66
3.13.2. Bindungsansatz von Nukleokapsiden und Mikrosomen	66
3.13.3. Ultraflotationsansätze der Bindungsansätze	66
3.14. Nachweis der endogenen Polymerase in HBV-Partikeln	67
3.15. Isolierung von HBV-DNA	68
3.16. Isolierung von ccc (circular covalently closed)-DNA (SUMMERS et al., 1990)	68
3.17. Immunfluoreszenzfärbung	69
3.18. Autoradiographie	70
4. ERGEBNISSE	71
4.1. Vergleichende Untersuchungen reifer und unreifer Nukleokapside mit proteinbiochemischen Methoden	71
4.1.1 Markierung von Nukleokapsiden mit $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP	72
4.1.2. Bindung von DNA an Nukleokapside	74
4.1.3. <i>In vitro</i> -Bindung von Nukleokapsiden an Mikrosomen	76
4.1.4. Partieller Trypsin-Verdau von Nukleokapsiden	78
4.1.5. Verdau von Nukleokapsiden mit Goldpartikel-gekoppeltem Trypsin	82
4.2. Untersuchung der Virionbildung nach Mutation der C-terminalen Aminosäure des Core-Proteins	85
4.2.1. Konstruktion des Plasmids pSVcoreC185S	86
4.2.2. Einfluss der Cystein-Substitution auf die Virionbildung	88
4.2.3. Einfluss der Substitution auf den Reifungsgrad der viralen DNA	90
4.3. Bindung rekombinanter Core-Partikel an Peptide	91
4.3.1. Expression der Core-Partikel in <i>E. coli</i> und deren Aufreinigung	92
4.3.2. Elektronenmikroskopische Darstellung der Core-Partikel	94
4.3.3. Untersuchung der <i>in vitro</i> -Bindung	96
4.4. Nachweis von cccDNA	99
4.4.1. Transduktion des HBV-Genoms mittels rekombinanter Baculoviren des Typs BlueBac4.5-RVHBV1.5	99
4.4.1.1. Konstruktion und Charakterisierung von BlueBac4.5-RVHBV1.5-Baculoviren	100
4.4.1.2. cccDNA-Nachweis im Southern Blot	104

4.4.1.3. Untersuchung der Persistenz der cccDNA	106
4.4.2. Transduktion des HBV-Genoms mittels rekombinanter Baculoviren des Typs BlueBac4.5-SVHBV1.5	108
4.4.2.1. Transfektion von pSVHBV1.5-Konstrukten	110
4.4.2.2. Konstruktion und Charakterisierung von BlueBac4.5- SVHBV1.5-Baculoviren	112
4.4.2.3. Untersuchungen zur Infektionseffizienz mittels Immunfluoreszenzfärbung	115
4.4.2.4. cccDNA-Nachweis mittels HBeAg im Western Blot-Nachweis	116
4.4.2.4.1. Konstruktion des Plasmids pRVHBV1.5 cATG ⁻	117
4.4.2.4.2. Identifikation von HBeAg im Western Blot	120
4.4.2.4.3. HBeAg-Nachweis durch Western Blot nach Transduktion mittels BlueBac4.5-SVHBV1.5-Baculoviren	122
4.4.2.4.4. HBeAg-Nachweis nach Transduktion mittels BlueBac4.5- SVHBV1.5-Baculoviren und Lamivudin-Behandlung	123
5. DISKUSSION	127
5.1. Vergleichende Untersuchungen unreifer und reifer Nukleokapside	127
5.1.1. Untersuchungen der Core-Protein-Phosphorylierung von Nukleokapsiden	130
5.1.2. Untersuchungen zur Konformationsänderung des Core-Proteins	131
5.2. Einfluss der C-terminalen Aminosäure des Core-Proteins auf die Virionbildung	137
5.3. Bindung rekombinanter Core-Partikel an Peptide	139
5.4. Nachweis von cccDNA	142
5.4.1. Nachweis von cccDNA im Southern Blot nach Transduktion des HBV- Genoms unter Kontrolle des endogenen Promotors	142
5.4.2. Indirekter Nachweis von cccDNA durch HBeAg nach Transduktion des HBV-Genoms unter Kontrolle des SV40-Promotors	145
5.5. Ausblick	149
6. ZUSAMMENFASSUNG	151
7. LITERATURVERZEICHNIS	152